

A high-magnification, black and white electron micrograph showing several large, irregularly shaped cells with a highly textured, granular surface. The cells are arranged in a somewhat circular pattern, with some overlapping. The background is dark, making the lighter-colored cells stand out. The overall appearance is that of biological tissue or cells at a microscopic level.

A Importância da Gradualidade de Administração Oral de Antígeno na Indução de Tolerância Oral

Sabine Madsen Ficker

Sabine Madsen Ficker

A Importância da Gradualidade de Administração Oral de Antígeno na Indução de Tolerância Oral

*Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Imunologia .*

Area de Concentração: Imunologia

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Belo Horizonte

1998

À Ana pelo carinho de mãe dispensado a mim e todos do LIB.

À minha mãe por atuar de forma tão estável e carinhosa em minha formação além de me proporcionar uma vida de tantas alegrias.

Ao meu irmão Thomas pela substituição paterna.

Ao meu irmão Frede que, infelizmente, não mais pode sentir a beleza da vida e nos encantar com seu jeito alegre e tranquilo.

À minha irmã Erika pela amizade e grande ajuda prática.

Ao Jorge por todos estes anos de muito carinho e acompanhamento em meu desenvolvimento emocional e profissional.

Agradecimentos

À Ana pelo carinho, compreensão e por moldar a base de meu interesse pelo encantador mundo da ciência.

Ao Nelson pela contribuição em meu crescimento pessoal e profissional.

À Denise pela gentileza na colaboração.

À Juscilene pela personalidade marcante que encanta a todos e pelo grande auxílio na elaboração deste trabalho.

À Michele, Erika, Ana Carla e Alysson pela importante colaboração.

À Ildinha pelo eterno carinho e dedicação ao trabalho.

À Frank e Ilma pelo companheirismo e ajuda.

À Mariléia pelos sorrisos sinceros e cativantes.

À Virilânia pela amizade de todos estes anos.

À Beatriz Senra, ao Bruno Verdolin, ao Bruno França, à Cláudia, à Elaine e à Vanessa pelo apoio afetuoso.

À Celise pela disposição em ajudar, sempre e tanto.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela convivência cotidiana.

À todas as demais pessoas que, de alguma forma, também contribuíram para a realização desse trabalho.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro do CNPq, Fapemig, Finep e PRPq-UFMG.

**"... eu só levo a certeza
de que muito pouco sei,
ou nada sei ..."**

Almir Sater / Renato Teixeira
"Tocando em Frente"

Sumário

Introdução	1
Área intestinal	1
Os linfócitos da mucosa intestinal	1
Absorção de proteínas	1
O trato gastrointestinal e o tecido linfóide associado às mucosas	3
Histologia e fisiologia do trato gastrointestinal	3
Componentes do tecido linfóide associado à mucosa intestinal	5
Absorção de moléculas potencialmente imunogênicas.	10
O fenômeno da tolerância oral	12
Mecanismos explicativos	13
Fatores importantes na indução de tolerância oral	15
A produção de um tolerógeno pela ingestão oral de antígeno	18
Objetivos	21
Material e Métodos	22
Animais	22
Proteínas solúveis	22
Adjuvantes	23
Administração oral do antígeno (pré-tratamento oral)	23
Por gavagem	23
Por ingestão voluntária	23

Imunizações	24
Imunizações com Hidróxido de Alumínio + Antígeno	25
Imunizações com Adjuvante Completo de Freund + Antígeno	25
Sangria e obtenção de soro	25
Quantificação dos anticorpos específicos no soro	26
Medida de reação celular <i>in vivo</i>	26
Análise histológica da reação celular	27
Ensaio de proliferação celular (reação celular <i>in vitro</i>)	27
Transferência de soro para análise da produção ou não de tolerógeno pelo doador e incorporação ou não de tolerógeno pelo receptor	28
Análise estatística	28
Resultados	29
Análise do efeito da alteração na frequência e gradualidade de administração oral do antígeno na produção de anticorpos específicos	29
Análise do efeito da alteração na frequência e gradualidade de administração oral do antígeno nas reações de imunidade celular <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	32
Análise do efeito da alteração na frequência e gradualidade de administração oral do antígeno na indução de tolerância oral em camundongos idosos	36
Discussão	44
A importância da gradualidade na indução de tolerância oral	44
Digestão	46
Absorção	47
O contato com o tecido linfóide associado às mucosas	49
A importância do fígado na indução de tolerância oral	54

Algumas observações quanto aos protocolos utilizados	56
A reação celular <i>in vivo</i> já é detectável 6 horas após o desafio e apresenta uma grande concentração de eosinófilos no infiltrado inflamatório	56
A reação de imunidade celular é mais sensível que a reatividade imune humoral para se determinar a indução de tolerância oral	57
A ingestão voluntária de Ova e de clara de ovo levam à diferentes graus de supressão de anticorpos anti-Ova	58
Supressão da <u>reação de DTH</u> com a administração do tolerógeno?	59
A menor susceptibilidade à indução de tolerância oral em idosos	60
O camundongo idoso ao ingerir o antígeno é capaz de produzir tolerógeno?	62
O efeito imunológico do soro normal de camundongo idoso sobre o camundongo jovem	63
Conclusões	64
Trabalhos publicados com os resultados da presente dissertação	65
Bibliografia	66

Lista de Figuras

Figura 1 - Protocolo experimental básico	24
Figura 2 - Efeito de pré-tratamento oral por gavagem em camundongos jovens sobre a produção de anticorpos anti-Ova.....	29
Figura 3 - Efeito de pré-tratamento oral por ingestão voluntária em camundongos jovens sobre a produção de anticorpos anti-Ova	30
Figura 4 - Efeito do aumento da frequência e da gradualidade de administração oral do antígeno na indução de tolerância oral em camundongos jovens sobre a produção de anticorpos anti-Ova	31
Figura 5 - Reação de imunidade celular <i>in vivo</i> em camundongos jovens que receberam diferentes pré-tratamentos orais	33
Figura 6 - Foto do infiltrado inflamatório do coxim plantar de camundongos imune à Ova, 6 horas após o desafio	34
Figura 7 - Foto do infiltrado inflamatório do coxim plantar de camundongos tolerantes à Ova, 6 horas após o desafio	35
Figura 8 - Reação de imunidade celular <i>in vitro</i> de linfonodo inguinal de camundongos jovens que receberam diferentes pré-tratamentos orais	36
Figura 9 - Indução de tolerância oral em camundongos de diferentes idades	37
Figura 10 - Efeito do aumento da frequência e da gradualidade de administração oral do antígeno na indução de tolerância oral medida pela produção de anticorpos anti-Ova em camundongos idosos	38
Figura 11 - Reação de imunidade celular <i>in vitro</i> de linfonodo inguinal de camundongos idosos que receberam diferentes pré-tratamentos orais	39
Figura 12 - Protocolo de indução de tolerância por transferência de soro contendo tolerógeno em camundongos jovens	40

Figura 13 - Reação de imunidade celular *in vivo* em camundongos idosos após transferência de soro de camundongos jovens ou idosos gavados com salina ou Ova 41

Figura 14 - Reação de imunidade celular *in vivo* em camundongos jovens após transferência de soro de camundongos jovens ou idosos gavados com salina ou Ova 43

Lista de Abreviaturas e Siglas

APC - células apresentadoras de antígeno
BALT - tecido linfóide associado aos brônquios
CD - *cluster of differentiation* - "marcadores" de diferenciação
CFA - adjuvante completo de Freund
DNP - dinitro-fenil
DTH - hipersensibilidade do tipo retardada
E.L.I.S.A. - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EGF - *epidermal growth factor*
FAE - epitélio associado aos folículos
Flt-3 L - ligante de fator de crescimento hematopoiético
GALT- tecido linfóide associados às mucosas
HEV - vênulas de endotélio alto
i.p. - intraperitoneal
ICAM - molécula de adesão intercelular
IEL - linfócitos intraepiteliais
IFN - interferon
Ig - imunoglobulina
IL - interleucina
LFA - antígeno linfocitário funcional
LPL - linfócitos da lâmina própria
LPS - lipopolissacarídeo
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
MLN - linfonodo mesentérico
MLR - *mixed lymphocyte reaction*
NALT - tecido linfóide associado à mucosa nasal
NK - *natural killer*
Ova - ovalbumina
OPD - ortofenileno-diamino
PBS - salina tamponada com fosfato
SCID - imunodeficiência combinada grave
TCR - *T cell receptor* - receptor de células T
TGF - *transforming growth factor*
Th - *T-helper* - linfócito T auxiliar
Thy1 - antígeno de diferenciação de células T
TLA - *Thymus Leukemia Antigen*
TNF - fator de necrose tumoral

Introdução

Sabe-se da grande importância do trato gastrointestinal para nossa sobrevivência, entretanto muito pouco se fala da interrelação entre a fisiologia do trato gastrointestinal e o sistema imune.

Se associarmos a grande área do intestino, à enorme concentração de células do sistema imune e ainda à significativa quantidade de moléculas potencialmente antigênicas que são absorvidas por dia pela mucosa intestinal, podemos ter uma idéia da importância da interrelação trato gastrointestinal - sistema imune.

Área intestinal

O trato gastrointestinal tem uma área de superfície enorme que, em um ser humano adulto, compreende de 200 a 300 m² (cerca de três a quatro salas Baeta Vianna juntas). Essa superfície é de 100 a 150 vezes maior que a superfície da pele que mede, em média, 2 m² (Moog, 1981). A mucosa gastrointestinal constitui-se então na maior superfície pela qual o organismo interage com o meio externo (Shanahan, 1994). Enquanto a pele é formada por várias camadas celulares, incluindo queratinócitos mortos muito pouco permeáveis, o trato gastrointestinal é recoberto por uma única camada viva de células epiteliais, diminuindo bastante seu valor como barreira física à penetração de materiais externos ao organismo.

Os linfócitos da mucosa intestinal

Estima-se que há aproximadamente 10¹⁰ células linfóides por metro do intestino delgado humano. No intestino inteiro há quatro vezes mais linfócitos que na medula óssea, baço e linfonodos-juntos (2,5 x 10¹⁰). Mais de 80% do total de células produtoras de imunoglobulinas em camundongos (e 70% em seres humanos) estão no tecido linfóide associado à mucosa intestinal (Brandtzaeg, 1989; Shanahan, 1994; van der Heijden, 1987).

A maior parte das células secretoras de imunoglobulinas, em camundongos adultos normais, está concentrada no intestino delgado, nas regiões onde são absorvidos os peptídeos e aminoácidos resultantes da digestão das proteínas ingeridas como alimento, e não no intestino grosso, onde se encontra a grande maioria da flora microbiana intestinal (Cara, 1995).

Absorção de proteínas

A principal via de acesso de materiais antigênicos ao organismo é a mucosa digestiva. Esses antígenos são de uma variedade ilimitada e derivam de muitas fontes, incluindo macromoléculas dos alimentos e os produtos de uma rica microbiota. Além do papel nutricional, o intestino absorve macromoléculas que são importantes no desenvolvimento e na ativação

celular, como o EGF (epidermal growth factor) e, nos animais jovens, a IgG materna, por transporte ativo (Rodewald, 1984; Weaver, 1988).

Mais de uma tonelada de nutrientes passam pelo trato gastrointestinal (passando também pelo tecido linfóide associado à mucosa) de um ser humano adulto em um ano (Brandtzaeg, 1998).

Em contraste com a dieta de carboidratos, onde a maior parte consiste de mono e dissacarídeos, a maioria dos aminoácidos da dieta são ingeridos como proteínas e não como peptídeos ou aminoácidos livres (Alpers, 1994). Destas proteínas ingeridas algumas são absorvidas, pela mucosa adulta normal, intactas ou pouco degradadas e entram na circulação sanguínea, especialmente após a alimentação (Brandtzaeg, 1998).

Quase 100% das proteínas ingeridas são absorvidas rapidamente e eficientemente do lúmen (Wiseman, 1964 citado por Green, 1978) muito das quais diretamente pelo enterócito como oligopeptídeos (Silk, 1974). E, nesta forma, é provável que estes oligopeptídeos sejam antigênicos uma vez que 3-6 aminoácidos possuem um tamanho ótimo como determinantes antigênicos (Kabat, 1968).

A digestão inicial de proteínas da dieta ocorre no lúmen sob a influência de enzimas gástricas e pancreáticas mas a quebra completa em aminoácidos requer exposição à enzimas por cerca de 200 horas (Fisher, 1954) e assim muitas proteínas (provavelmente a maioria) chegam à mucosa intestinal na forma de oligopeptídeos (Green, 1978). Alguns destes são hidrolisados na borda em escova ou a nível da membrana celular (Matthews, 1974; Ugolev, 1972) e outros são coletados intactos pelos enterócitos podendo sofrer hidrólise intracelular ou não (Bland, 1989; Matthews, 1974; Silk, 1974). Hoyne e colaboradores sugerem que células epiteliais não apresentam a maquinaria necessária para o processamento intracelular de proteínas exógenas (Hoyne, 1993). O mecanismo de absorção para oligopeptídeos é mais eficiente que aquele para aminoácidos (Silk, 1974), e algumas observações sugerem que eles são absorvidos por diferentes vias. Por exemplo, pacientes com doença de Hartnup e cistinúria, que não conseguem absorver misturas de aminoácidos livres, podem utilizá-los se estiverem presentes na forma de peptídeos (Matthews, 1974; Silk, 1974).

A absorção diária de proteínas para um homem adulto é de 130 a 190 gramas por dia. Destes, 60 a 120g são provenientes da alimentação, cerca de 20g provêm de proteínas secretadas no trato gastrointestinal (saliva, suco gástrico, bile e suco pancreático) e 50g da descamação da mucosa (Moutcastle, 1974).

Esta quantidade de proteínas provenientes da descamação da mucosa é devida à grande taxa de renovação deste epitélio. No intestino delgado, a taxa normal de renovação de células, é na ordem de 10^8 novas células por dia (Hagemann, 1970), permitindo (em camundongos) uma reconstituição completa do epitélio dos vilos a cada 2-3 dias. Em humanos estima-se que a reconstituição completa ocorra a cada 3-6 dias (Eastwood, 1977). As células novas formadas nas criptas migram para o vilo, diferenciando-se enquanto migram. As células mais velhas do vilo caem no lúmen intestinal das chamadas zonas de extrusão no topo dos vilos (Abrams, 1983).

O trato gastrointestinal e o tecido linfóide associado às mucosas

Histologia e fisiologia do trato gastrointestinal

O tubo intestinal apresenta uma organização morfológica uniforme através de sua extensão e sua parede é formada por quatro camadas distintas: mucosa, submucosa, muscular e adventícia ou serosa. A mucosa é a camada mais interna e apresenta em sua superfície uma única camada de células: o epitélio mucoso. Abaixo do epitélio se encontra um tecido conjuntivo reticular e fibroelástico, que sustenta os vasos sanguíneos, linfáticos e processos nervosos, chamado lâmina própria. De todas as camadas, a mucosa é estruturalmente a mais complexa, sendo que o epitélio pode se modificar para diferentes funções em diferentes porções do tubo (Hummel, 1966).

O epitélio intestinal é composto por células colunares absorventes (enterócitos), células caliciformes, células epiteliais não-diferenciadas, células de Paneth, células enterocromafins, células "tuft" e linfócitos intraepiteliais. Os enterócitos constituem a maior parte do epitélio mucoso (aproximadamente 80%) e possuem microvilosidades em sua superfície luminal que são cobertas pelo glicocálice e uma espessa camada de muco (Bienenstock, 1974). Estas células sintetizam e secretam no lúmen intestinal numerosas proteínas, uma das quais o "componente secretor" da IgA. Também são capazes de transportar materiais do lúmen, incluindo carboidratos, proteínas, vírus, bactérias e ácidos graxos, até a membrana basal (Bienenstock, 1974).

O glicocálice é uma camada glicoproteica situada logo acima da mucosa, constituída por carboidratos, várias enzimas e proteínas (dissacaridases, peptidases, receptores e proteínas de transporte), que atuam na digestão e absorção de nutrientes (Bienenstock, 1974; Kato, 1994). Embora não faça parte do epitélio intestinal absorvente, o muco presente sobre a superfície das células epiteliais impede que estas entrem em contato direto com o material na luz intestinal. O muco é constituído de uma secreção glicoproteica (mucina) de alto peso molecular secretado por células epiteliais especializadas, as células caliciformes, presentes no intestino (além do pulmão e trato genitourinário). Este complexo biofilme contém albumina, imunoglobulinas (principalmente IgA secretória), α 1-antitripsina, lisozima, lactoferrina e EGF (fator de crescimento endotelial) suspensos em um meio semi-sólido, que funciona como uma membrana que permite a difusão de solutos de baixo peso molecular e atua como uma barreira física para microorganismos e substâncias de alto peso molecular (Lamont, 1992).

Abaixo do epitélio mucoso, se encontra a lâmina própria. Este tecido se situa entre o epitélio e a muscular da mucosa e contém um grande número de células, principalmente no duodeno e jejuno proximal. Tais células incluem mastócitos, eosinófilos, células mesenquimais (fibroblastos e células endoteliais) e processos nervosos, além de várias células imunocompetentes,

incluindo células dendríticas, macrófagos e linfócitos, os quais podem formar unidades funcionais com as células epiteliais da mucosa (Kato, 1994).

Assim como a maioria dos tecidos o intestino é provido de linfonodos; o fluido tecidual formado no espaço intersticial da lâmina própria, contendo componentes da dieta, é drenado para o linfonodo mesentérico através de ductos eferentes que se unem para formar o ducto linfático intestinal (Hall, 1978).

Talvez possamos considerar o epitélio intestinal como um "ducto" *aferente* uma vez que os componentes da dieta são drenados do lúmen para o tecido subepitelial e, posteriormente, deste tecido para o linfonodo mesentérico pelos ductos *eferentes*. O mesmo ocorre nas placas de Peyer onde células M (que se distribuem ao longo do epitélio que recobre os nódulos linfáticos) permitem a entrada constante de componentes da dieta que, posteriormente, podem ser drenados pelo ducto *eferente*. Assim, podemos dizer que os ductos *aferentes* das placas de Peyer são as células M.

Além da circulação linfática, a circulação sanguínea permeando todo o intestino, também capta os componentes da dieta levando-os ao fígado pelo sistema porta.

A função primária do intestino de assimilar nutrientes é acompanhada por dois estágios: digestão e absorção. No primeiro estágio que é "intraluminal", grande parte do alimento ingerido é quebrado em pequenas moléculas. No segundo estágio que é "intestinal", os componentes da dieta chegam aos fluidos do corpo pela passagem através do epitélio mucoso intestinal e, subseqüentemente, é removido do intestino via capilares e linfáticos.

Além da passagem de pequenas moléculas, macromoléculas também podem ser absorvidas e, ao alcançarem os tecidos do corpo através do intestino, elas estão sujeitas à interação com o tecido linfóide associado à mucosa intestinal. O grau de interação será claramente proporcional à complexidade antigênica do material e também pode ser influenciado pela via de entrada (Nicklin, 1987).

Os antígenos podem interagir localmente com macrófagos, células dendríticas e/ou linfócitos. Alternativamente, o material pode ser transportado para o fígado pela circulação porta e/ou para o linfonodo mesentérico pela drenagem linfática.

Com relação à interação com macrófagos, Nicklin (1987) examinando seções de placas de Peyer usando iluminação ultravioleta, observou uma grande concentração de componentes da dieta derivada de cereal fluorescente dentro do lúmen, assim como macrófagos fluorescentes dentro da zona subepitelial de placas de Peyer. Exame posterior demonstrou a presença de células aparentemente idênticas mais ao fundo das placas de Peyer e também no interior do linfonodo mesentérico. Esta distribuição celular sugere que macrófagos, dentro da zona subepitelial, coletam o material que entra no tecido, via placa de Peyer, e o transporta para o linfonodo mesentérico.

Linfócitos presentes no tecido linfóide associado às mucosas (GALT - *gut-associated lymphocyte tissue*) podem ser ativados pelo material absorvido e migrar para outros órgãos linfóides. Os linfócitos B, e provavelmente também linfócitos T, primados ao nível do GALT migram através de vasos linfáticos até os linfonodos mesentéricos e, via ducto torácico, podem cair na circulação sanguínea e chegarem ao baço e outros órgãos linfóides associados à mucosa. Essas células podem, assim, alterar sistemicamente a reatividade imunológica. Parte dos linfócitos B primados podem voltar a se localizar no GALT, sendo responsáveis pelo aumento da produção de IgA secretória no intestino, num contato secundário com o antígeno por essa via.

Além de ir ao GALT, esses linfócitos primados podem migrar para tecidos linfóides associados a outras superfícies secretórias como o epitélio do trato respiratório (BALT - "bronchus-associated lymphoid tissue" e NALT - "nasal-associated lymphoid tissue") e as glândulas salivares, as lacrimais e as mamárias. Podem também migrar para outros órgãos linfóides como as tonsilas e o anel de Waldeyer (McDermott, 1979; Mestecky, 1987).

Componentes do tecido linfóide associado à mucosa intestinal

O tecido linfóide associado à mucosa (GALT - *gut-associated lymphoid tissue*) é constituído de agregados linfóides organizados representados pelas placas de Peyer, o apêndice, os linfonodos mesentéricos (MLN - *mesenteric lymph nodes*), e nódulos linfáticos solitários. Além disso, são também considerados parte do GALT o tecido linfóide difuso no epitélio: os linfócitos intraepiteliais (IEL - *intraepithelial lymphocytes*), e na lâmina própria; os linfócitos da lâmina própria (LPL - *lamina propria lymphocytes*). Coletivamente esta massa de tecido linfóide ultrapassa facilmente outros órgãos linfóides em tamanho (Croitoru, 1994). As células linfóides representam cerca de 1/4 de todas as células da mucosa (Kagnoff, 1981). Grande parte destes linfócitos da mucosa constitui-se de células com fenótipo e origem distintos dos observados em células convencionais. Assim, o GALT possui tipos celulares peculiares e que, devido a seu grande número, devem exercer importante papel na fisiologia do sistema imune.

Os linfócitos intraepiteliais - IEL

Os linfócitos intraepiteliais e os linfócitos T da lâmina própria (LPL - *lamina propria lymphocytes*) são as duas principais populações de células T no intestino delgado (Phillips-Quagliata, 1994).

Os IEL têm características especiais que são distintas daquelas de outros linfócitos. O número médio de IEL por 100 células absorptivas é de 20 no jejuno de um homem adulto normal e diminui distalmente no intestino (Dobbins, 1986). Estas células estão localizadas acima da lâmina basal entre as células epiteliais e estão separados destas por um espaço de 10 a 20 nm. Este contato entre IEL e enterócitos não possui nenhuma estrutura juncional (Kato, 1994).

Em camundongos, os IEL constituem uma população mista. Cerca de 45% são linfócitos T convencionais, de origem tímica, Thy1⁺ que expressam o receptor de célula T (TCR - *T cell receptor*) $\alpha\beta$. Entre estas células, 5-15% expressam CD4 e as demais expressam CD8. Os outros 55% são células T não dependentes do timo que se originam do fígado fetal ou de progenitores da medula óssea que migram diretamente para o intestino. Muitas destas células expressam pouco ou nenhum Thy1, possuem TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$ e moléculas CD8 feitas somente de cadeias α ao invés das usuais cadeias α e β (Bonneville, 1990; Bonneville, 1988; De Geus, 1990; Goodman, 1988; Goodman, 1989; Guy-Grand, 1991; Guy-Grand, 1991; Kato, 1994; Klein, 1986; Parrott, 1983; Rocha, 1991). Lefrancois demonstrou que todos os IEL $\gamma\delta$ e ~50% dos IEL $\alpha\beta$ são CD8 β ⁻ (Lefrancois, 1991).

Em contraste com a grande maioria de células T periféricas, uma proporção substancial de IEL não expressam Thy1 (Parrott, 1983). Aproximadamente 20% dos IEL $\alpha\beta$ e 70% dos IEL $\gamma\delta$ são Thy1⁻ (Lefrancois, 1994).

Apesar do receptor de células T ser predominantemente de cadeias $\alpha\beta$ em células dos órgãos linfóides convencionais, no epitélio intestinal a proporção de linfócitos $\gamma\delta$ é muito maior (Jarry, 1990). Estes IEL $\gamma\delta$ expressam um conjunto restrito de regiões V γ (principalmente V γ 5 - 50 a 80% dos IEL $\gamma\delta$) e V δ (principalmente V δ 5 - de 15 a 60% dependendo da linhagem do camundongo; V δ 4 e V δ 6) (Lefrancois, 1994).

Enquanto praticamente todas as células T periféricas e timócitos expressam CD5 em algum grau, certos subtipos de IEL não o expressam. Os IEL $\gamma\delta$ de camundongos (Lefrancois, 1991) e seres humanos não têm CD5 (Jarry, 1990), em contraste às células T da periferia. Além disto, aproximadamente 50% das IEL $\alpha\beta$ de camundongo, rato e seres humanos são CD5⁻. A expressão de CD5 parece não estar correlacionada com a expressão de Thy1 ou CD8 β . Não se sabe ainda o significado funcional da falta de CD5 (Lefrancois, 1994).

Os IEL expressam determinantes de CD45 que geralmente estão associados a células T ativadas. A maioria dos IEL são CD45RO⁺ e CD45RA⁻, em contraste com células T periféricas que são ~50% CD45RO⁺ e ~50% CD45RA⁺ (Halstensen, 1990). Células T CD45RA⁺ são consideradas células virgens enquanto células CD45RO⁺ são consideradas células ativadas ou de memória (Lefrancois, 1994).

Vários estudos sugerem que as células T em geral podem reagir com antígenos não polimórficos tal como *heat-shock proteins* ou moléculas semelhantes à molécula de classe I do MHC (Classe I-like) tal como CD1 ou TLA. A demonstração de que TLA em camundongo e CD1 em camundongos e seres humanos são expressos proeminentemente em células epiteliais do intestino suporta esta teoria (Bleicher; Hershberg, 1990). TLA também é expresso por ~50% dos IEL $\alpha\beta$ e ~25% dos IEL $\gamma\delta$ e é predominantemente

expresso pelo subtipo Thy1⁻ (Hershberg, 1990). TLA e CD1 exibem um padrão de expressão restrito com predominância no intestino (Lefrancois, 1994).

Os linfócitos da lâmina própria - LPL

A lâmina própria é uma camada de tecido conjuntivo entre o epitélio e a muscular da mucosa. Esta camada é constituída de células de músculo liso, fibroblastos, linfáticos, vasos sanguíneos e forma o centro dos vilos. A mais impressionante característica da lâmina própria dos intestinos delgado e grosso é o infiltrado de células linfóides e mielóides, dentre os quais os linfócitos da lâmina própria (LPL - *lamina propria lymphocytes*), macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos (MacDonald, 1994).

Células T CD4 e CD8 positivas estão presentes na lâmina própria em proporções similares ao sangue periférico (Selby, 1983; James, 1986; Schieferdecker, 1990). Assim, as células T do sangue periférico e da lâmina própria parecem não ser diferentes. Entretanto poucos linfócitos T da lâmina própria expressam CD45RA e a grande maioria das células são CD45RO⁺ (Schieferdecker, 1990). Em contraste, no sangue periférico, aproximadamente 30% das células T são CD45RA⁺ e 30 a 50% são CD45RO⁺. Assim, o fenótipo CD45 dos LPL indica que a grande maioria destas células estão ativadas (Zeit, 1991). Em seres humanos, 95% dos LPL expressam TCR $\alpha\beta$; aproximadamente 50% são CD4⁺ e 35% são CD8⁺. Em camundongos mais que 50% dos LPL CD3⁺ são CD4⁺ (Mega, 1991).

A lâmina própria do intestino contém numerosas células que caracteristicamente secretam IgA. Aproximadamente 15 milhões de células secretando IgA são encontradas no intestino de um camundongo, o que corresponde a 10 vezes mais que o número total de células secretando IgM nos tecidos linfóides (van der Heijden, 1987). Mais que 80% de todas as células secretoras de imunoglobulinas em um adulto estão localizadas na lâmina própria (Brandtzaeg, 1989).

De acordo com a maior parte da literatura na área, plasmócitos secretando IgA no intestino são derivados de células B convencionais, localizadas principalmente nos placas de Peyer do intestino delgado. Entretanto alguns autores sugerem que muitos plasmócitos secretando IgA no intestino são originárias de células B Ly-1 (células Ly-1 são agora denominadas células B-1; Kantor, 1991) que predominam na cavidade peritoneal (Kroese, 1994).

As células B-1

Células B-1 constituem um subtipo de células B que produz grande parte das imunoglobulinas do soro em condições normais, incluindo anticorpos autoreativos e antibacterianos. As células B-1 são distintas das células B convencionais por seu fenótipo, desenvolvimento e localização anatômica (Hardy, 1986; Hayakawa, 1988; Herzenberg, 1986; Kantor, 1993; Kipps, 1989). Células B-1 estão praticamente ausentes nos linfonodos e placas de Peyer e estão presentes em baixa frequência no baço; entretanto elas

constituem a principal fração de células B nas cavidades peritoneal e pleural. As células B-1 podem ser divididas em duas populações: células B-1a que expressam níveis detectáveis de CD5, e células B-1b que não o expressam. Ambas as populações estão presentes nas cavidades peritoneal e pleural e pouco se sabe sobre a relevância desta expressão ou não de CD5 (Kroese, 1994).

Estudos de transferência adotiva têm mostrado que células B-1 e células B convencionais têm vias de desenvolvimento distintas. Basicamente células B-1 aparecem cedo na ontogenia do ser humano a partir de células progenitoras localizadas no omento fetal (Solvason, 1991) e fígado fetal (Hardy, 1992; Kantor, 1992; Solvason, 1991). Após o desmame, as células B-1 se mantêm por auto-replicação e são independentes da medula óssea. Células B convencionais, em contraste, aparecem tarde na ontogenia e são repostas pela produção *de novo* da medula óssea do adulto (Kroese, 1994).

Apesar de seu número total ser baixo (<5% das células B periféricas), as células B-1 produzem grande parte das imunoglobulinas do soro, incluindo metade das IgM e IgA em quimeras de radiação (Kroese, 1989); entretanto elas expressam um repertório limitado (Forster, 1988; Pennell, 1988; Tarlinton, 1988) incluindo o uso exclusivo de V_H11 e V_H12, que são específicos por exemplo para fosfatidilcolina (Carmack, 1990; Hardy, Carmack, 1989; Pennell, 1988). Os anticorpos produzidos pelas células B-1 tendem a ter baixa afinidade e ampla especificidade (Lalor, 1989).

As placas de Peyer

As placas de Peyer são grupos de folículos linfóides na mucosa do intestino delgado. Cada placa de Peyer de camundongo apresenta um agregado de oito a dez folículos linfóides (Ermak, 1986). Morfologicamente, os nódulos das placas de Peyer são separados em três domínios principais: a área folicular, a área parafolicular e o epitélio associado ao folículo (FAE - *follicle-associated epithelium*). Histologicamente os nódulos linfáticos intestinais diferem dos linfonodos porque não têm cápsula, medula e nem limites claros (Kato, 1994). O FAE é uma camada unicelular que forma a interface entre o aparato linfóide e o lúmen intestinal e pode-se dizer que suas células M funcionam como um "ducto aferente linfático" para a placa de Peyer, por permitirem a entrada constante de componentes do lúmen. O FAE é composto principalmente de células M, enterócitos, IEL, poucas células secretoras de muco e ocasionais *tuft cells* (Kato, 1994).

As regiões parafoliculares das placas de Peyer são enriquecidas por células T e estão imediatamente adjacentes aos folículos, ou zonas de células B, contendo os centros germinativos (Kiyono, 1994). Cerca de 60% das células dos centros germinativos no GALT expressam IgA de superfície (Butcher, 1982). As áreas de células T nas placas de Peyer possuem vênulas de endotélio alto (HEV - *high endothelial venules*) que são os locais de entrada para os linfócitos que compoem as placas de Peyer continuamente (Kiyono, 1994). A maioria das células T das placas de Peyer são CD4⁺ (MacDonald, 1994).

As células B e T das placas de Peyer podem atuar no processamento do antígeno intestinal, já que estão localizadas estrategicamente no local onde o

antígeno entra para a placa de Peyer. Aparentemente, sob sinais apropriados, as células B das placas de Peyer ficam comprometidas com a produção de IgA, migram para o linfonodo mesentérico onde maturam em precursores de plasmócitos, depois migram para a lâmina própria do intestino e de outras mucosas onde secretam IgA (Roux, 1981).

A interação entre células T auxiliares e células dendríticas pode ocorrer nas regiões epiteliais e subepiteliais da cúpula, onde células Ia⁺ com a morfologia de células dendríticas ocorrem juntamente a células T auxiliares e células B. Áreas interfoliculares parecem atuar como locais para apresentação de antígeno e aparentemente as células dendríticas podem migrar da cúpula para as áreas interfoliculares onde apresentam o antígeno para células T auxiliares (Wilders, 1983).

As células apresentadoras de antígeno do intestino

As células apresentadoras de antígenos (APC - *antigen-presenting cells*) no GALT incluem células B, macrófagos, enterócitos e células dendríticas que estão relacionadas às células de Langerhans da pele (McGhee, 1989).

Os macrófagos do trato gastrointestinal são completamente heterogêneos e subpopulações se localizam em áreas distintas no trato gastrointestinal onde expressam diferentes propriedades funcionais, mas pouco se sabe sobre eles (Panja, 1994). Estes macrófagos são encontrados no centro dos vilos do intestino delgado, no espaço subepitelial das criptas, abaixo do FAE, contornando as placas de Peyer e dentro das placas (Beeken, 1987; Golder, 1983; Harvey, 1991; Selby, 1983; Winter, 1983). Os macrófagos do intestino expressam FcR (receptores da porção cristalizável dos anticorpos) e podem coletar imunocomplexos (Panja, 1994).

Dois populações de células dendríticas têm sido descritas no intestino do ser humano. As células dendríticas clássicas são esterase negativas, fosfatase ácida negativas, FcR negativas, fibronectina não aderente, fortemente positivas para o DR e com extensões dendríticas que estão ativamente envolvidas em interações com células T (Bland, 1991; Mahida, 1988; Sminia, 1986; Soesaty, 1990). Este tipo de células dendríticas é denominado células veladas e é encontrado na lâmina própria ao longo do intestino delgado, predominantemente no tecido subepitelial. Funcionalmente estas células são potentes estimuladoras de cultura mista de linfócitos (MLR - *mixed lymphocyte reaction*) (Mahida, 1988). Um segundo tipo de células dendríticas é o das células interdigitantes encontradas nas placas de Peyer. Estas células são efetivas APC mas, interessantemente parecem promover ativação específica para produção de IgA (possivelmente relacionado à produção de TGFβ - *Transforming Growth Factor β*) (Spalding, 1986; Spalding, 1984).

Absorção de moléculas potencialmente imunogênicas

Há muitas questões a serem respondidas quanto ao transporte de macromoléculas. Elas podem penetrar pela mucosa por diferentes vias e não se sabe a relevância de cada uma destas vias para o sistema imune adjacente e as consequências de entradas preferenciais de antígenos por uma ou outra via.

Há três rotas principais por onde moléculas potencialmente imunogênicas podem atravessar a "barreira" mucosa (Shanahan, 1994): **(a)** através de células epiteliais especializadas (células M) que recobrem folículos linfóides (placas de Peyer); **(b)** através do epitélio; e **(c)** paracelularmente entre os enterócitos da superfície:

a) Absorção através de células M

As células M são também denominadas células linfoepiteliais ou células epiteliais associadas ao folículo. Em comparação aos enterócitos absorptivos adjacentes, a superfície apical das células M tem microvilosidades menores, mais irregulares, em menor número e com pouco glicocálice. Há também menor quantidade de muco recobrindo a superfície celular. Além disso, a atividade enzimática lisossomal intracelular é reduzida. Mitocôndrias e vesículas endocíticas são abundantes no citoplasma apical. O núcleo está localizado basalmente onde o citoplasma e a membrana envolvem parcialmente um ou mais linfócitos, macrófagos ou células dendríticas permitindo um contato com estas células do tecido linfóide subepitelial. Há vários espaços vazios nesta área facilitando o transporte e o tráfego linfoepitelial (Sanderson, 1995; Trier, 1991).

A função primária das células M parece ser coletar antígenos do lúmen. Estas células não parecem estar envolvidas na apresentação de antígenos pois apresentam escassa ou nenhuma molécula de MHC de classe II (Brandtzaeg, 1990; Keren, 1992).

As células M podem transportar macromoléculas do lúmen para o interstício por transporte não dependente de receptor. Macromoléculas solúveis são incorporadas em compartimentos ligados às membranas, transferidas através da célula e liberadas para dentro do interstício que contém células linfóides (Sanderson, 1995). Elas podem então ser coletadas pelas células apresentadoras de antígeno do interstício adjacente que incluem células dendríticas, macrófagos e células B (Ermak, 1986; Keren, 1992; Kraehenbuhl, 1992) ou entrarem na circulação linfática ou sanguínea sendo drenados respectivamente para o linfonodo mesentérico ou fígado.

Uma questão ainda sem resposta é se receptores específicos existem na superfície de células M, facilitando o transporte de macromoléculas através do epitélio (Sanderson, 1995).

b) Absorção através de enterócitos

Macromoléculas podem ser absorvidas do lúmen, através do enterócito, com ou sem o envolvimento de receptores específicos. Com relação à absorção sem receptores, esta pode ocorrer de duas formas: as moléculas podem se ligar à membrana apical de forma não específica e então serem coletadas pelo enterócito, ou ainda, moléculas em solução próximas à

membrana de invaginação podem ser englobadas por vesículas em desenvolvimento (Sanderson, 1995).

As células epiteliais normais do intestino delgado de rato (Bland, 1988), camundongo (Kaiserlian, 1990) e humano (Mayer, 1991) expressam moléculas de MHC de classe II constitutivamente embora em baixas quantidades. Estas moléculas nunca foram detectadas nas microvilosidades da borda em escova ou vesículas na base das microvilosidades. Entretanto, organelas ao longo de todo o citoplasma apical apresentam moléculas de MHC de classe II (Sanderson, 1995).

A regulação da expressão de MHC de classe II pelos enterócitos é influenciada, em parte, pelo sistema imune local e em particular pelas citocinas tal como interferon-gama, que é um dos mais potentes indutores da expressão de MHC II (Bland, 1988; Brandtzaeg, 1989). A exposição antigênica também influencia a expressão de MHC (Wilson, 1990).

Apesar de não haver ainda evidências *in vivo* de que enterócitos podem apresentar antígenos para células T, experimento com células epiteliais isoladas do intestino indicam que células T interagem com moléculas de MHC de classe II contendo antígenos que foram coletados e processados por enterócitos (Bland, 1986; Kaiserlian, 1989; Mayer, 1987).

Em adição à expressão de moléculas de MHC de classe II, a eficiência da apresentação antigênica é ótima, se moléculas de aderência apropriadas (que facilitam o contato com células T) são expressas e se citocinas estimulatórias de células T são geradas. Células epiteliais humanas expressam LFA-3 com uma densidade comparável à de monócitos, e têm expressão mais baixa ou variável de LFA-1 e ICAM-1 (Kaiserlian, 1991; Mayer, 1992). Sob certas circunstâncias, enterócitos podem ser capazes de produzir várias citocinas, incluindo interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e transforming growth factor beta (TGF- β) e algumas podem ter uma relação autócrina com as células epiteliais (Bland, 1991; Mayer, 1992).

A importância relativa de enterócitos e células M no transporte antigênico e na apresentação para células T é incerta. Apesar de enterócitos estarem em número muito maior que células M, eles não são tão eficientes quanto células apresentadoras de antígeno (APC) convencionais (Bland, 1991; Bland, 1989; Mayer, 1991). Em contraste com as APC tradicionais onde pequenos fragmentos de peptídeos são gerados após a coleta da proteína, grandes peptídeos se mantêm após a digestão pelas células epiteliais (Bland, 1989).

É possível que as moléculas de classe II dos enterócitos atuem como receptores para transportar antígenos numa rota protegida através do epitélio, permitindo a entrada direta para a lâmina própria (Bland, 1988).

c) Absorção de antígeno paracelularmente

O transporte transepitelial pode ocorrer pela rota paracelular tanto quanto através das células.

Sob circunstâncias normais, água, eletrólitos e até mesmo polipeptídeos curtos podem passar entre enterócitos, mas a presença de *tight junctions*

limita a passagem de macromoléculas (Atisook, 1991; Madara, 1992). O poro de permeabilidade entre as células foi estimado ser de 5 nm que é similar ao tamanho de pequenas macromoléculas (como polipeptídeos de 11 aminoácidos) mas grandes moléculas imunogênicas não podem passar por esta rota em condições fisiológicas normais (Sanderson, 1995).

Os componentes da dieta podem também ganhar acesso ao organismo via zona de extrusão do vilão. O vilão de muitas espécies mantém um ciclo de contração e relaxamento que está associado com a contínua extrusão de células do topo do vilão. Exame ultraestrutural do topo do vilão revelou fendas entre as células epiteliais terminais (Nicklin, 1987). Em cão, por exemplo, foi observado a coleta de fluidos via zona de extrusão durante o relaxamento (Lee, 1971).

O fenômeno da tolerância oral

Na maioria dos animais, uma pequena parcela dos produtos ingeridos é absorvida intacta ou semi-degradada, em forma ainda imunologicamente relevante (Swarbrick, 1979; Walker, 1975). Cada refeição implica na absorção de proteínas e peptídeos em concentrações suficientes para influenciar a atividade imunológica. De fato, a exposição oral a um antígeno não apresentado anteriormente ao organismo, pode resultar em diferentes eventos imunológicos já descritos na literatura (Vaz, 1997):

a) hiporresponsividade sistêmica a imunizações parenterais com o antígeno, que é conhecida como tolerância oral. Este é o fenômeno imunológico que mais frequentemente ocorre no organismo após o contato fisiológico com proteínas pela alimentação. Desta forma, os animais são naturalmente tolerantes às proteínas de seus alimentos (Stransky, 1998);

b) imunização sistêmica com produção de títulos aumentados de anticorpos na circulação (Faria, 1993; Strobel, 1996; Verdolin, 1993);

c) imunização local, ao nível da mucosa, com aumento da concentração de IgA secretória no muco intestinal (Bienenstock, 1974; Brandtzaeg, 1989). Concomitante à imunização local, pode ocorrer tanto uma imunização sistêmica, quanto, inversamente, a tolerância sistêmica a imunizações parenterais posteriores (Challacombe, 1980);

d) supressão a nível local da produção de IgA, que pode ser concomitante a uma supressão sistêmica tanto da produção da própria IgA, quanto de outros isotipos (IgG, IgE e IgM) (Challacombe, 1983; Stok, 1994).

O fenômeno da tolerância oral vem sendo "redescoberto" desde 1909 quando Besredka relatou que cobaias alimentadas com leite se tornavam refratárias à anafilaxia por injeções subsequentes de proteínas do leite (Besredka, 1909). Independentemente, entre 1908 e 1911, Wells e colaboradores

fizeram observações semelhantes com proteínas vegetais, como a zeína (Wells, 1908; Wells, 1911).

A natureza imunológica da tolerância oral foi caracterizada apenas em 1949, por Chase, que alimentando cobaias com dinitroclorobenzeno (DNCB) evitou o desenvolvimento de dermatite de contato após o pincelamento desse agente sensibilizante na pele dos animais (Chase, 1949). Anteriormente, Chase havia sido o primeiro a demonstrar que a sensibilidade "tuberculínica" assim como a sensibilização de contato são fenômenos imunológicos "celulares", visto que sua transferência requer a transfusão (adotiva) de células e não é conseguida pela simples transferência (passiva) de anticorpos (Chase, 1945).

Mas foi somente a partir da década de 70 que as consequências imunológicas da administração intragástrica de antígenos foram melhor estudadas (Hanson, 1977; Kagnoff, 1982; Mowat, 1994; Thomas, 1974; Tomasi, 1980; Weiner, 1994; Vaz, 1977). A tolerância oral foi definida como um fenômeno em que um animal torna-se especificamente incapaz de responder a um estímulo imunogênico em consequência da ingestão prévia do antígeno. Essa tolerância tem uma longa duração e é capaz de influenciar uma gama variada de parâmetros imunológicos como: os títulos de anticorpos de diferentes isotipos no soro (Hanson, 1979; Vaz, 1977), o ritmo de clareamento de antígenos na circulação (Hanson, 1979), reações de hipersensibilidade do tipo retardada (DTH) (Miller, 1979; Titus, 1981), o aparecimento de células secretoras de anticorpos (PFC - "plaque-forming cells") (Richman, 1978; Titus, 1981), a proliferação de linfócitos T em cultura (Richman, 1978; Titus, 1981) e a secreção de citocinas (Garside, 1995a; Garside, 1995b).

Mecanismos explicativos

Embora o mecanismo envolvido na indução de tolerância oral ainda não tenha sido esclarecido, podemos atualmente distinguir basicamente duas linhas explicativas que são contrárias: 1) a ocorrência da tolerância oral é devido a uma ausência de ativação imunológica de clones específicos através de deleção clonal, anergia, atuação de células T supressoras específicas, ou algum outro mecanismo imunossupressor específico; 2) a tolerância oral seria um estado ativo e dinâmico do sistema imune.

Apesar de as idéias associando a tolerância a uma inatividade serem as mais difundidas, há vários dados mostrando que a tolerância é um evento que depende da atividade de todo o sistema imune, como por exemplo:

- . A tolerância oral só pode ser estabelecida em animais imunocompetentes. Não se consegue induzir tolerância em camundongos neonatos, a não ser que os mesmos recebam, adotivamente, linfócitos de animais adultos (Bruce, 1987; Hanson, 1981).

. A tolerância oral pode ser transferida adotivamente para animais singênicos normais pela transferência de linfócitos T. Em artigos publicados nos anos 70 e 80 os linfócitos T CD8⁺ eram apontados como prováveis responsáveis pela tolerância oral (Hanson, 1979; Ngan, 1978), mas dados mais recentes indicam o envolvimento de linfócitos T CD4⁺ (Garside, 1995a; Garside, 1995b; Melamed, 1994) e de linfócitos T $\gamma\delta$ (Mengel, 1995).

. Drogas anti-mitóticas (hidroxiuréia, ciclofosfamida) aplicadas 24 horas após a ingestão do antígeno não impedem a tolerância oral. Inversamente, a administração destas drogas 24 horas antes da administração do antígeno impedem a tolerância oral. Isto mostra que o desencadeamento de um estado tolerogênico depende de células recém formadas, emergentes (Aroeira, 1993). Os tratamentos que destroem células pré-B (IvIg, anticorpos anti-Bp1) inibem o aparecimento da tolerância oral (Verdolin, 1996).

A segunda linha explicativa, onde a tolerância oral é um evento ativo e dinâmico do sistema imune, começou a ser delimitada a partir de 1974 quando Jerne (Jerne, 1974) chamou a atenção para o fato de que os anticorpos são capazes de reagir uns com os outros (através de determinantes que ele chamou idiotípicos) e sugeriu que esta conectividade interna é importante na operação do sistema imune. Assim, através de reações idiotipo-anti-idiotipo (isto é, anticorpo-anti-anticorpo), todos os anticorpos do organismo poderiam estar unidos em uma rede muito complexa. Por isto, estas idéias ficaram conhecidas como a Teoria da Rede Idiotípica (Vaz, 1993).

Esta conectividade idiotípica é uma forma fisiológica de *auto-reatividade*, uma demonstração de que nem sempre a reação de linfócitos e anticorpos com autocomponentes é destrutiva (Vaz, 1993).

Nesta rede de interações, a entrada de elementos novos, sejam eles internos (novos linfócitos) ou externos (antígenos) exige mudanças globais no estado das interações. Como todos os linfócitos estão ligados à mesma rede, o que ocorre com um dado linfócito "específico" pode, potencialmente, afetar todos os demais. Já foi demonstrado que, em infecções parasitárias (D'Imperio Lima, 1985; Lopes, 1987), a atividade "inespecífica" do sistema imune é superior à "resposta específica".

Na Teoria Clonal (que é a base da idéia de que a tolerância oral é devido à alguma forma de inativação de clones específicos: por deleção ou por imunossupressão), as respostas imunes específicas se devem à estimulação, pelo antígeno, de clones linfocitários relativamente raros no sistema. A grande maioria das células do sistema existe em ociosidade, em repouso. Na Teoria da Rede, a entrada do antígeno é comparável à entrada de um linfócito jovem recém saído da medula ou do timo. Ambos irão perturbar o sistema como um todo. Ou essa perturbação é assimilada de uma maneira fisiológica, distribuída pelos vários circuitos da rede inespecificamente (tolerância), ou ela será concentrada na ativação de poucos clones que chamamos de específicos

(imunização). Assim, tolerância e imunização são apenas formas globais do sistema lidar com as novidades que lhe são apresentadas.

Linfócitos novos e antígenos são, para o sistema imune, perturbações da mesma natureza. A familiaridade com que ambos conseguem se ligar aos componentes da rede é o que lhes confere um sentido imunológico. Um elemento novo, "estranho", sem sentido, é aquele que não interage. Isso pode ocorrer com antígenos que passam ilesos pelo organismo (Volkheimer, 1975) ou com linfócitos que morrem ao sair da medula (Freitas, 1981). Ambos desaparecem do corpo por lhes faltar sentido imunológico que os conecte na rede num processo chamado, por Vaz (Vaz, 1988), de "sobrevivência associativa".

Tal processo torna, por um lado, os elementos novos (internos e externos) sempre equivalentes; por outro lado, confere ao sistema imune a autonomia de selecionar suas conexões futuras segundo o padrão das que atualmente existem (Faria, 1989).

Fatores importantes na indução de tolerância oral

Muitos fatores podem condicionar a indução de tolerância oral. Podemos dividir os fatores sabidamente relevantes em três grupos: **a)** os fatores ligados aos animais; **b)** os pertinentes ao antígeno e **c)** os relacionados a variações de protocolo nas exposições digestivas ao antígeno.

a) Fatores ligados aos animais:

• Idade

A idade é de nosso particular interesse nesta dissertação e maiores referências sobre o assunto serão feitas na discussão.

A idade em que o animal contacta com antígenos por via digestiva é um fator que determina se haverá sensibilização ou tolerância a contatos posteriores com os mesmos antígenos. Strobel e Ferguson (Strobel, 1984b) mostraram que camundongos neonatos, com 1 ou 2 dias de vida, são refratários à indução de tolerância oral. Inversamente, nesse período, os animais tendem a se tornarem sensibilizados ("primados") pelos contatos digestivos com antígenos. A susceptibilidade à indução de tolerância oral aparece com 4 a 7 dias de vida, mas os níveis máximos de supressão são alcançados apenas na maturidade. Os mecanismos envolvidos nessa transição ainda não estão claros. Peng e colaboradores (Peng, 1989a) conseguiram restituir a capacidade de camundongos neonatos em desenvolver tolerância oral para a reação de DTH, mas não para produção de anticorpos, através da transferência passiva de esplenócitos de animais adultos normais. Este resultado sugere que camundongos neonatos dependem de um ^a maturidade do sistema imune para que haja a indução de tolerância oral.

Assim como ocorre com os camundongos neonatos, a susceptibilidade à indução de tolerância oral em camundongos também está comprometida, durante o outro extremo da vida, a senilidade. Alguns dados sugerem que a susceptibilidade à indução de tolerância oral se encontra diminuída ou totalmente abolida em animais idosos. Há demonstrações de que camundongos maduros (20 a 24 semanas de idade) ou senis (40 a 44 semanas) têm uma redução de susceptibilidade à tolerância oral (Faria, 1993; Rios, 1988; Vaz, 1997; Verdolin, 1993; Staples, 1969). Lahmann e colaboradores mostraram que camundongos B6D2F1 de 70 semanas de idade são refratários à indução de tolerância oral com 1 gavagem com 20 mg de Ova, mas a possibilidade de tornar esses animais tolerantes é recuperada pela transferência passiva de esplenócitos de animais jovens (8 semanas). Inversamente, a transferência de esplenócitos de animais senis para camundongos jovens diminui sua susceptibilidade à tolerância (Lahmann, 1992).

- Raça e linhagem

A tolerância oral foi mais amplamente estudada em roedores, mas já foi demonstrada em diferentes espécies animais, incluindo porcos, cães e o homem (Husby, 1994; Mowat, 1994). Em camundongos, a susceptibilidade à indução de tolerância oral depende da linhagem dos animais (Lamont, 1988; Mowat, Lamont, 1987; Stokes, 1983). Vaz e colaboradores, trabalhando com camundongos isogênicos de diversas raças, inclusive pares congênicos para o complexo H-2, demonstraram que essa susceptibilidade é dependente tanto de variações do MHC quanto de outras características do background genético das raças (Vaz, 1987).

- "status" imunológico

O *status* imunológico prévio do animal é outro fator que influencia a indução de tolerância oral. O efeito da ingestão do antígeno em animais já submetidos à imunização com o mesmo antígeno por via parenteral pode ser eficaz em induzir tolerância ao serem tomadas algumas providências tais como: aumentar a dose de antígeno e a frequência utilizada nas exposições digestivas, além de aproximar essas exposições do evento primário de imunização parenteral (Bloch, 1983; Conde, 1998; Lafont, 1982; Peng, 1989b; Saklayen, 1984).

b) Fatores pertinentes ao antígeno:

- Natureza

Exposições por via digestiva a antígenos de diferentes naturezas, como: proteínas solúveis (Hanson, 1977; Kagnoff, 1982; Kay, 1989), antígenos particulados (Andre, 1975; Kagnoff, 1978; Kagnoff, 1980; Sayegh, 1992) ou vírus e microorganismos (Bersani-Amado, 1990; Challacombe, 1980; Rubin, 1981; Stokes, 1979) podem resultar tanto em supressão quanto em potenciação da resposta imune.

Sabe-se que a tolerância oral é um fenômeno T-dependente e as tentativas de demonstrar esse fenômeno utilizando antígenos T-

independentes, não tiveram sucesso (Hanson, 1979; Titus, 1981). A tolerância oral pôde ser demonstrada com a utilização de diferentes proteínas heterólogas solúveis que são caracteristicamente antígenos T-dependentes (Hanson, 1977; Lanzavecchia, 1985). Em nosso trabalho, utilizamos a Ova pelas facilidades materiais e nosso bom conhecimento desse modelo experimental.

- Dose

A dose exata necessária para um efeito ótimo depende da proteína empregada. Com relação à Ova, uma hiporresponsividade máxima após a administração oral da Ova ocorre com doses entre 1 e 20 mg de proteína, mas as reações de hipersensibilidade retardada (DTH) podem ser igualmente inibidas por doses tão pequenas quanto 100 µg de ovalbumina (Ova), enquanto ao menos 5 a 10 mg são necessários para inibir a imunidade humoral (Mowat, 1998).

c) Fatores relacionados a variações de protocolo nas exposições digestivas ao antígeno:

- Frequência

O aumento da frequência de exposições orais favorece a expressão de tolerância oral medida pela supressão da produção de anticorpos e das reações de hipersensibilidade retardada (DTH) (Hanson, 1977; Saklayen, 1984). Saklayen e colaboradores propõe que a maneira mais efetiva de induzir tolerância oral é através de múltiplas exposições digestivas a pequenas doses de antígeno, que é justamente a situação mais similar à alimentação (Saklayen, 1984).

- O intervalo entre as exposições orais

As consequências imunológicas da administração oral do antígeno em animais normais também variam na dependência do intervalo entre as exposições antigênicas. Por exemplo: camundongos H-III ao receberem o antígeno por via oral em três ocasiões separadas por semanas, desenvolvem altos títulos de anticorpos anti-Ova no soro. Por outro lado, se os animais receberam as mesmas doses, ou mesmo doses superiores de Ova, porém, em dias consecutivos, eles não mais formam anticorpos no soro (Faria, 1989).

- Forma de administração

Stokes e colaboradores observaram, como resultado secundário, que, em camundongos CBA e SWR/J, a administração de 25 mg de Ova por via intragástrica durante 14 dias não é capaz de induzir tolerância, testada por hemaglutinação após a imunização intraperitoneal com Ova em CFA. No entanto, se a administração de Ova se der por ingestão voluntária das mesmas doses ao longo de 14 dias, os animais tornam-se tolerantes (Stokes, 1983).

Faria et al e Verdolin et al (Faria, 1993; Verdolin, 1993) demonstraram que *gavagens* (intubações gástricas) com Ovalbumina nos dias 0, 7 e 28 induzem significativa formação de anticorpos em camundongos H-III.

Entretanto, a *ingestão* da mesma quantidade de Ovalbumina nos mesmos dias levou à indução de tolerância oral.

A produção de um tolerógeno pela ingestão oral de antígeno

Em fevereiro de 1983, Strobel e colaboradores (Strobel, 1983) descreveram pela primeira vez na literatura a capacidade de o soro colhido de animais que ingeriram o antígeno uma hora antes induzir uma supressão da imunidade mediada por células (mas não da produção de anticorpos) em animais singênicos, quando transferido por via intraperitoneal. Como este soro de animais que receberam o antígeno por gavagem (intubação gástrica) parecia conter algum componente capaz de induzir tolerância, vários trabalhos foram realizados no intuito de se descobrir o que seria este componente tolerogênico.

A primeira hipótese levantada para explicar a indução de tolerância por esse mecanismo foi a presença de moléculas de Ova no soro destes animais. Realmente a absorção do soro tolerogênico com anticorpos anti-Ova ligados à Sepharose removeram tanto a imunoreatividade da Ova quanto a tolerogenicidade associada ao soro, confirmando que a supressão da imunidade mediada por células através do soro de camundongo gavado com Ova é devida à presença de Ova nesse soro (Bruce, 1986).

Entretanto, a injeção intraperitoneal do antígeno nativo ou desnaturado (ao invés de por gavagem), levando a um processamento sistêmico deste antígeno, não produz um tolerógeno no soro capaz de tolerizar um receptor singênico (Bruce, 1986). Também a administração parenteral de várias doses de Ova nativa (Strobel, 1983) ou desnaturada (Bruce, 1986) não resulta em tolerância. Estes resultados apontam para uma necessidade de processamento do antígeno na mucosa intestinal para que haja o aparecimento do tolerógeno (Bruce, 1986).

A geração do tolerógeno requer um intervalo e não tem relação direta com a concentração de Ova detectada por ELISA: o soro de camundongos colhido cinco minutos após a administração oral, já contém Ova imunoreativa, mas não induz tolerância em receptores singênicos (Peng, 1990).

Vários fatores podem estar envolvidos na conversão de Ova em uma forma tolerogênica. O antígeno, presente no soro após a gavagem, foi submetido à digestão proteolítica, absorção através do epitélio e tecidos subepiteliais do intestino além de ter sido exposto aos mecanismos de processamento antigênico incluindo o sistema reticuloendotelial (Bruce, 1986). No período de uma hora da administração oral de Ova, ela é de alguma forma modificada: por enzimas proteolíticas gastrointestinais, e/ou pela filtração através da membrana biológica (o epitélio intestinal), e/ou pelo processamento ativo de células epiteliais ou células apresentadoras de antígeno profissionais da mucosa ou do sistema imune sistêmico,

produzindo desta forma, um "tolerógeno" de Ova que é transferível (Furrie, 1994).

Várias evidências sugerem a participação de células linfóides no processamento e geração do tolerógeno.

Camundongos neonatos são incapazes de gerar o tolerógeno para o plasma (Peng, 1989a) e a imaturidade dos processos digestivos "pré-fechamento", além da imaturidade do próprio sistema imunológico, poderiam estar envolvidas neste processo.

Camundongos SCID (severe combined immunodeficient), que não possuem linfócitos T e B maduros funcionais, são incapazes de gerar o tolerógeno no plasma (Furrie, 1994). Com base nestes resultados, duas hipóteses podem ser propostas: 1) células B e/ou T estão diretamente envolvidas no "processamento" da Ova ingerida gerando uma forma tolerogênica da Ova; ou 2) estas mesmas células são um componente necessário ao desenvolvimento de um intestino normal que geraria a forma tolerogênica da Ova.

Uma outra evidência sugerindo um papel chave para o funcionamento do sistema imune na geração do tolerógeno foi obtido por Bruce e colaboradores (Bruce, 1987) que demonstraram que camundongos irradiados perdem a capacidade de gerar o tolerógeno, mas recuperam esta propriedade se reconstituídos com linfócitos de baço. Entretanto, o mesmo autor descreve que a irradiação danifica severamente a arquitetura da mucosa e que isto influenciou a capacidade de gerar um tolerógeno. Tanto estes resultados de Bruce e colaboradores quanto os de Furrie e colaboradores (Furrie, 1994) descritos acima fornecem evidências para a necessidade de células do sistema imune na geração do tolerógeno mas, estes resultados, não permitem uma distinção entre o papel de linfócitos no desenvolvimento normal do intestino e um papel mais direto na geração do tolerógeno (Furrie, 1994).

Camundongos de linhagens geneticamente refratárias à indução de tolerância oral à Ova (Balb/B {H-2b}) produzem quantidades normais do "tolerógeno" no soro, após a ingestão de Ova, que é capaz de tolerizar camundongos Balb/c (Mowat, 1987). Assim, a refratariedade à indução de tolerância oral de camundongos Balb/B não está relacionada a uma não produção de tolerógeno mas, talvez, a uma incapacidade de incorporação deste tolerógeno na fisiologia de seu sistema imune.

Ao que parece o camundongo receptor de soro contendo o tolerógeno necessita de ativação de células sensíveis a ciclofosfamida (uma droga que elimina células em ciclo mitótico) pois, após a administração desta droga, a transferência do soro de um doador gavado a uma hora com Ova, não mais induz tolerância nestes receptores tratados com ciclofosfamida (Strobel, 1983).

Assim, tanto na produção de um tolerógeno quanto em sua incorporação na indução de tolerância oral há a necessidade da presença de células do sistema imune direta e/ou indiretamente.

Recentemente, o tolerógeno derivado da Ova foi parcialmente caracterizado como fragmentos relativamente grandes, com 21 e 24 Kd

(Furrie, 1995). Esses fragmentos estão presentes no soro de camundongos Balb/c uma hora após a gavagem com Ova, mas estão ainda ausentes cinco minutos após a gavagem (Peng, 1990). O fato do tolerógeno já estar presente uma hora após a administração oral (enquanto a proteólise completa por enzimas intestinais leva aproximadamente 72 horas, *in vivo*), e a capacidade de se ligar a anticorpos policlonais anti-Ova (grande parte da molécula deve estar ainda preservada) sugere que pequenos peptídeos derivados da proteólise da Ova não participam na indução de tolerância neste modelo (Furrie, 1995).

Estes dados nos mostram que a tolerância a proteínas reflete a maneira com que o antígeno é processado no intestino. Podemos então supor que fatores que alterem a quantidade ou a qualidade fisicoquímica do antígeno absorvido podem ter repercussões nas respostas imunológicas a esse material. Entretanto não está bem determinado que tipo de modificação sofre o antígeno e onde ela é sofrida: se extracelularmente, por ação de enzimas proteolíticas, ou, intracelularmente, por algum tipo de processamento ou, ainda, por ambos processos.

Portanto, o que ocorrerá após a administração do antígeno parece depender, além da natureza do próprio antígeno, da forma e do contexto em que este é "processado" (intra e/ou extracelularmente) e "apresentado" (para outra célula e/ou para o sistema imune).

Acreditamos que a análise dos diversos fatores importantes na indução de tolerância oral nos fornece dados para melhor delinear os mecanismos envolvidos na sua indução/. Nesta dissertação, enfocamos o efeito da forma de administração do antígeno na indução de tolerância oral, sendo esta última avaliada por parâmetros humorais e celulares. Pretendemos analisar especialmente a importância da gradualidade de administração de antígeno na indução de tolerância oral já que esta é a condição natural para a entrada de novos materiais no organismo.

Objetivos

Objetivo geral

Nosso objetivo é analisar a influência da frequência e da gradualidade de administração de antígeno por via oral na indução do fenômeno da tolerância oral.

Objetivos específicos

1. Avaliar a influência da frequência e da gradualidade de administração oral de antígeno na indução de tolerância oral medida por dois diferentes parâmetros: produção de anticorpos específicos e reação de imunidade celular.
2. Avaliar a influência da frequência e da gradualidade de administração oral de antígeno na indução de tolerância oral em camundongos idosos.
3. Analisar a relação entre a relativa refratariedade de camundongos idosos à indução de tolerância oral e a geração do "tolerógeno" sérico normalmente presente em camundongos jovens depois da administração oral de antígeno.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados, neste trabalho, camundongos jovens (entre 8 e 10 semanas de idade), maduros (25 semanas) e senis (70 semanas), de ambos os sexos, da primeira geração (F1) do cruzamento das linhagens isogênicas C57BL/6j e DBA/2, denominados abreviadamente B6D2F1, criados no Biotério do Laboratório de Imunobiologia - ICB - UFMG.

Todos os animais foram mantidos com ração padrão para camundongos e água *ad libitum* em nosso Biotério.

Em todos os experimentos, o número de animais por grupo (n) variou entre 4 e 8, com uma média predominante de 7 camundongos.

Proteínas solúveis

Ovalbumina 3 ou 5 vezes cristalizada (Ova, albumina da clara de ovo, SIGMA Grades III ou V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi utilizada dissolvida em água destilada para ingestão voluntária pelos camundongos ou dissolvida em salina fisiológica (solução de NaCl a 0,9% em água bidestilada) para os tratamentos orais por gavagem e as imunizações parenterais. Para a ingestão voluntária pelos camundongos também foi utilizada uma solução de clara de ovo filtrada e diluída a 20% em água.

A Ova agregada após desnaturação térmica, utilizada nos ensaios de reação celular, foi preparada a partir de Ovalbumina 5 vezes cristalizada (Ova Grade V), submetida a um procedimento desnaturante muito semelhante ao descrito por Titus e Chiller (Titus, 1981):

Inicialmente, uma solução de Ova a 2% foi submetida ao aquecimento em banho maria por 5 minutos. Após seu resfriamento, a solução foi centrifugada a 5000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a Ova agregada precipitada foi ressuspensa em salina. Após quatro lavagens (centrifugação e ressuspensão em salina), o sobrenadante foi novamente desprezado e a Ova agregada, finalmente, ressuspensa num volume igual ao volume da solução inicial de Ova a 2%. Essa suspensão final foi assumida como contendo Ova desnaturada pelo calor a 2%.

Adjuvantes

Utilizamos 1 mg de hidróxido de alumínio adicionado a soluções contendo 10 μ g de Ova (Grade V) para realizar a imunização primária e posterior análise da produção de anticorpos específicos no soro.

O Adjuvante Completo de Freund (CFA - Complete Freund's Adjuvant - SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi empregado para realização de imunização subcutânea na base da cauda em experimentos com o objetivo de análise da reação celular e também os de análise de proliferação celular. O CFA foi utilizado numa emulsão de proporção 1:1 com uma solução de Ova (Grade V) a 5 mg/ml.

Administração oral do antígeno (pré-tratamento oral)

A Ova foi administrada oralmente de duas formas distintas: por gavagem ou por ingestão voluntária, como descrito abaixo.

Por gavagem (intubação gástrica)

Foi introduzida por via oral uma agulha de ponta redonda acoplada a uma seringa. A cada gavagem, 20 mg de Ova, diluída em 0,2 ml de salina fisiológica, foram dispensadas diretamente no estômago do camundongo. Ou seja, estes camundongos recebem de uma só vez 20 mg de Ova (*in bolus*). Foram administradas 1, 2, 3 ou 5 gavagens, dependendo do experimento, sendo apenas uma gavagem diária e em dias consecutivos.

Por ingestão voluntária

Foi utilizada uma solução de Ova a 4 mg/ml diluída em água como única fonte de líquido por um período de 24 horas (1 dia de ingestão voluntária), 72 horas (3 dias de ingestão voluntária) ou 120 horas (5 dias de ingestão voluntária). Como normalmente cada camundongo ingere cerca de 5 ml de água por dia, cada um recebe então cerca de 20 mg de Ova em um período de 24 horas. Assim, estes camundongos recebem o antígeno gradualmente ao nível do intestino.

Em uma única experiência, como indicado no texto, foi oferecido aos camundongos uma solução de clara de ovo diluída a 1:5 em água, como único líquido disponível durante 24 horas (1 dia de ingestão voluntária), 72 horas (3 dias de ingestão voluntária), 120 horas (5 dias de ingestão voluntária) ou 240 horas (10 dias de ingestão voluntária). Também estes camundongos recebem o antígeno de uma forma gradual ao nível do intestino.

Imunizações

Sete dias após o término do pré-tratamento oral (por gavagem ou por ingestão voluntária), os camundongos foram submetidos a dois tipos de imunizações: 1) com hidróxido de alumínio (adjuvante) mais o antígeno para a análise posterior da produção de anticorpos específicos no soro; ou 2) com Adjuvante Completo de Freund mais o antígeno para a análise posterior tanto de reação celular nas patas (após um segundo desafio com o antígeno) quanto para análise de proliferação celular em linfonodos inguinais (figura 1).

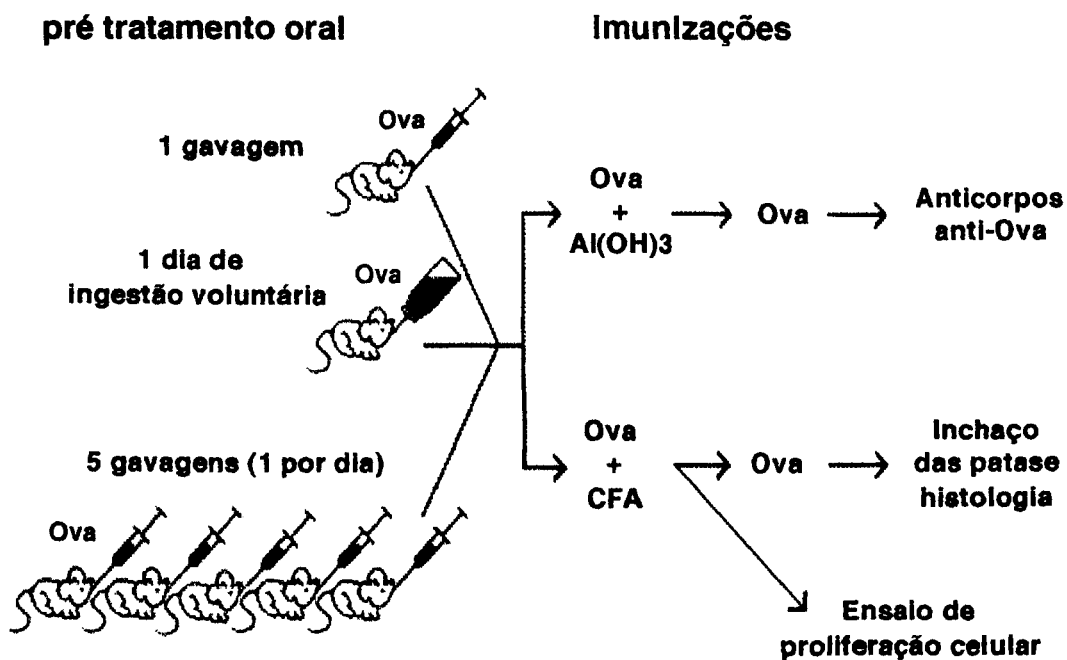


Figura 1 - Protocolo experimental básico. Os animais recebem diferentes pré-tratamentos orais e posteriormente são submetidos a dois tipos de imunizações: 1) com hidróxido de alumínio (adjuvante) mais o antígeno para a análise posterior da produção de anticorpos específicos no soro; ou 2) com Adjuvante Completo de Freund mais o antígeno para a análise posterior tanto de reação celular nas patas (após um segundo desafio com o antígeno) quanto para análise de proliferação celular em linfonodos inguinais.

Imunização com Hidróxido de Alumínio + Antígeno

As imunizações parenterais primárias foram realizadas utilizando-se, para cada animal, 200 μ l de solução contendo 10 μ g de Ova (Grade V), mais 1 mg de Hidróxido de Alumínio - como adjuvante, dissolvidos em salina fisiológica. Essa solução foi injetada diretamente na cavidade peritoneal do camundongo através de agulha estéril.

As imunizações parenterais secundárias foram realizadas utilizando-se, para cada animal, 200 μ l de solução contendo 10 μ g de Ova, dissolvidas em salina fisiológica, sem adjuvantes. Essa solução foi injetada diretamente na cavidade peritoneal do camundongo através de agulha estéril 14 dias após a imunização primária.

Imunização com Adjuvante Completo de Freund + Antígeno

Para a análise de reação celular na pata dos camundongos foi seguido um protocolo semelhante ao descrito por Titus e Chiller (Titus, 1981). Os camundongos são inicialmente imunizados subcutaneamente, na base da cauda, com 100 μ g de Ova emulsificada em Adjuvante Completo de Freund (CFA). Vinte e um dias depois cada camundongo recebe no coxim plantar da pata traseira esquerda uma injeção de 30 μ l de uma solução de Ova a 2%, agregada por desnaturação térmica (600 μ g de Ova por animal). Como controle inespecífico do teste, cada animal recebe no coxim plantar da pata traseira direita uma injeção de 30 μ l de salina fisiológica.

Para a análise da proliferação celular foi seguido um protocolo semelhante ao descrito por Barone (Barone, 1995). Cada camundongo recebe imunização subcutânea, na base da cauda, com 100 μ g de Ova emulsificada em CFA. Oito dias depois os linfonodos inguinais são removidos e as células colocadas em cultura como descrito a seguir.

Sangria e obtenção de soro

Sete dias após os camundongos dos experimentos para análise da produção de anticorpos específicos no soro receberem a imunização secundária, eles foram sangrados através do plexo axilar (após anestesia com éter) e então sacrificados por deslocamento cervical. Depois da coagulação, as amostras individuais foram centrifugadas a 3000 rpm por 7 minutos. O soro foi então retirado e diluído a 1:10 em salina fisiológica, em tubos individuais. As amostras foram congeladas a -20° C até a dosagem das imunoglobulinas específicas por ELISA.

Quantificação dos anticorpos específicos no soro

As imunoglobulinas anti-Ova foram dosadas no soro pelo ensaio E.L.I.S.A. (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) que, resumidamente, segue a metodologia descrita a seguir: microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4° C com 2 µg de Ova diluídos em 100 µl de tampão carbonato pH=9,6 (Coating buffer), por poço. Após 18 horas no mínimo, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA - solução salina-Tween) e incubadas, por uma hora, com 200 µl de uma solução de caseína a 0,25% em PBS (PBS-caseína), por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas a 37° C, por uma hora, com 100 µl, por poço, de seis diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5, diluições 1:100 a 1:3200). As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por uma hora a 37° C, com 100 µl, por poço, de uma solução de um soro poliespecífico de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongo marcado com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA). As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas com 100 µl, por poço, de tampão citrato (pH=5,0) contendo H₂O₂ e ortofenileno-diamino (OPD) para desenvolvimento de cor, por reação enzimaticamente catalizada. Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição, por poço, de 20 µl de H₂SO₄ a 2N. A absorbância do comprimento de onda de 492 nm foi aferida por leitor automático (*Model 450 Microplate Reader*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Cada placa recebeu também, além dos soros testes, um pool de soros de animais B6D2F1 imunizados com DNP_{2,7}Ova, denominado genericamente "soro anti-DNP-Ova padrão" (o mesmo pool de soros foi utilizado em todas as placas, de todos os experimentos), utilizado em 10 diluições seriadas, em duplicata, iniciando em 1:100 e com fator de diluição = 0,5 (diluições 1:100 a 1:51200). Os valores de absorbância desse soro padrão foram utilizados para controlar a sensibilidade do teste e possibilitar o cálculo de fatores de correção necessários para tornar os resultados de todas as placas comparáveis entre si.

Os valores de absorbância de cada soro teste, em cada uma das seis diluições seriadas, foram submetidos a um somatório. Esses somatórios foram multiplicados por 1000 e os resultados obtidos foram representados como valores codificados denominados de ELISA*.

Medida de reação celular *in vivo*

Para a análise da reação celular *in vivo* foi medido o inchaço das patas dos camundongos e também foi feita uma análise histológica dos tipos celulares presentes no tecido inflamado. Os camundongos receberam, como

descrito anteriormente, uma imunização na base da cauda e após 21 dias um desafio no coxim plantar da pata esquerda e injeção de salina na direita. Seis, 24, 48 e 72 horas após as injeções nas patas, o inchaço de ambas foi medido por paquímetro e expresso em milímetros. A diferença entre o inchaço da pata que recebeu Ova e a de salina, nos deu o valor real do aumento da pata de cada animal. Os resultados expressos nos gráficos foram obtidos pelo cálculo da média de cada grupo experimental (\pm erro padrão da média). Retiramos também as patas esquerda e direita de 2 camundongos por grupo ao se completar 6, 24, 48 e 72 horas após as injeções de antígeno e salina nas patas respectivas. Estas patas foram deixadas por dois dias em formol tamponado (concentração a 10%) e posteriormente foram incluídas em parafina, cortadas e coradas com Hematoxilina e Eosina.

Análise histológica da reação celular

As patas coletadas 6, 24, 48 e 72 horas após o desafio foram fixadas em formol tamponado e, posteriormente desidratadas em soluções crescentes de álcool usando um processador de tecidos automático Titertek. As patas foram incluídas em parafina e secções transversas de 4 μ m foram obtidas usando um micrótomo Spencer. Posteriormente, os cortes em lâmina foram corados com corantes específicos (Hematoxilina & Eosina), e as características morfológicas foram determinadas usando microscópio Olympus.

Ensaio de Proliferação Celular (reação celular *in vitro*)

Para a análise da proliferação celular cada camundongo foi imunizado na base da cauda como descrito anteriormente e, oito dias depois, os linfonodos inguinais foram removidos em ambiente aséptico e as suspensões celulares obtidas de cada grupo experimental foram colocadas em RPMI completo (RPMI 1640 medium - Gibco BRL - suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de l-glutamina, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 25 mM HEPES, 100 Unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de fungizona e 5-10% de soro fetal bovino inativado). As células foram então aliqüotadas em triplicata em placas de 96 poços (Falcon; Lincoln Park, NJ). Foram colocados 100 μ l/poço da suspensão de células na concentração de 5×10^6 células/ml. As células foram então incubadas, com 100 μ l/poço de solução de Ova a 1 mg/ml, em estufa a 37° C, 5% de CO₂, por 48 horas. Após estes 2 dias as células foram então incubadas por cerca de 18 horas com 1 μ Ci de timidina tritiada. As células foram então aspiradas através do "cell harvester" com um papel de filtro. A radioatividade beta foi determinada através de um contador de radiação beta.

Como controle negativo as células foram incubadas somente com meio e como controle positivo com ConA (Concanavalina A - SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os resultados foram expressos como a média aritmética da contagem em cpm \pm o erro padrão das culturas em triplicata, após a subtração dos valores obtidos com os controles negativos.

Transferência de soro para análise da produção ou não de tolerógeno pelo doador e incorporação ou não de tolerógeno pelo receptor

Camundongos de 8 e 70 semanas foram utilizados como doadores e receptores. Camundongos doadores receberam, por via intragástrica, 0,2 ml de solução contendo 20 mg de Ova ou 0,2 ml de salina. Uma hora após a gavagem, os animais foram sangrados através do plexo axilar (após anestesia com éter) e então sacrificados por deslocamento cervical. Depois da coagulação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 7 minutos. O soro foi coletado em pool para cada grupo experimental. O soro foi transferido então para camundongos receptores através de injeção intraperitoneal (ip) de 1 ml de soro dos doadores/ animal receptor.

Sete dias após a transferência com o soro, os animais receptores foram imunizados subcutaneamente, na base da cauda, com 100 μ g de Ova emulsificada em Adjuvante Completo de Freund (CFA). Vinte e um dias depois cada camundongo recebeu no coxim plantar da pata traseira esquerda uma injeção de 30 μ l de uma solução de Ova a 2%, agregada por desnaturação térmica (600 μ g de Ova por animal). Como controle inespecífico do teste, cada animal recebeu no coxim plantar da pata traseira direita uma injeção de 30 μ l de salina fisiológica.

Vinte e quatro, 48 e 72 horas após as injeções nas patas, o inchaço de ambas foi medido por paquímetro e expresso em milímetros. A diferença entre o inchaço da pata que recebeu Ova e a de salina, nos deu o valor real do aumento da pata de cada animal. Os resultados expressos nos gráficos foram obtidos pelo cálculo da média de cada grupo experimental (\pm erro padrão da média).

Análise estatística

Os dados numéricos dos parâmetros medidos nos experimentos (ELISA*, incremento da pata ou c.p.m.) foram utilizados para se analisar a significância de diferenças entre os grupos pelo teste-t de Student bicaudal.

Resultados

Análise do efeito da alteração na frequência e gradualidade de administração oral do antígeno na produção de anticorpos específicos

Geralmente encontrávamos nos experimentos do laboratório um ou outro camundongo que não chegava a ser tolerizado pelo protocolo de indução de tolerância oral. Como não sabíamos ao certo a porcentagem de camundongos que realmente se tornava tolerizante, realizamos o protocolo padrão do laboratório (uma única gavagem com 20 mg de Ova como pré-tratamento oral) em 16 animais. Quando comparados aos animais controle (pré-tratados somente com salina) somente 10 dos camundongos que receberam o pré-tratamento com Ova por gavagem ficaram realmente tolerantes (figura 2). Assim 37,5 % dos camundongos não se tornava tolerante por este protocolo.

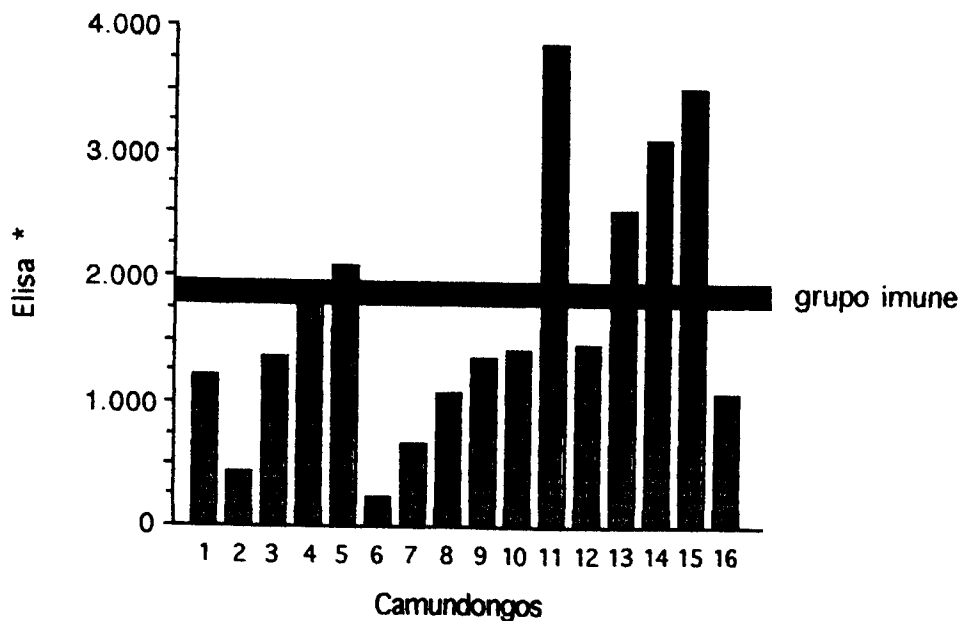


Figura 2 - Efeito de pré-tratamento oral por gavagem em camundongos jovens sobre a produção de anticorpos anti-Ova. Camundongos B6D2F1, de 6 a 8 semanas de idade, foram pré-tratados com uma única gavagem contendo apenas salina (controle) ou 20 mg de Ova em 0,2 ml de salina. Sete dias após este pré-tratamento, todos os animais foram imunizados intraperitonealmente com 10 μ g de Ova mais 1 mg de hidróxido de alumínio (primária). Quatorze dias após a primária e sete dias antes da sangria, os animais receberam nova imunização intraperitoneal contendo somente 10 μ g de Ova (secundária). Os anticorpos totais anti-Ova foram medidos por ELISA. A barra verde corresponde à média \pm desvio padrão da produção de anticorpos dos camundongos que receberam somente salina como pré-tratamento oral.

Uma vez que somos tolerantes aos inúmeros componentes potencialmente imunogênicos de nossa dieta, uma mimetização da forma de ingestão destes antígenos deve favorecer a indução de tolerância oral. Pelo menos dois fatores podem estar relacionados a este processo natural facilitando uma indução de tolerância: a frequência e a gradualidade de ingestão.

Se administramos o antígeno como pré-tratamento oral de uma forma gradual (ingestão voluntária) ao invés de *in bolus* como acontece com a gavagem, 100 % dos camundongos ficam tolerantes (figura 3). A administração gradual do antígeno mostrou-se muito mais eficiente na indução de tolerância oral que uma administração *in bolus*.

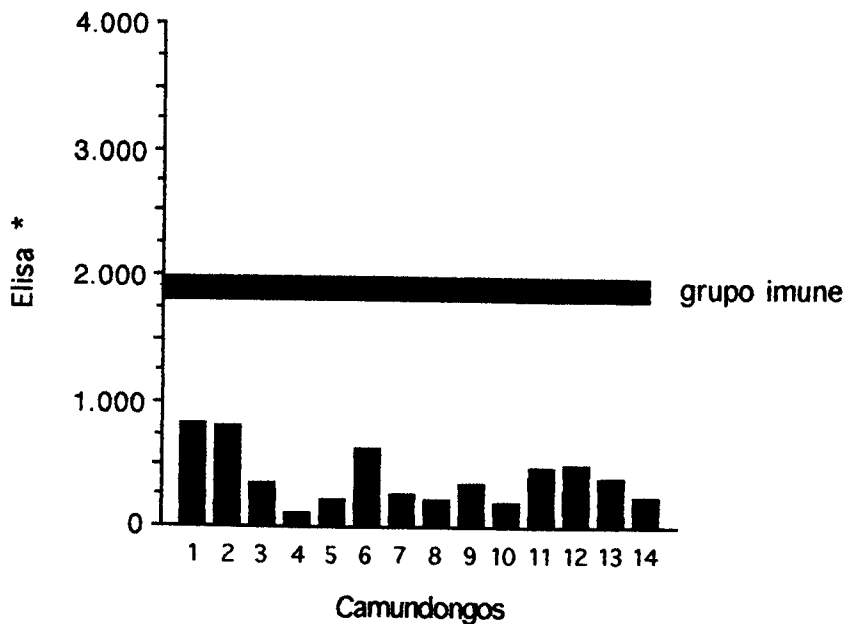


Figura 3 - Efeito de pré-tratamento oral por ingestão voluntária em camundongos jovens sobre a produção de anticorpos anti-Ova. Camundongos B6D2F1, de 6 a 8 semanas de idade, receberam água (controles) ou solução contendo 4 mg/ml de Ova como única fonte de líquido por um período de 24 horas como pré-tratamento oral. Sete dias após este pré-tratamento, todos os animais foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de Ova mais 1 mg de hidróxido de alumínio (primária). Quatorze dias após a primária e sete dias antes da sangria, os animais receberam nova imunização intraperitoneal contendo somente 10 µg de Ova. Os anticorpos totais anti-Ova foram medidos por ELISA. A barra verde corresponde à média ± desvio padrão da produção de anticorpos dos camundongos controle.

Se excluirmos os camundongos que não ficaram tolerantes com o protocolo mostrado na **figura 2** e compararmos então somente os camundongos tolerantes por gavagem com os camundongos tolerantes por ingestão voluntária (**figura 3**), a diferença entre estes dois pré-tratamentos orais é ainda estatisticamente significativa (**figura 4**). Então, além da administração gradual ser mais eficiente na indução de tolerância oral, a tolerância induzida nestes animais é significativamente diferente da induzida com a administração *in bolus* da mesma quantidade de antígeno.

Por outro lado, se aumentarmos a frequência de administração do antígeno não observamos diferenças significativas quanto à produção de anticorpos entre os animais tolerantes por uma gavagem ou tolerantes por cinco gavagens. Além disto, este aumento da frequência não possui a mesma eficiência da administração gradual na indução de tolerância oral (**figura 4**).

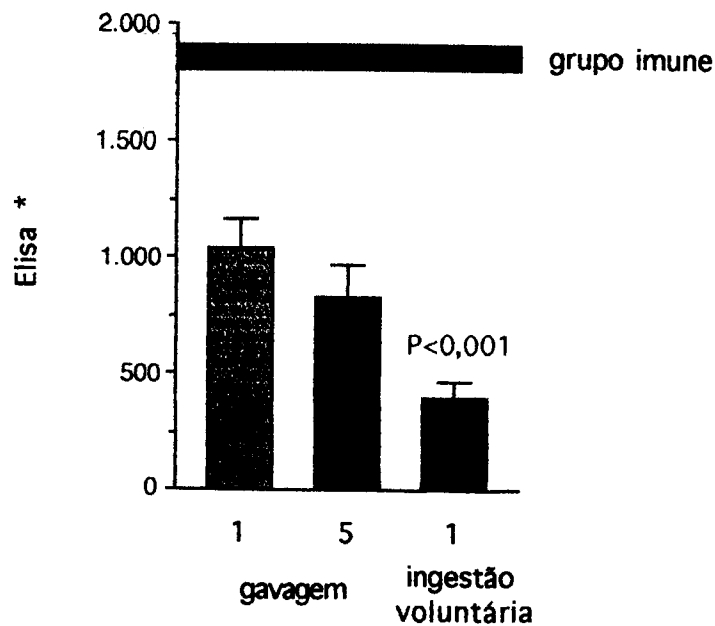


Figura 4 - Efeito do aumento da frequência e da gradualidade de administração oral do antígeno na indução de tolerância oral em camundongos jovens sobre a produção de anticorpos anti-Ova. Camundongos B6D2F1, de 6 a 8 semanas de idade, receberam Ova como pré-tratamento oral por uma gavagem, cinco gavagens ou um dia de ingestão voluntária. Sete dias após este pré-tratamento, todos os animais foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de Ova mais 1 mg de hidróxido de alumínio (primária). Quatorze dias após a primária e sete dias antes da sangria, os animais receberam nova imunização intraperitoneal contendo somente 10 µg de Ova. Os anticorpos totais anti-Ova foram medidos por ELISA. Os camundongos não tolerantes, com os pré-tratamentos contendo Ova, foram excluídos. A barra verde corresponde à média ± desvio padrão da produção de anticorpos dos camundongos que receberam somente salina como pré-tratamento oral (uma gavagem).

Análise do efeito da alteração na frequência e gradualidade de administração oral do antígeno nas reações de imunidade celular *in vivo* e *in vitro*

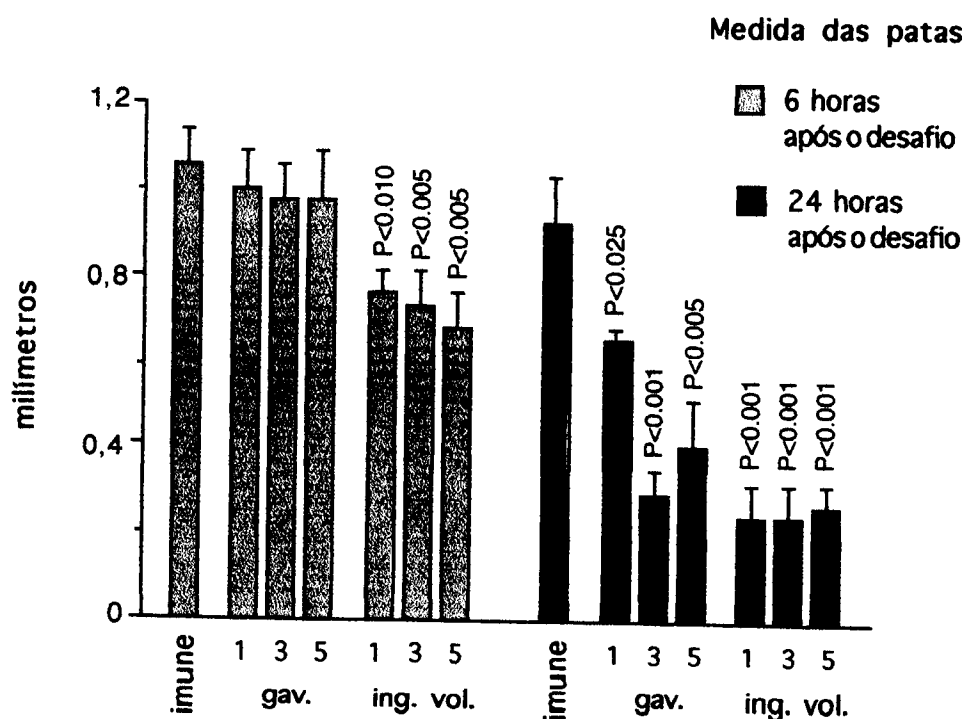
Além da análise da produção de anticorpos após as alterações na frequência e gradualidade de administração oral do antígeno, realizamos análise da imunidade celular *in vivo* e *in vitro*.

Para a análise da imunidade celular *in vivo*, os camundongos receberam, após os pré-tratamentos orais contendo Ova ou salina (controles), imunização contendo Ova emulsificada em CFA na base da cauda e, após 21 dias, Ova desnaturada ou salina nos coxins plantares das patas traseiras esquerda e direita respectivamente. As patas foram medidas 6, 24, 48 e 72 horas após o desafio nos coxins plantares. Os valores obtidos das patas injetadas somente com salina foram subtraídos dos valores obtidos das patas injetadas com a Ova desnaturada fornecendo o valor do inchaço causado pela presença do antígeno.

Seis horas após o desafio nas patas, todos os camundongos apresentaram inchaço. Entretanto os camundongos que receberam pré-tratamento oral do antígeno por ingestão voluntária apresentaram inchaço significativamente menor que os camundongos que receberam o pré-tratamento oral por gavagem, contendo salina ou Ova (**figura 5**). Esta menor reação celular *in vivo* com a ingestão voluntária, novamente confirma que a administração gradual de antígeno é mais eficaz que a administração *in bolus* em causar supressão.

Com 24 horas após o desafio, todos os camundongos que receberam um pré-tratamento oral contendo antígeno, apresentaram uma redução do inchaço enquanto que os camundongos que não receberam o antígeno no pré-tratamento (controles imune), continuaram quantitativamente com o mesmo inchaço observado após 6 horas (**figura 5**). A diminuição no inchaço é muito mais acentuada nos camundongos que receberam uma frequência maior de administração do antígeno ou os que receberam uma administração gradual quando comparados com aqueles que receberam apenas uma gavagem com o antígeno (**figura 5**).

Quarenta e oito e 72 horas após o desafio, todos os camundongos (inclusive os imunes) praticamente já não apresentavam mais inchaço (dados não mostrados).



neg. 45

Figura 5 - Reação de imunidade celular *in vivo* em camundongos jovens que receberam diferentes pré-tratamentos orais. Camundongos B6D2F1, de 7 a 10 semanas de idade, receberam Ova como pré-tratamento oral por uma, três ou cinco gavagens ou alternativamente um, três ou cinco dias de ingestão voluntária. Sete dias após o pré-tratamento oral, os animais foram imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μ g de Ova emulsificada em CFA. Após 21 dias, os animais receberam injeções de 30 μ l de uma solução de Ova a 2% agregada por desnaturação térmica (600 μ g de Ova por animal) no coxim plantar da pata traseira esquerda. No coxim plantar da pata traseira direita cada camundongo recebeu uma injeção de 30 μ l de salina. O inchaço de ambas as patas foi medido por paquímetro 6 e 24 horas após as injeções nos coxins plantares. O inchaço causado pela presença do antígeno foi obtido pela subtração da medida da pata esquerda pela direita e expresso em milímetros.

Seis, 24, 48 e 72 horas após o desafio, as patas de dois camundongos por grupo foram retiradas e fixadas em formol para análise histológica. Após dois dias, as patas foram incluídas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina.

Quanto aos tipos celulares presentes na inflamação das patas, a maioria constituía-se de eosinófilos. Apenas alguns raros linfócitos e macrófagos foram visualizados. Embora os diferentes grupos tenham recebido protocolos

distintos, não houve diferença qualitativa entre as lâminas examinadas. As **figuras 6 e 7** mostram fotos do infiltrado inflamatório das patas de camundongos imunes e tolerantes (por uma ingestão voluntária) respectivamente, 6 horas após o desafio. Ambas apresentam a mesma predominância de eosinófilos (**figuras 6 e 7**). Todas as patas analisadas apresentaram morfologia semelhante, com modificações apenas quantitativas (dados não mostrados).

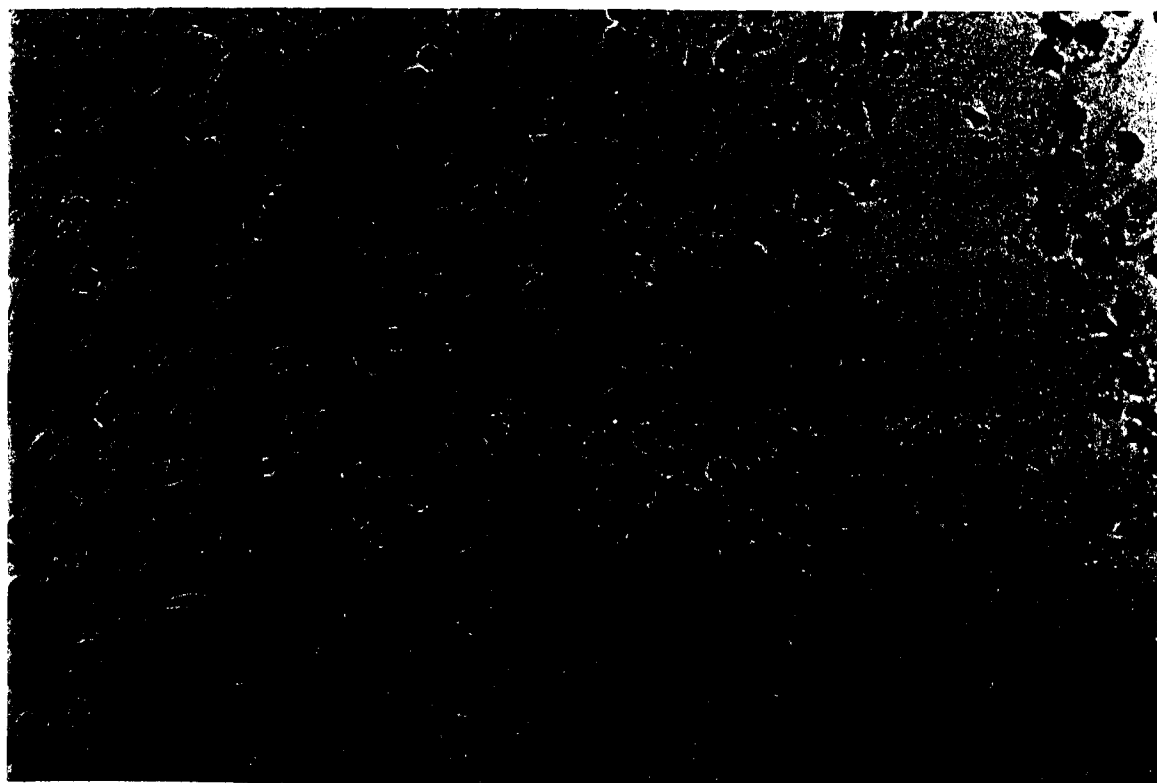


Figura 6 - Foto do infiltrado inflamatório do coxim plantar de camundongos imune à Ova, 6 horas após o desafio. Camundongos B6D2F1, de 7 a 10 semanas de idade foram imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μg de Ova emulsificada em CFA. Após 21 dias, os animais receberam injeções de 30 μl de uma solução de Ova a 2% agregada por desnaturação térmica (600 μg de Ova por animal) no coxim plantar da pata traseira esquerda. No coxim plantar da pata traseira direita, cada camundongo recebeu uma injeção de 30 μl de salina. As patas foram retiradas 6 horas após as injeções nos coxins plantares, fixadas em formol tamponado, desidratadas em soluções crescentes de álcool e incluídas em parafina. Secções trasnversas de 4 μm foram obtidas e os cortes em lâmina foram corados com HE. Aumento de 132 X.

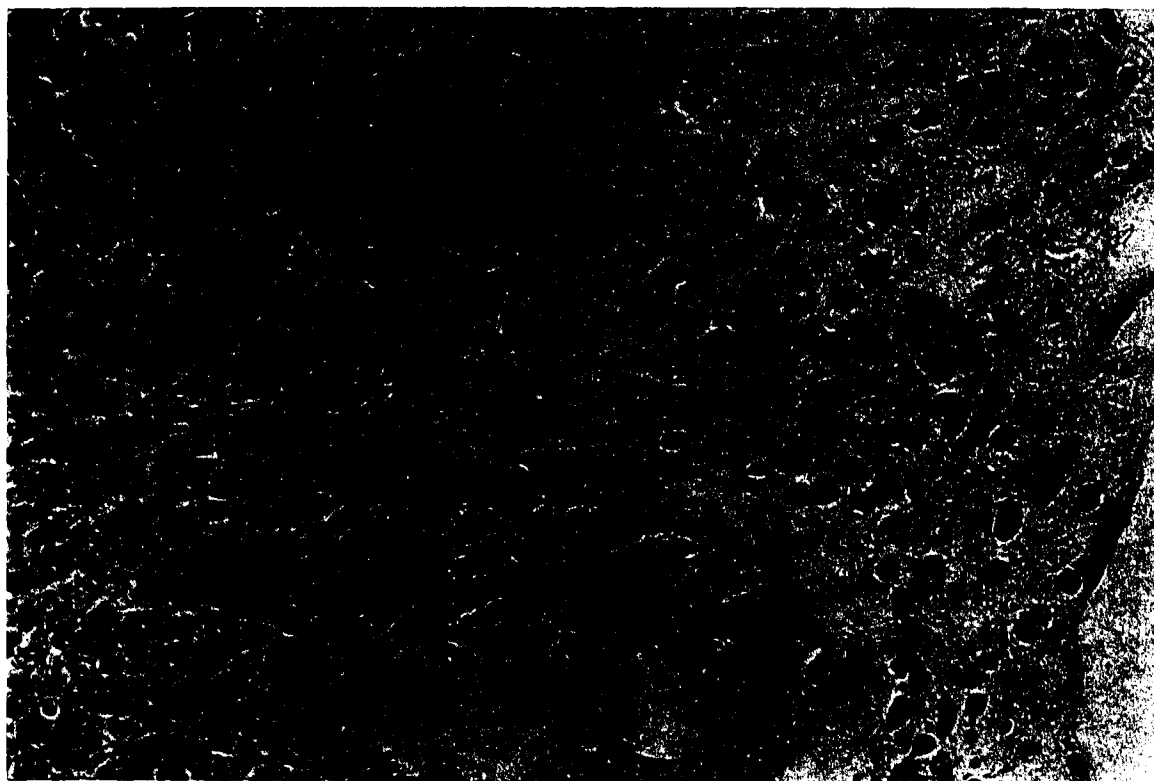


Figura 7 - Foto do infiltrado inflamatório do coxim plantar de camundongos tolerantes à Ova, 6 horas após o desafio. Camundongos B6D2F1, de 7 a 10 semanas de idade, receberam Ova como pré-tratamento oral, por um dia de ingestão voluntária. Sete dias após o pré-tratamento oral os animais foram imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μg de Ova emulsificada em CFA. Após 21 dias, os animais receberam injeções de 30 μl de uma solução de Ova a 2% agregada por desnaturação térmica (600 μg de Ova por animal) no coxim plantar da pata traseira esquerda. No coxim plantar da pata traseira direita cada camundongo recebeu uma injeção de 30 μl de salina. As patas foram retiradas 6 horas após as injeções nos coxins plantares, fixadas em formol tamponado, desidratadas em soluções crescentes de álcool e incluídas em parafina. Secções trasnversas de 4 μm foram obtidas e os cortes em lâmina foram corados com HE. Aumento de 132 X.

Além da análise da reação de imunidade celular *in vivo*, realizamos uma análise da reação celular *in vitro* através de ensaio de proliferação. Os animais receberam os diferentes pré-tratamentos orais, 7 dias depois foram imunizados com Ova emulsificada em CFA na base da cauda e, após 8 dias, os linfonodos inguinais foram removidos e as células incubadas com solução de Ova a 1 mg/ml. Após 2 dias as células foram então incubadas por cerca de 18 horas com timidina tritiada e a radioatividade beta foi determinada através de um contador de radiação beta.

Todos os camundongos que receberam um pré-tratamento contendo Ova, apresentaram menor proliferação celular na presença de 1 mg/ml de Ova que os que receberam pré-tratamento com salina. Entretanto, o aumento na frequência e na gradualidade de administração oral do antígeno produziu uma supressão da proliferação celular mais acentuada que aquela produzida

pela administração de uma única gavagem (figura 8). Na análise do ensaio de proliferação, todos os camundongos tratados com Ova por via oral em todos os protocolos tornaram-se tolerantes mostrando que, em comparação com a análise de produção de anticorpos, a análise de reação de imunidade celular é mais sensível na detecção de tolerância.

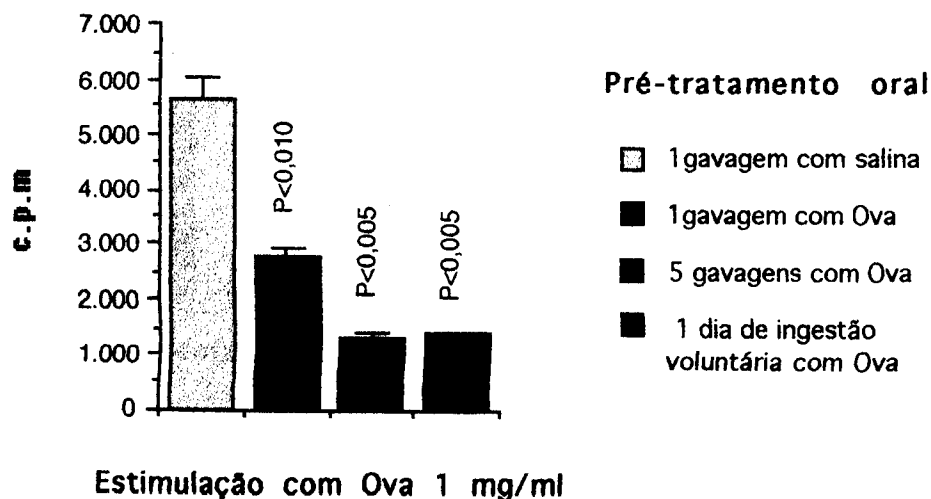


Figura 8 - Reação de imunidade celular *in vitro* de linfonodo inguinal de camundongos jovens que receberam diferentes pré-tratamentos orais. Camundongos B6D2F1 de 6 a 8 semanas de idade receberam Ova como pré-tratamento oral por gavagem ou ingestão voluntária. Sete dias após o pré-tratamento oral, os animais foram imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μ g de Ova emulsificada em CFA. Após 8 dias, os linfonodos inguinais foram coletados em ambiente aséptico e as suspensões celulares obtidas de cada grupo experimental incubadas com solução de Ova 1 mg/ml por 48 horas. Após estes 2 dias, as células foram então incubadas por cerca de 18 horas com timidina e a radioatividade incorporada foi medida em contador de radiação beta. Os resultados foram expressos como a média aritmética da contagem em cpm \pm erro padrão das culturas em triplicata, após a subtração dos valores obtidos com os controles negativos (incubação das células sem antígeno). Valor basal: 2.642 ± 0.277 .

Análise do efeito da alteração na frequência e gradualidade de administração oral do antígeno na indução de tolerância oral em camundongos idosos

Com o envelhecimento, observamos uma diminuição na susceptibilidade à imunização e à indução de tolerância oral. Camundongos com 25 ou 70 semanas de idade que recebem como pré-tratamento oral uma gavagem com 20 mg de Ova não apresentam supressão significativa na produção de anticorpos quando comparados com o grupo controle (figura 9).

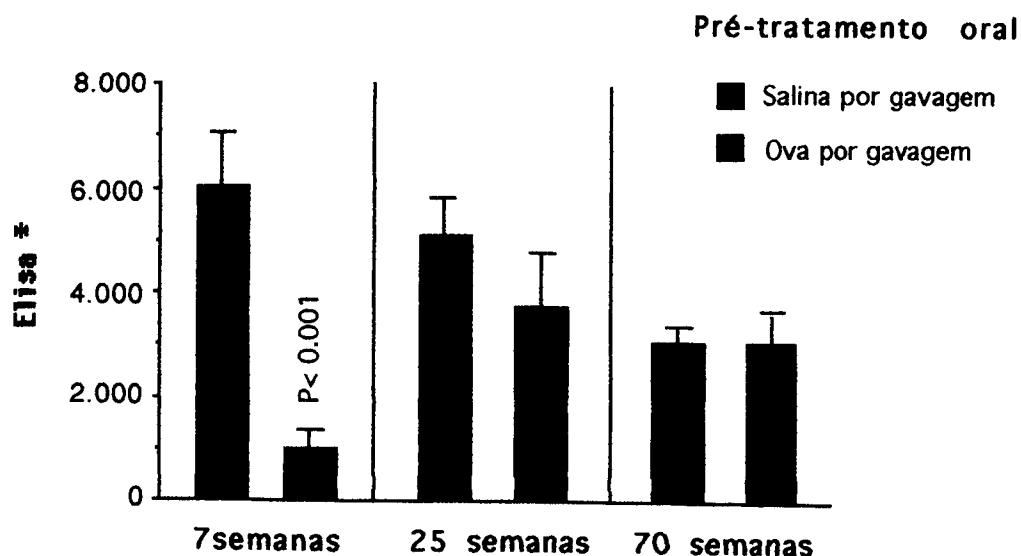


Figura 9 - Indução de tolerância oral em camundongos de diferentes idades. Camundongos B6D2F1 de 7, 25 e 72 semanas de idade receberam uma gavagem de 20 mg de Ova como pré-tratamento oral. Sete dias após este pré-tratamento, todos os animais foram imunizados intraperitonealmente com 10 μ g de Ova mais 1 mg de hidróxido de alumínio (primária). Quatorze dias após a primária e sete dias antes da sangria, os animais receberam nova imunização intraperitoneal contendo somente 10 μ g de Ova. Os anticorpos totais anti-Ova foram medidos por ELISA. Fonte: Faria, 1998 a e b.

Como nossos resultados anteriores mostram que a administração gradual ou maior frequência do antígeno são mais eficazes na indução de tolerância oral que uma administração *in bolus*, talvez a alteração na forma de administração do antígeno em camundongos idosos facilitasse a indução de tolerância oral.

Realmente constatamos que a administração gradual de antígeno é capaz de induzir tolerância oral em camundongos idosos. Entretanto, qualquer aumento na frequência de administração oral do antígeno não interferiu na eficácia de indução de tolerância oral medida enquanto supressão da produção de anticorpos (figura 10).

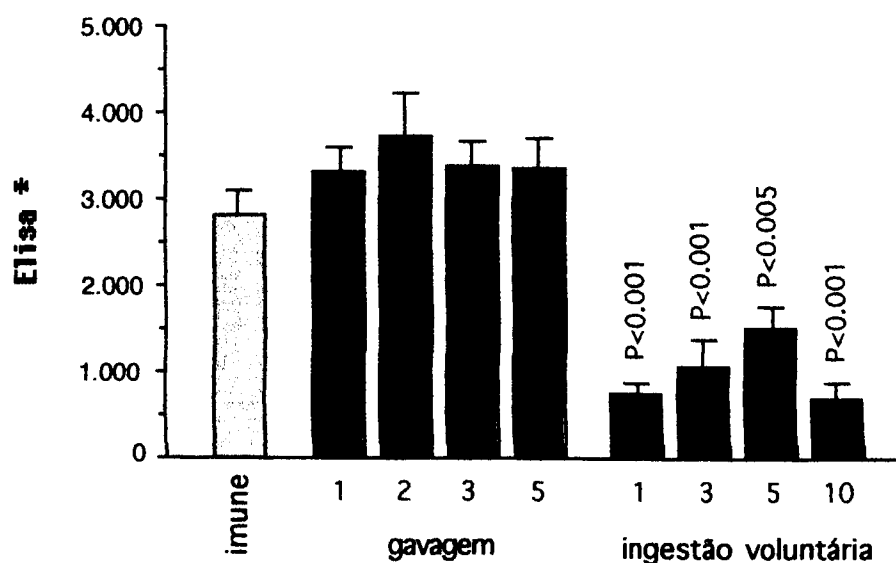


Figura 10 - Efeito do aumento da frequência e da gradualidade de administração oral do antígeno na indução de tolerância oral medida pela produção de anticorpos anti-Ova em camundongos idosos. Camundongos B6D2F1 de 65 a 72 semanas de idade receberam Ova como pré-tratamento oral por 1, 2, 3 ou 5 gavagens ou 1, 3, 5 ou 10 dias de ingestão voluntária de solução contendo Ova. Sete dias após o pré-tratamento, todos os animais foram imunizados intraperitonealmente com 10 μ g de Ova mais 1 mg de hidróxido de alumínio (primária). Quatorze dias após a primária e sete dias antes da sangria, os animais receberam nova imunização intraperitoneal contendo somente 10 μ g de Ova. Os anticorpos totais anti-Ova foram medidos por ELISA.

Uma vez que a reação de imunidade celular é mais sensível para a detecção da indução de tolerância, talvez o aumento da frequência de administração do antígeno levasse a uma supressão na reação celular, não observada na produção de anticorpos.

O ensaio de proliferação celular em camundongos idosos que receberam diferentes pré-tratamentos por via oral antes da imunização parenteral revela que o aumento tanto na gradualidade quanto na frequência da administração oral do antígeno são capazes de aumentar a eficácia da indução de tolerância oral (figura 11).

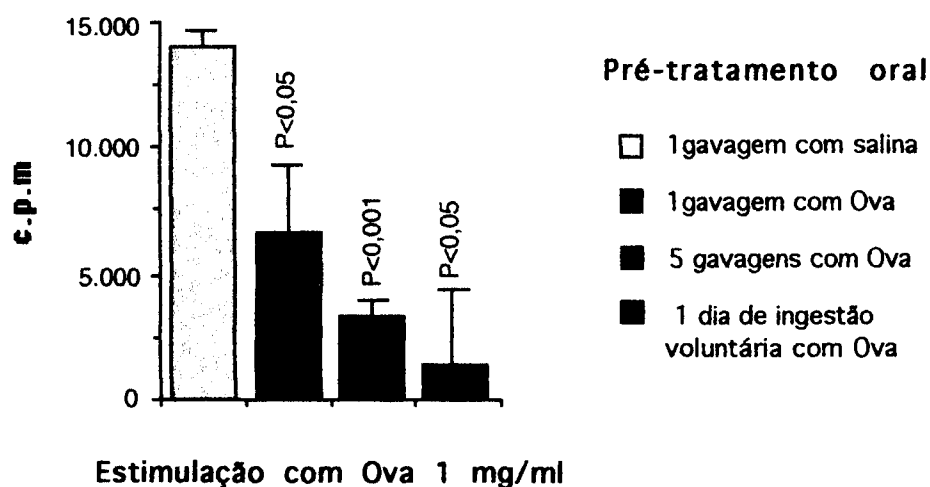


Figura 11 - Reação de imunidade celular *in vitro* de linfonodo inguinal de camundongos idosos que receberam diferentes pré-tratamentos orais. Camundongos B6D2F1 de 70 a 76 semanas de idade receberam Ova como pré-tratamento oral por gavagem ou ingestão voluntária. Sete dias após o pré-tratamento oral, os animais foram imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μ g de Ova emulsificada em CFA. Após 8 dias, os linfonodos inguinais foram coletados em ambiente aséptico e as suspensões celulares obtidas de cada grupo experimental incubadas com solução de Ova 1 mg/ml por 48 horas. Após estes 2 dias, as células foram então incubadas por cerca de 18 horas com timidina tritiada e a radioatividade incorporada foi medida por contador de radiação beta. Os resultados foram expressos como a média aritmética da contagem em cpm \pm erro padrão das culturas em triplicata, após a subtração dos valores obtidos com os controles negativos (incubação das células sem antígeno). Valor basal: 8.977 ± 1.243 .

Análise da relação entre a menor susceptibilidade à indução de tolerância oral de camundongos idosos e a geração de um tolerógeno sérico após administração oral do antígeno

Experiências de grupos escoceses e ingleses demonstraram em camundongos jovens, que a transferência de soro colhido 1 hora após administração de Ova por via intragástrica, para receptores isogênicos normais (jovens), é capaz de induzir tolerância para a reação de imunidade celular (Strobel, 1983). Assim, a passagem do antígeno através do intestino possibilita a formação de um componente capaz de transferir tolerância que foi denominado "tolerógeno". A figura 12 mostra um esquema do protocolo utilizado para esta transferência de tolerância. A execução deste protocolo por nós também levou à indução de tolerância (figura 14 - barras amarela e vermelha).

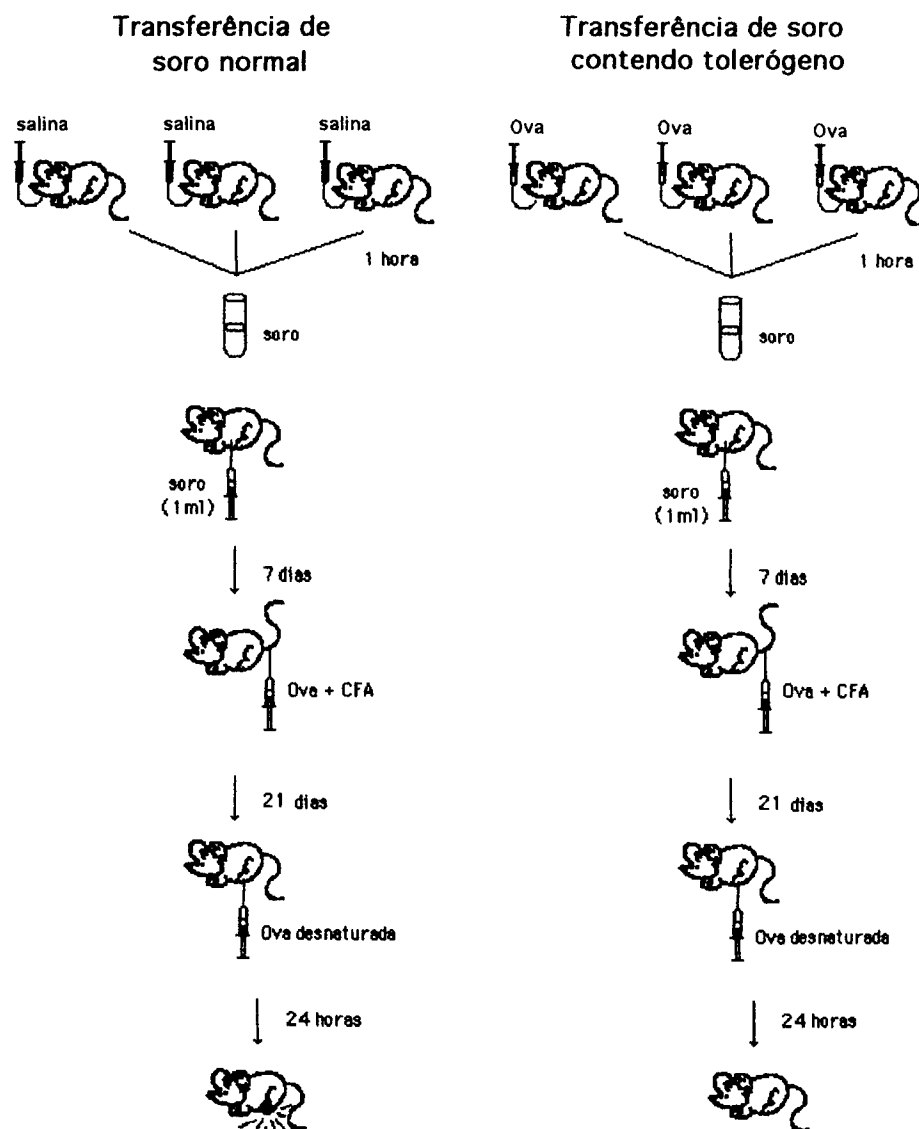


Figura 12 - Protocolo de indução de tolerância por transferência de soro contendo tolerógeno em camundongos jovens. Camundongos doadores recebem por gavagem uma administração de salina ou 20 mg de Ova e após 1 hora são sangrados. Os camundongos receptores recebem 1 ml de soro dos doadores tratados com salina ou Ova por gavagem e após 7 dias, são imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μ g de Ova emulsificada em CFA. Após 21 dias, os animais recebem injeções de 30 μ l de solução de Ova a 2% agregada por desnaturação térmica (600 μ g de Ova por animal) no coxim plantar da pata traseira esquerda. No coxim plantar da pata traseira direita, cada camundongo recebe uma injeção de 30 μ l de salina. O inchaço de ambas as patas é medido por paquímetro 24 horas após as injeções nos coxins plantares. Os camundongos que receberam soro de doadores tratados com Ova por gavagem apresentam inchaço significativamente menor que os que receberam soro normal.

Uma das hipóteses explicativas para a diminuição da susceptibilidade à indução de tolerância em camundongos idosos poderia ser sua incapacidade em processar adequadamente o antígeno no intestino e, portanto, gerar o tolerógeno circulante. Esta hipótese privilegia a idéia de que a principal alteração ocorrida durante envelhecimento ocorreria a nível da absorção no intestino e no tecido linfóide associado a este sítio.

Para testar tal hipótese, analisamos o efeito da administração de soro de animais jovens que receberam Ova por gavagem na reação de imunidade celular de camundongos idosos. Para isso, camundongos idosos receberam uma injeção intraperitoneal de soro de camundongos jovens tratados com salina (**figura 13** - barra amarela) ou 20 mg de Ova por gavagem (**figura 13** - barra vermelha). Como controle, camundongos idosos receberam injeção intraperitoneal de soro normal de animais idosos (**figura 13** - barra verde) ou soro de camundongos idosos que tenham recebido gavagem com 20 mg de Ova 1 hora antes (**figura 13** - barra azul). Os resultados desta **figura 13** nos mostram que a transferência de soro de camundongos jovens, tratados com Ova por gavagem, para camundongos idosos não é capaz de induzir tolerância nos últimos.

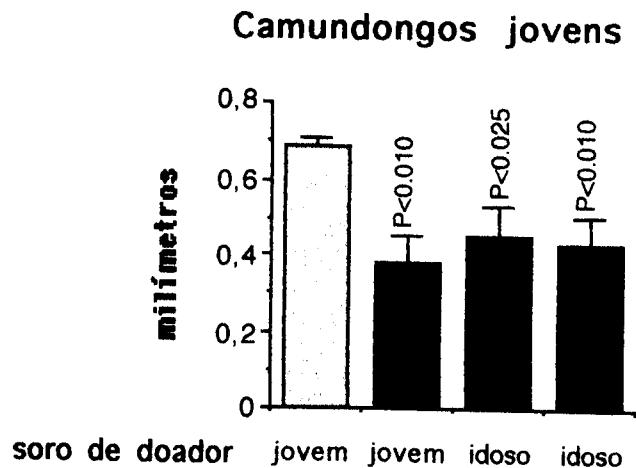


Figura 13 - Reação de imunidade celular *in vivo* em camundongos idosos após transferência de soro de camundongos jovens ou idosos gavados com salina ou Ova. Camundongos B6D2F1 de 89 a 90 semanas de idade receberam injeção i.p. de 1 ml de soro (pool) de camundongos doadores. Os doadores são camundongos B6D2F1 jovens (6 a 13 semanas) ou idosos (60 a 96 semanas) que receberam há 1 hora uma gavagem contendo salina ou 20 mg de Ova. Sete dias após os camundongos receptores terem recebido a injeção com o soro dos doadores, eles foram imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μ g de Ova emulsificada em CFA. Após 21 dias, os animais receberam injeções de 30 μ l de solução de Ova a 2% agregada por desnaturação térmica (600 μ g de Ova por animal) no coxim plantar da pata traseira esquerda. No coxim plantar da pata traseira direita cada camundongo recebeu uma injeção de 30 μ l de salina. O inchaço de ambas as patas foi medido por paquímetro 24 horas após as injeções nos coxins plantares. O inchaço causado pela presença do antígeno foi obtido pela subtração da medida da pata esquerda pela direita e expresso em milímetros.

Uma outra forma de analisar a hipótese do defeito na geração do tolerógeno como explicação para a menor susceptibilidade à indução de tolerância oral seria o experimento oposto.

A administração de soro de camundongos idosos tratados com uma gavagem de Ova uma hora antes da sangria em receptores jovens poderia nos indicar se o camundongo idoso é ou não capaz de produzir tolerógeno com a passagem do antígeno pelo intestino. Assim, camundongos jovens receberam a injeção de soro normal de camundongos idosos (controle), ou a injeção de soro de camundongos idosos gavados 1 hora antes com Ova (**figura 14** - barras verde e azul respectivamente). Seria esperado que a administração de soro *normal* de camundongos idosos em camundongos jovens não produzisse qualquer efeito sobre a capacidade de desenvolvimento de reação de imunidade celular nos camundongos jovens. Entretanto, a simples administração de soro normal de idosos em jovens é capaz de inibir a reação celular desses últimos (**figura 14** - barra verde). Assim, não temos como afirmar se o soro de camundongos idosos gavados com Ova contém ou não tolerógeno pois o soro normal de camundongos idoso parece já capaz de inibir a reação celular em jovens.

Por outro lado, a transferência de soro normal de jovens em camundongos idosos não é capaz de afetar a reação celular dos idosos (**figura 13** - barra amarela).



que recebeu gavagem com salina Ova salina Ova

Figura 14 - Reação de imunidade celular *in vivo* em camundongos jovens após transferência de soro de camundongos jovens ou idosos gavados com salina ou Ova. Camundongos B6D2F1 de 10 a 11 semanas de idade receberam injeção intraperitoneal de 1 ml de soro (pool) de camundongos doadores. Os doadores são camundongos B6D2F1 jovens (6 a 13 semanas de idade) ou idosos (60 a 96 semanas de idade) que receberam há 1 hora uma gavagem contendo salina ou 20 mg de Ova. Sete dias após os camundongos receptores terem recebido a injeção com o soro dos doadores, eles foram imunizados subcutaneamente na base da cauda com 100 μ g de Ova emulsificada em CFA. Após 21 dias, os animais receberam injeções de 30 μ l de uma solução de Ova a 2% agregada por desnaturação térmica (600 μ g de Ova por animal) no coxim plantar da pata traseira esquerda. No coxim plantar da pata traseira direita, cada camundongo recebeu uma injeção de 30 μ l de salina. O inchaço de ambas as patas foi medido por paquímetro 24 horas após as injeções nos coxins plantares. O inchaço causado pela presença do antígeno foi obtido pela subtração da medida da pata esquerda pela direita e expresso em milímetros.

Discussão

A importância da gradualidade na indução de tolerância oral

Uma série de evidências na literatura nos leva a crer que a tolerância oral a antígenos protéicos reflete a maneira pela qual a proteína é manipulada no intestino. Baseado nessas evidências, que apresentaremos a seguir, pode-se dizer que qualquer fator que altere a quantidade ou a natureza química do antígeno absorvido pelo intestino, pode afetar as consequências imunológicas deste material (Mowat, 1994).

É possível que alterações nas formas de administração oral de antígeno acarretem em *quantidades* e *qualidades* diferentes de antígeno disponíveis, podendo assim influenciar os eventos desencadeados na mucosa intestinal, como a tolerância oral.

Como pudemos observar claramente (**figuras 4, 8 e 10**), a administração gradual do antígeno (ingestão voluntária) é muito mais eficaz na indução de tolerância oral que uma administração *in bolus* (gavagem). Entretanto não sabemos exatamente o (s) fator (es) responsável (eis) por esta diferença.

O simples aumento na frequência de administração do antígeno (3 ou 5 gavagens em dias consecutivos) é capaz de melhorar a eficiência de indução de tolerância oral, mas somente se esta for medida enquanto supressão da reação de imunidade celular (**figuras 5, 8 e 11**). A supressão da produção de anticorpos é a mesma obtida com o protocolo de uma gavagem.

Na verdade, todos os nossos resultados indicam que, embora o aumento da frequência tenha algum efeito sobre a indução de tolerância oral, o fator realmente relevante na sua eficácia parece ser o aumento da gradualidade de administração oral. A ingestão voluntária de Ova por um único dia é capaz de suprimir significativamente tanto a reação de imunidade celular quanto a produção de anticorpos (**figuras 4, 5, 8, 10 e 11**).

A relativa ineficiência da administração oral *in bolus* do antígeno quando comparada com a administração gradual tanto sob o parâmetro da atividade imune humoral (**figuras 4 e 10**) quanto da atividade imune celular (**figuras 5 e 8**) não parece estar relacionada ao possível "trauma" envolvido na realização da gavagem (irritação na garganta e *stress* da manipulação). Camundongos que recebem ingestão voluntária de Ova concomitantemente a uma gavagem com salina não apresentam diferença quantitativa na produção de anticorpos quando comparados a camundongos que receberam somente a ingestão voluntária (dados não mostrados; Verdolin, 1993).

Os motivos que tornam a administração gradual do antígeno mais eficaz que a administração *in bolus* na indução de tolerância oral, podem ser vários. Duas hipóteses principais, no entanto, nos parecem prováveis: 1) a indução de tolerância oral dependeria de um aporte constante de antígeno na circulação e a ingestão voluntária por vários dias consecutivos seria capaz de prover esse aporte; 2) a diferença na eficácia entre a ingestão gradual versus a

ingestão *in bolus* do antígeno se deveria a diferenças não simplesmente na concentração total de antígeno íntegro que alcança a circulação, mas em diferenças durante todo o trajeto de transformações que o antígeno sofre durante sua passagem pelo intestino.

A diferença entre as duas hipóteses reside no fato de que a primeira considera que a gradualidade de entrada do antígeno na circulação é o fator importante e, portanto, o intestino funcionaria apenas como uma via neutra de coleta de antígenos para o organismo. A tolerância seria desencadeada sistemicamente em órgãos linfóides centrais e não haveria diferença de natureza entre a tolerância induzida por injeção intravenosa de antígeno e a tolerância induzida por via oral. A natureza sistêmica da tolerância oral e a evidência de que uma parte significativa dos antígenos administrados por via oral ganham acesso ao sistema imune periférico ainda intactos são fortes suportes para esta idéia (Mowat, 1998). Segundo esta perspectiva, a administração gradual do antígeno seria mais eficiente na manutenção de níveis circulantes constantes de Ova intacta que a administração *in bolus*. Esta hipótese foi testada recentemente por Beatriz Stransky na sua dissertação de Mestrado nesse departamento (Stransky, 1996). Na tentativa de mimetizar a gradualidade de penetração de antígenos na circulação após sua ingestão, Stransky realizou infusões intravenosas lentas de Ova nativa (durante uma hora) ou ainda infusão intraperitoneal lenta (durante 24 horas) utilizando uma bomba osmótica. Nenhum dos tratamentos resultou em indução de tolerância indicando que a gradualidade de entrada de Ova nativa na circulação não é um fator relevante na indução de tolerância oral.

A segunda hipótese pressupõe que, ao contrário, o intestino e o tecido linfóide associado a ele sejam fundamentais na indução de tolerância oral e, portanto, que é a gradualidade no trajeto pelo intestino o elemento crucial. Desta perspectiva, a administração gradual versus *in bolus* por via oral resultam em distintos efeitos imunológicos devido a diferenças na digestão, na absorção, na interação com componentes linfóides locais e na drenagem do antígeno quando ele passa pelo intestino.

O objetivo desse trabalho foi estudar mais extensiva e sistematicamente o efeito de diferentes protocolos de administração oral de antígeno na indução de tolerância oral examinando tanto o parâmetro humoral quanto o parâmetro celular da atividade imunológica desencadeada. Não pretendemos examinar, nesse estudo, os mecanismos responsáveis pelas diferenças observadas. No entanto, nossos dados nos permitem fazer uma análise, sob o ponto de vista da indução de tolerância oral, de cada etapa percorrida por antígenos administrados oralmente tentando delinear a partir daí futuras perspectivas para o estudo do fenômeno.

A seguir, então, discutiremos as diferenças entre os diferentes protocolos de administração oral de antígeno à luz da segunda hipótese apresentada acima, que nos parece a mais provável para explicar nossos resultados.

Digestão

Um fator que pode influenciar processos imunológicos desencadeados a nível do intestino, tal como a tolerância oral é a atuação de proteases digestivas. A exposição do antígeno a tais enzimas no trato gastrointestinal ou *in vitro* gera uma diversidade de fragmentos antigênicos capazes de afetar o sistema imune de diferentes maneiras, dependendo de suas formas físico-químicas, suas quantidades, os trajetos de absorção e suas interações com componentes imunológicos no organismo. A digestão inicial das proteínas da dieta ocorre no lúmen sob a influência de enzimas gástricas e pancreáticas e posteriormente algumas enzimas, presentes na superfície dos enterócitos, podem também atuar na digestão proteica.

O soro coletado de camundongo, uma hora após gavagem com Ova, pode transferir tolerância específica para a Ova em reações de DTH em animais recipientes, sugerindo que peptídeos resultantes do processamento pelo intestino são os "tolerógenos" relevantes. Já a transferência de soro de camundongo injetado parenteralmente com Ova não transfere a tolerância. Assim, provavelmente os peptídeos, ao invés da proteína nativa, são os reais indutores de tolerância oral à Ova. Esta necessidade de passagem pelo intestino para a produção de tolerógeno sugere que os eventos responsáveis pelo processamento intestinal são críticos para a indução de tolerância oral. Entretanto, a forma como este processamento ocorre e o papel relativo do epitélio intestinal ou de células linfóides locais ainda não estão determinados (Mowat, 1994).

Michael mostrou que a administração oral ou a injeção diretamente no íleo de camundongos, de um peptídeo derivado de BSA resulta em tolerância. Entretanto, a administração de BSA nativa resulta em tolerância quando ocorre por via oral, mas quando é injetada diretamente no íleo (onde a digestão enzimática é bastante limitada) acarreta em imunização (Michael, 1989). Stransky e colaboradores (Stransky, 1998) também mostraram que a injeção de Ova diretamente no estômago, mas não no íleo ou ceco, suprime subsequentes imunizações para reações de DTH. Se o resultado da administração oral do antígeno depende da região do intestino e/ou da grande concentração de elementos linfóides na porção superior do intestino ou ainda de outros fatores não está ainda claro, mas os dados citados sugerem que a porção importante é a porção proximal do intestino delgado. O número de células linfóides na lâmina própria do intestino diminui gradualmente ao longo do intestino, sendo maior no duodeno e menor no intestino grosso (Van der Heijden, 1989; Van der Heijden, 1988).

Em alguns casos a exposição de proteínas a enzimas proteolíticas parece não ser crucial para a indução de tolerância. Um estado de tolerância semelhante à tolerância oral pode ser desencadeado pela exposição nasal (respiratória) ao antígeno (McMenamin, 1995; Holt, 1987), uma via que, supostamente, não envolve processos digestivos extensos como a via oral. Da mesma forma, a administração retal de antígeno intacto também induz tolerância medida por ensaio de proliferação (Louis, 1995). A inibição *in vivo*

da atividade enzimática pancreática não apresenta efeito sobre a indução de tolerância oral (Strobel, 1984a). A ingestão de peptídeos artificiais geralmente induz o mesmo grau de tolerância encontrado após a ingestão de antígeno intacto (Higgins, 1988). Outro exemplo é o de que camundongos jovens, no período do pré-fechamento do intestino (2 a 14 dias de idade) se tornam progressivamente mais susceptíveis à tolerância oral (Hanson, 1981) embora sejam ainda incapazes de digerir eficientemente proteínas na luz intestinal. A susceptibilidade se mantém em ritmo crescente após o fechamento, quando a absorção de proteínas se reduz muito (Stransky, 1998).

Por outro lado, parece razoável a idéia de que o antígeno administrado oralmente, exposto à acidez gástrica e à atividade de enzimas proteolíticas presentes na luz intestinal e enterócitos, possa gerar fragmentos imunogênicos que poderiam influenciar, de alguma maneira, a indução da tolerância oral. Os procedimentos que reduzem a proteólise (ausência de enzimas digestivas ou inibição de suas ações) podem algumas vezes reduzir o nível de tolerância (Hanson, 1993). Este efeito pode ser devido tanto a uma diminuição das formas degradadas do antígeno, quanto a um aumento da absorção de proteínas antigenicamente intactas no plasma.

A administração intraperitoneal de 10 μ g de Ova nativa um dia antes ou concomitantemente à gavagem é capaz de bloquear a indução da tolerância oral (Hanson, 1979; Stransky, 1996). Este é um dado interessante por diversas razões, uma das quais é a constatação de que essas injeções de Ova solúvel são, por si só, incapazes de imunizar ou "primar" animais normais para respostas secundárias (Strobel, 1983). Entretanto, parece que a presença de pequenas quantidades de Ova nativa introduzidas diretamente na circulação interfere com a indução de tolerância. O mesmo ocorre com o aumento da absorção da Ova seja pelo aumento da permeabilidade intestinal subsequente ao tratamento com indometacina (Louis, 1996) ou pela inibição de proteases intestinais por aprotinina administrada *in vivo* (Hanson, 1993).

Em nosso caso, provavelmente diferentes formas na administração oral do antígeno (gradual ou *in bolus*) podem levar a uma degradação e absorção diferenciadas. Assim, com a gavagem (administração *in bolus*), pode ocorrer uma degradação menor do antígeno e/ou uma maior absorção de proteína na forma nativa. Isto poderia ser um dos fatores explicativos para a menor eficiência da gavagem em suprimir a produção de anticorpos (**figuras 4 e 10**) e reação de imunidade celular (**figuras 5 e 8**) quando comparada com a administração gradual do mesmo antígeno.

Absorção

Apesar de conhecidas quais as vias de absorção de macromoléculas, pouco se sabe sobre a via preferencial de entrada de antígenos solúveis do lúmen para o interior de nosso organismo. Tais moléculas, incluindo moléculas da dieta, podem ser coletadas através da extensa superfície epitelial que recobre o tecido imunológico difuso da mucosa intestinal (Brandtzaeg,

1998). Essa via, no entanto, só permite a entrada de proteínas solúveis mas não de materiais agregados (Mayer, 1996).

O mecanismo de absorção para oligopeptídeos é mais eficiente que aquele para aminoácidos (Silk, 1974), e algumas observações sugerem que eles são absorvidos por diferentes vias.

Após ingestão voluntária ou gavagem, quantidade e qualidade diferentes de Ova podem estar disponíveis no lúmen, podendo ocasionar absorção diferencial em cada um dos casos.

Vários autores (Hanson, 1977; Peng, 1990; Stokes, 1983; Swarbrick, 1979; Vives, 1980) investigaram a relação entre a quantidade do antígeno absorvido e a indução de tolerância. Após a administração intragástrica de Ova, apenas uma pequena parcela (0,01 a 1 %) é absorvida e permanece por algum tempo na circulação (Strobel, 1983). Entretanto, o ritmo de remoção de Ova injetada intravenosamente é muito rápido: menos de 5 % permanece no soro por mais de 15 minutos (Stransky, 1996). Não está claro se esta remoção excepcionalmente rápida da Ova interfere decisivamente no desencadeamento de fenômenos imunológicos específicos. Por outro lado, a administração oral de drogas anti-inflamatórias não esteróides (como a indometacina), que induzem um rápido aumento na permeabilidade intestinal com conseqüente aumento dos níveis da proteína no plasma, resulta na supressão da tolerância oral quando administrada oralmente antes da administração do antígeno (Louis, 1996).

A área de superfície das placas de Peyer é pequena em comparação com a dos vilos e as células M representam somente uma pequena porcentagem das células presentes no FAE. Ainda assim, essas células são uma via importante de absorção no intestino sendo capazes de coletar materiais solúveis e particulados do lúmen com extrema eficiência. É provável que moléculas antigênicas sejam também absorvidas via enterócitos convencionais (Mowat, 1997). Possivelmente, a absorção de Ova nativa, uma macromolécula, seja maior via células M enquanto que porções digeridas da molécula (oligopeptídeos) entrem preferencialmente via enterócitos. A entrada de antígeno através dessas duas vias pode resultar em conseqüências imunológicas muito distintas já que tanto as populações de células apresentadoras como as próprias células linfóides presentes nas placas de Peyer no epitélio e na lâmina própria são muito diversas como discutiremos a seguir.

Analisando nossos resultados à luz dessas considerações podemos propor que a administração do antígeno de forma gradual (pouco antígeno disponível no lúmen por um longo período) ou *in bolus* (muito antígeno disponível em um só momento) resultaria não só em ritmos mas inclusive em vias diferentes de absorção de antígenos. A administração *in bolus* provavelmente facilitaria a entrada de formas não digeridas ou até agregadas de Ova pelas células M das placas de Peyer enquanto que a ingestão gradual favoreceria a absorção via enterócitos.

O contato com o tecido linfóide associado às mucosas

As macromoléculas ao alcançarem os tecidos do corpo através do intestino estão sujeitas à interação com o tecido linfóide associado à mucosa intestinal. O grau de interação será proporcional à complexidade antigênica do material e também pode ser influenciada pela via de entrada (Nicklin, 1987).

Os componentes presentes no tecido linfóide associado à mucosa que podem interagir com as macromoléculas absorvidas são principalmente as células apresentadoras de antígeno (enterócitos, células B, macrófagos e células dendríticas) abundantes nesta região.

Estas macromoléculas absorvidas podem também não chegar a interagir com nenhum componente no local de sua absorção, serem coletadas pela circulação sanguínea e/ou linfática passando pelo fígado e/ou linfonodo mesentérico.

As células apresentadoras de antígeno (APC) tanto das placas de Peyer quanto da lâmina própria podem ativar linfócitos localmente ou podem migrar e ativar células em outros locais (por exemplo fígado e linfonodo mesentérico).

As células linfóides presentes na mucosa nem sempre são residentes, várias são caracterizadas por contínua ativação, migração e diferenciação. Por exemplo: há um constante influxo de células linfóides da medula óssea e de outros órgãos linfóides periféricos para dentro de tecidos linfóides organizados tal como placas de Peyer e linfonodo mesentérico (James, 1991). Linfócitos e outras células mononucleares presentes no epitélio estão também constantemente migrando para dentro e para fora do epitélio da cúpula de placas de Peyer (Ermak, 1986).

Praticamente todos os eventos imunológicos requerem a ativação de células T. Em geral, estas células são ativadas por pequenos peptídeos ligados ao bolso de moléculas de MHC. Complexos antigênicos, tal como os que induzem tolerância oral, necessitam primeiramente ser coletados por células chamadas apresentadoras, processados intracelularmente dentro de endossomos e apresentados como peptídeos ligados a moléculas de MHC (Mowat, 1994). Desta forma, não é difícil constatar que a atividade de células apresentadoras de antígeno é crítica com relação às consequências imunológicas de antígenos ingeridos.

Várias APC distintas estão presentes no intestino delgado, tais como linfócitos B (Kammer, 1980), macrófagos (MacDonald, 1982), células dendríticas (Pavli, 1990; Spalding, 1983) e células epiteliais (Bland, 1986).

As células epiteliais (ou enterócitos) recobrem todo o trato gastrointestinal mas é somente nos locais de maior absorção de nutrientes que há a maior expressão de moléculas de MHC de classe II. Em tecidos saudáveis, as moléculas de classe II são expressas somente pelo epitélio do intestino delgado e o intestino grosso é negativo ou fracamente positivo. A distribuição no tecido é restrita aos primeiros dois terços dos vilos: somente células

epiteliais absorptivas (enterócitos) completamente diferenciadas, expressam constitutivamente moléculas de classe II (Bland, 1988).

O início da expressão de moléculas de classe II em enterócitos de ratos coincide com o desmame (três a quatro semanas de idade), mas em camundongos a expressão observada ao sétimo dia de vida é provavelmente muito prematura para ser associada ao desmame. Esta diferença na expressão em camundongos e ratos apresenta uma relação temporal com a susceptibilidade à indução de tolerância oral nestas espécies. Assim, apesar de ratos não poderem ser tolerizados para beta-lactoglobulina com nove dias de idade, a tolerância pode ser induzida pela ingestão do antígeno quando adulto. Da mesma maneira, camundongos não podem ser tolerizados para a ovalbumina até os sete dias de idade (Hanson, 1981). Este fenômeno pode também estar relacionado ao desenvolvimento da população de linfócitos intraepiteliais (IEL). Apesar do número de IEL se apresentar em níveis de adulto a partir de uma semana de idade no rato, a distribuição na membrana de marcadores fenotípicos leva várias semanas para se desenvolver (Lyscom, 1983).

Os IEL vivem em contato com enterócitos do vilão, aumentando a possibilidade de que eles possam ser estimulados por peptídeos apresentados por enterócitos. Em camundongos, mais que 90 % dos IEL são CD8⁺ e mais da metade destes possuem TCR do tipo $\gamma\delta$ (Lefrancois, 1994).

Diferentemente de células T $\alpha\beta$, a maioria das células T $\gamma\delta$ não parecem interagir com peptídeos em associação com moléculas de MHC. Muitos dos antígenos que interagem com células T $\gamma\delta$ são autólogos, antígenos celulares como *heat shock proteins* (Munk, 1989) ou antígenos não MHC clássicos tais como CD1 (Battistini, 1995; Imani, 1991), T1a (Bonnevillie, 1989), ou T10^b (Schild, 1994) e T22 (Weintraub, 1994). Moléculas de CD1d ocorrem na superfície de células do epitélio intestinal sem associação à β 2-microglobulina (Balk, 1994). Assim, em adição à apresentação convencional de moléculas antigênicas, as células epiteliais expressam também moléculas não clássicas de MHC (Balk, 1994; Hershberg, 1990; Blumberg, 1991). A apresentação de antígeno por estas moléculas tem sido demonstrada em alguns sistemas (Cheroutre, 1995). Além disto, há algumas evidências *in vitro* de que a expressão de CD1 por enterócitos (junto a outras proteínas de membrana) pode estar envolvida na ativação de células T CD8⁺ (Li, 1995; Panja, 1993).

Bland & Whiting sugerem que o processamento de ovalbumina por enterócitos compreende um mecanismo não degradativo, diferentemente do que ocorre em macrófagos, células B e células dendríticas onde há degradação do antígeno (Bland, 1989). Ao que parece, a quebra de proteínas pelos enterócitos é possível pela presença de peptidases associadas com a borda em escova. Entretanto estas peptidases têm a capacidade de clivar somente oligopeptídeos e não possuem efeito sobre proteínas globulares (Wojnarowska, 1975). Assim, duas alternativas são possíveis: ou a ovalbumina é apresentada pelos enterócitos na sua forma nativa, que pode contradizer a aceitação corrente de que a maioria das proteínas globulares,

incluindo ovalbumina, requerem algum grau de processamento para revelar epitopos escondidos, ou que enterócitos são capazes de modificar a molécula antigênica por processos não degradativos. Por esta última hipótese, é possível que, durante a passagem da molécula de ovalbumina através do enterócito, ocorram mudanças conformacionais revelando epitopos relevantes para linfócitos T e sequências hidrofóbicas que facilitem sua ligação a moléculas de classe II do endossomo (Bland, 1989).

A ovalbumina acrescentada em culturas de enterócitos pode ser rapidamente exocitada e liberada da membrana celular sugerindo que a função normal da molécula de classe II nessas células pode ser a de um receptor antigênico reciclável que facilite a transição de antígenos (Bland, 1988).

A administração oral de ovalbumina desencadeia a formação de um tolerógeno no soro, capaz de induzir tolerância quando transferido intraperitonealmente a um receptor. Como aparentemente esse tolerógeno é um composto não muito diferente da Ova nativa, mas ainda assim distinto desta, é possível que a Ova, ao ser processada pelo intestino sofra somente algumas modificações físicoquímicas (Bruce, 1986; Furrie, 1995). Uma vez que enterócitos são capazes de atuar como transportadores sem causar degradação de proteínas globulares, é possível que estas células exerçam grande importância na formação do tolerógeno e, portanto, na indução de tolerância oral.

Por outro lado, Furrie e colaboradores (Furrie, 1994) demonstraram que células linfóides são essenciais para o aparecimento do tolerógeno. O soro de camundongos SCID ou irradiados não transfere tolerância a receptores singênicos. Não está ainda claro se os linfócitos exercem um papel direto ou agem indiretamente ativando outras células locais para o processamento de antígenos.

Além dos enterócitos, as células dendríticas também podem atuar como células apresentadoras de antígenos após a absorção do antígeno. Elas estão presentes na lâmina própria (Pavli, 1990) e placas de Peyer (tanto na cúpula subepitelial quanto na região interfolicular) (Mayrhofer, 1983).

As células dendríticas são ótimas APC, sendo mais eficientes que células B (Liu, 1993). Os produtos de MHC e complexos peptídeo/molécula de MHC são 10 a 100 vezes mais expressos nas células dendríticas que em outras APC como células B e monócitos (Inaba, 1997). As células dendríticas também expressam muitas moléculas acessórias que interagem com receptores nas células T (Caux, 1994; Inaba, 1994). Vários tipos diferentes de células expressando moléculas de MHC II podem apresentar antígenos para células T ativadas (Bland, 1986; Kammer, 1980; Metlay, 1989), mas células T virgens ou em repouso são muito mais facilmente estimuladas por células dendríticas apresentando antígenos que por outras APC, tanto para respostas alogênicas quanto singênicas *in vitro* (Croft, 1992; Inaba, 1984; Macatonia, 1987).

Kelsall e colaboradores demonstraram que há a presença de pelo menos duas populações de células dendríticas nas placas de Peyer: uma que forma

uma densa camada logo abaixo do epitélio e outra população fenotipicamente distinta, na região interfolicular (região de células T). As células dendríticas presentes logo abaixo do epitélio estão em um estado menos diferenciado que as células presentes na região interfolicular. Assim, a placa de Peyer parece apresentar uma camada de células dendríticas que estão posicionadas de forma ideal para a captura e processamento de antígenos do lúmen intestinal.

Algumas características as tornam particularmente capazes de capturar antígenos. Primeiro, elas podem coletar partículas e micróbios por fagocitose (Inaba, 1993; Moll, 1993; Reis, 1993; Svensson, 1997). Segundo, elas podem formar grandes vesículas de pinocitose onde o fluido extracelular e solutos são coletados, um processo chamado macropinocitose. Terceiro, elas expressam receptores que realizam endocitoses adsorptivas, incluindo receptores de lectina do tipo C como o receptor de manose de macrófagos (Sallusto, 1995) e receptores de Fc γ e Fc ϵ (Sallusto, 1994).

Duas linhas de evidência nos sugerem que as células dendríticas presentes no intestino podem cumprir um papel importante na indução de tolerância oral à ovalbumina.

Em primeiro lugar, sabemos que após a administração oral de ovalbumina, ela pode ser absorvida e se ligar a receptores de manose de células dendríticas (Sallusto, 1995). Pelo menos 70% das hexoses presentes na Ova são manoses, o que representa aproximadamente 2% do peso molecular da Ova (Marshall, 1959). Assim, é possível que as células dendríticas tenham grande importância na indução de tolerância oral à Ova.

Em segundo lugar, já foi mostrado que o antígeno administrado oralmente é captado eficientemente pelas células dendríticas intestinais e os estágios iniciais da apresentação de antígeno e ativação linfocitária que se seguem não diferem significativamente daqueles originários de uma imunização parenteral. Uma consequência importante desses resultados é que hipóteses criadas para explicar a tolerância oral necessitam levar em conta a presença de imunoestimulação desencadeada por células dendríticas contendo o antígeno em animais que tenham recebido antígenos oralmente (Liu, 1993). Assim, APC profissionais na mucosa podem processar proteínas administradas oralmente de uma maneira imunogênica, sem necessariamente levar a um estado de imunização sistêmica.

Na verdade, as células dendríticas parecem ser de grande importância na indução de tolerância oral pois animais que recebem a administração de um fator de crescimento que induz a proliferação de células dendríticas (Flt-3L), desenvolvem uma tolerância sistêmica mais acentuada após a ingestão do antígeno (Viney, 1998).

Talvez a entrada contínua de Ova pelo intestino (com a ingestão voluntária) permita um estado de ativação constante de APC locais, aumentando sua eficiência na ativação de células T num contexto naturalmente propenso à indução de tolerância. A administração contínua de antígeno pode produzir um efeito similar àquele observado após o tratamento com Flt-3L: a estimulação constante das células dendríticas

aumentaria a sua eficiência da mesma maneira que o aumento do número dessas células pela ação da droga amplifica sua atividade.

Sob ativação, as células dendríticas, além de serem capazes de ativar células T locais, migram para o linfonodo mesentérico onde podem completar sua maturação (Kitajima, 1996), atrair células B e T pela liberação de quimocinas (Adema, 1997) e manter a viabilidade de linfócitos T recirculantes (Brocker, 1997). As células dendríticas do intestino, tanto da lâmina própria quanto das placas de Peyer, migram para o linfonodo mesentérico continuamente em animais normais (Banchereau, 1998). Como a injeção com LPS causa grande liberação de células dendríticas do intestino (MacPherson, 1995), possivelmente pequenas quantidades de LPS (lipopolissacarídeo) absorvidas diariamente pelo intestino participam na migração constante e fisiológica dessas células para o linfonodo mesentérico.

Uma outra possibilidade explicativa para o efeito da administração gradual de antígeno por via oral estaria no processamento e apresentação diferenciais por diferentes populações de APC localizadas nas placas de Peyer versus o epitélio do vilo.

Algumas diferenças entre placas de Peyer e lâmina própria quanto a suas distribuições celulares e tipos celulares sugerem que possivelmente a entrada diferencial (em quantidade e qualidade) de antígeno por cada um destes locais acarrete diferenças imunológicas. É provável que a quantidade e a qualidade de Ova absorvida pela lâmina própria e/ou pelas placas de Peyer, seja diferente em função da forma da administração oral do antígeno (gradual ou *in bolus*).

O trabalho de Allan & Trier mostra que a maioria dos capilares subepiteliais das cúpulas das placas de Peyer, diferentemente dos encontrados nos vilos, geralmente perdem as fenestras endoteliais e que a rede de capilares da cúpula é menos permeável a algumas moléculas que a dos vilos (Allan, 1991).

Há uma heterogeneidade entre macrófagos de lâmina própria e placas de Peyer: as células dos vilos têm maior semelhança com os macrófagos clássicos de tecido (lisozima positivos e S100 negativos) que as células DR positivas das placas de Peyer (lisozima negativas e S100 positivas) (Spencer, 1987). Macrófagos L1-positivos e HLA-DR negativos estão difusamente distribuídos na mucosa da lâmina própria e na região da cúpula das placas de Peyer, mas relativamente escassas logo abaixo do FAE. Por outro lado, células interdigitantes HLA-DR positivas são abundantes abaixo do FAE, em adição às regiões interfoliculares. A proporção de macrófagos para células dendríticas é significativamente menor na região da cúpula que na lâmina própria (taxa média de $L1^+ / \text{proteína S-100}^+ = 20/80$ versus $72/28$) (Brandtzaeg, 1990).

Além das diferenças encontradas nas populações de APC, também as populações de células linfóides das placas de Peyer e da lâmina própria apresentam diferenças notáveis.

O número de células produtoras de IgA na cúpula das placas de Peyer é geralmente muito menor que nas regiões adjacentes e na mucosa da lâmina

própria. Entretanto, a densidade de células produtoras de IgG é cerca de cinco vezes maior na cúpula e regiões adjacentes da placa de Peyer que na lâmina própria (Bjerke, 1986).

A abundância de linfócitos B no epitélio da cúpula é particularmente digno de nota desde que células B não são comuns no epitélio do vilão, onde a maioria dos linfócitos intraepiteliais são células T. No camundongo, mais de 90% dos linfócitos intraepiteliais do vilão são células T (Guy-Grand, 1978). Em ratos, praticamente nenhuma célula B foi encontrada no epitélio do vilão; entretanto cerca de dois terços dos linfócitos da lâmina própria são células B (Lyscom, 1982).

As células T são encontradas em grande número nas regiões interfoliculares das placas de Peyer e também na cúpula, enquanto poucos destes linfócitos são encontrados nos folículos de células B. Há uma predominância marcante de células CD4⁺ sobre células CD8⁺, tanto nas placas de Peyer quanto na lâmina própria (Bjerke, 1988), mas uma proporção muito maior de células CD4⁺ foi encontrada no FAE que no epitélio do vilão (Brandtzaeg, 1990). Como já mencionamos anteriormente, os linfócitos T presentes nas placas de Peyer pertencem à população convencional de linfócitos T $\alpha\beta$ enquanto que as células T presentes no vilão apresentam fenótipos não convencionais: 90 % dos linfócitos intraepiteliais (IEL) expressam o receptor $\gamma\delta$ e grande parte dos linfócitos da lâmina própria pertencem à população de células NK 1.1 (Mowat, 1994).

Em resumo o destino de macromoléculas absorvidas e possíveis efeitos sobre o sistema imune parecem depender: da via de absorção (Brandtzaeg, 1998) e de como elas são recebidas localmente (Brandtzaeg, 1996; Sanderson, 1995; Walker, 1975).

Um outro fator relevante pode ser o trajeto de migração do antígeno: se ele alcança a linfa e o linfonodo mesentérico ou se, ao invés, ele atinge o fígado via circulação porta.

A importância do fígado na indução de tolerância oral

Van Wilsen e colaboradores sugerem que são as propriedades intrínsecas do epitélio mucoso, em combinação às condições específicas do linfonodo de drenagem, que determinam se a apresentação de antígeno leva à tolerância ou à imunização (Van, 1994).

A maioria do sangue drenado do intestino passa pelo fígado via sistema venoso portal e grandes quantidades de antígeno provavelmente entram no fígado rapidamente após administração oral. O fígado é o maior tecido do sistema retículo endotelial, aumentando a possibilidade de que este órgão possa ser o principal local de eventos de processamento antigênico que determinam as consequências imunológicas da ingestão de antígeno. Apesar das funções imunológicas do fígado só agora serem examinadas em algum detalhe, sabe-se há muitos anos que a administração direta de antígeno dentro

da veia porta leva a um estado de supressão sistêmica que apresenta muitas similaridades com a tolerância oral (Fujiwara, 1986; Qian, 1985; Sato, 1988) e que inclui a supressão preferencial de reações de DTH e de IFN- γ , com concomitante baixa produção de IL-4 e IL-10 (Chung, 1995; Gorczynski, 1994; Gorczynski, 1996a; Gorczynski, 1996b; Gorczynski, 1995). Além disso, a tolerância induzida através veia porta pode ser transferida por células T expressando TCR $\gamma\delta$ (Gorczynski, 1994; Gorczynski, 1996a; Gorczynski, 1996b) e parece envolver mecanismos distintos daqueles envolvidos na indução de tolerância por injeção de antígeno no interior de outras veias (Chung, 1995; Gorczynski, 1996a; Gorczynski, 1996b).

Apesar deste paralelo, ainda não está claro o quanto o fígado contribui para o fenômeno da tolerância oral. Resultados conflitantes têm sido descritos de estudos de tolerância oral onde o fígado é evitado por um desvio portocaval (Thomas, 1976; Yang, 1994) e muitos efeitos locais desta intervenção cirúrgica tornam difícil a interpretação dos resultados. Os autores sugerem que diferentemente do que ocorre com antígenos solúveis (como a Ova), os antígenos agregados (como o BSA utilizado por eles), devido ao tamanho, são absorvidos do intestino para a circulação sistêmica via rota linfática ao invés de via veia porta e que isto pode resultar em um mecanismo diferente para a indução de tolerância. Se esta explicação for verdadeira, este é um bom indicativo da importância também do linfonodo mesentérico na indução de tolerância oral.

Não se sabe o porque a distribuição de antígeno via trato porta induz a uma tolerância tão efetiva, embora suponha-se que isto reflita uma associação com uma população tolerogênica de APC. Aloenxertos de fígado são somente lentamente rejeitados e Steptoe & Thomson sugerem que isto se deve à presença de um subtipo distinto de células dendríticas que tolerizam atuando sobre células T (Steptoe, 1996). Novamente, este processo é análogo ao o que pode ocorrer no intestino após a administração oral de antígeno solúvel. Assim como o intestino, o fígado contém um grande número de células T primitivas e derivadas extratimicamente (tal como células T $\gamma\delta$ e células T CD4⁺ NK1.1⁺) e é um local de apoptose de células T (Crispe, 1996). Em conjunto a seu tamanho e posição anatômica, estas características apontam para um papel do fígado na tolerância a antígenos provenientes do intestino (Mowat, 1998).

Do ponto de vista dos nossos resultados, existe a possibilidade de que a entrada constante e gradual de antígeno solúvel facilite sua absorção via circulação porta e seu processamento no fígado. Esta é uma hipótese a ser testada em experimentos futuros.

Algumas observações quanto aos protocolos utilizados

A reação celular *in vivo* já é detectável 6 horas após o desafio e apresenta uma grande concentração de eosinófilos no infiltrado inflamatório

A hipersensibilidade do tipo retardada ou "*delayed*" (DTH) é mediada por uma subpopulação de células Th. É chamada "retardada" porque inflamações de hipersensibilidades mediadas por anticorpos da classe IgE (hipersensibilidade do tipo I ou imediata) ou da classe IgG e IgM iniciam-se dentro de minutos ou poucas horas, enquanto a DTH leva 24 a 48 horas para aparecer. As duas também são distintas pela natureza do infiltrado celular: a inflamação mediada por anticorpo e complemento se caracteriza predominantemente pela presença de polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), enquanto a DTH se caracteriza pela presença de células mononucleares (Stites, 1992).

A hipersensibilidade do tipo I é mediada por anticorpos da classe IgE e podem apresentar duas fases: a imediata e a tardia. A fase imediata é mediada principalmente pelos efeitos da histamina e dos leucotrienos liberados por mastócitos ativados pela ligação da IgE acoplada ao antígeno. A fase tardia requer vários mediadores, entre eles o fator de ativação de plaquetas (PAF), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas) e IL-5 principalmente. Além disso se caracteriza pelo recrutamento de células inflamatórias da corrente sanguínea, especialmente neutrófilos e eosinófilos (Stites, 1992).

Apesar da divisão em hipersensibilidades imediata e tardia não apresentar limites precisos e ambas poderem ocorrer ao mesmo tempo, nossos dados apontam para uma fase tardia de hipersensibilidade imediata nas reações celulares realizadas *in vivo* com a administração de Ova. As **figuras 6 e 7** mostram que o infiltrado inflamatório, presente nas patas após 6 horas do desafio, apresenta grande quantidade de eosinófilos e praticamente nenhum linfócito ou macrófago. O mesmo foi observado após 24, 48 e 72 horas com mudanças somente na quantidade celular mas não na aparente proporção qualitativa (dados não mostrados). Além dessa grande concentração de eosinófilos (característica de uma fase tardia de hipersensibilidade imediata), a **figura 5** nos mostra que, com seis horas, já observamos um grande inchaço e, apesar do grupo imune não apresentar alterações no inchaço após 24 horas, todos os animais que receberam um pré-tratamento oral com Ova apresentaram redução do infiltrado inflamatório em 24 horas. Todos os camundongos já não apresentavam praticamente nenhum inchaço 48 e 72 horas após o desafio (dados não mostrados).

Assim, ao utilizarmos a Ova, provavelmente o que desencadeamos foi uma reação tardia de hipersensibilidade imediata (do tipo I) e não uma reação de DTH (hipersensibilidade do tipo IV). O inchaço nas patas representa a fase tardia da reação de hipersensibilidade do tipo I.

Os camundongos que receberam pré-tratamento oral com Ova, 24 horas após receberem o desafio na pata, apresentam menor inchaço que

camundongos imunes (**figura 5**). Entretanto, 6 horas após o desafio, somente os camundongos que receberam um pré-tratamento oral com Ova através de ingestão voluntária apresentaram inchaço significativamente menor. Assim novamente confirmamos que uma administração gradual do antígeno é mais eficaz na indução de tolerância oral à Ova que uma administração *in bolus*. Como não estamos analisando uma reação de DTH, mediada por linfócitos T, mas a fase tardia de uma reação de hipersensibilidade do tipo I e, portanto, mediada por anticorpos IgE, novamente nossos dados mostram que a administração gradual de antígeno é capaz de suprimir eficientemente a produção de anticorpos desencadeada pela imunização com o antígeno. Os outros protocolos, mesmo as múltiplas gavagens, apresentam uma eficiência bem inferior. Esses resultados são comparáveis, então, àqueles mostrados na **figura 4** onde a administração de Ova por ingestão voluntária durante 1 dia foi mais eficiente na indução de supressão da produção de anticorpos que 1 ou 5 gavagens consecutivas.

A reação de imunidade celular é mais sensível que a reatividade imune humoral para se determinar a indução de tolerância oral

As reações de imunidade celular (seja a medida de DTH *in vivo* ou a medida da proliferação de linfócitos *in vitro*) são eventos mais sensíveis à supressão por tolerância oral que a produção de anticorpos em camundongos, conforme já foi demonstrado numa gama variada de situações experimentais (Kay, 1989; Mowat, 1982; Mowat, 1994; Peng, 1989). Husby e colaboradores obtiveram resultado semelhante em um modelo de indução de tolerância oral em humanos (Husby, 1994). De forma semelhante, Bruce e Fergusson demonstraram que a transferência passiva de soro, coletado de camundongos uma hora após a ingestão de 25 mg de Ova, é capaz de inibir a indução de reação de imunidade celular (DTH) específica em receptores singênicos normais, mas não altera a produção de anticorpos após a imunização (Bruce, 1986). Lamont e colaboradores mostraram ainda que a ingestão de 25 mg de Ova em dose única, sete ou 14 dias após a imunização com Ova em CFA, suprimiu a indução de DTH, mas não alterou a produção de IgG após a imunização de camundongos (Lamont, 1988).

Nossos dados também apontam para esta maior sensibilidade da imunidade celular à indução de tolerância oral. Uma gavagem em camundongos idosos não induz tolerância para a produção de anticorpos (**figuras 9 e 10**) mas a análise de proliferação celular indica que uma gavagem é capaz de suprimir a reação celular (**figura 11**). Igualmente, cinco gavagens em animais jovens e idosos levam à mesma produção de anticorpos que uma única gavagem (**figuras 4 e 10**). Entretanto ao analisarmos a reação celular constatamos claramente que cinco gavagens são mais eficientes que uma única gavagem na indução de tolerância oral (**figuras 5, 8 e 11**).

A explicação mais simples para a diferença na susceptibilidade à indução de tolerância oral entre a reação de imunidade celular e a produção

de anticorpos seria que estes dois parâmetros refletem uma dicotomia na susceptibilidade de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ à indução de tolerância oral. Assim, as citocinas dependentes da subpopulação Th1, IFN- γ e IL-2 são frequentemente mais fáceis de suprimir nos protocolos de indução de tolerância oral por gavagem que as citocinas dependentes da subpopulação Th2, IL-4, IL-5, IL-10 (Weiner, 1994). Realmente, a produção de anticorpos da classe IgG1, dependente de IL-4, é muito mais resistente à supressão pela administração oral de antígeno que a produção de IgG2a, dependente de IFN- γ (Melamed, 1994). Como a reação de DTH é dependente de linfócitos do tipo Th1, uma explicação plausível para a sua fácil supressão seria esta.

A possibilidade da simples dicotomia Th1 e Th2 explicar todas as consequências funcionais observadas durante a indução de tolerância oral é, no entanto, bastante incerta. IL-5, por exemplo, uma citocina tipicamente secretada pelos linfócitos Th2, é facilmente suprimida por protocolos de administração oral de antígenos incapazes de alterar a secreção de IL-4 ou IL-10 (Mowat, 1998). Por outro lado, existem dados mostrando a indução da secreção de quantidades significativas de IFN- γ nas fases iniciais de indução de tolerância oral (Weiner, 1994). Esses dados sugerem, então, que diferentes atividades dos linfócitos apresentam susceptibilidades distintas à indução de tolerância por via oral.

A ingestão voluntária de Ova e a de clara de ovo levam à diferentes graus de supressão da produção de anticorpos anti-Ova

Recentemente constatamos que a ingestão voluntária com clara de ovo 1:5 é mais eficaz na indução de tolerância oral que a ingestão voluntária com Ova cristalizada diluída a 4 mg/ml (dados não mostrados). Vários motivos podem estar relacionados a esta maior eficiência da clara na indução de tolerância oral.

As proteínas da clara de ovo compreendem somente cerca de 10 % do peso total da clara pura (Stevens, 1991). Dentre estas proteínas estão a ovalbumina (que equivale a 64,3 % das proteínas), conalbumina, lisozima, globulinas, mucina, avidina e ovomucóide (Fox, 1957). O ovomucóide é um potente inibidor de proteases (Cara, 1995); pode ser que sua presença interfira na absorção e na digestão da ovalbumina ingerida, acarretando eventos imunológicos distintos. A presença de outras proteínas também pode afetar de alguma forma a indução de tolerância à ovalbumina.

Além disto, a presença de outros componentes em conjunto com a Ova podem alterar o gosto da solução o que levaria a uma maior ou menor ingestão da solução. Entretanto este fato não parece ser relevante pois o volume de solução ingerida por camundongo praticamente é o mesmo para a solução contendo clara de ovo e para a solução contendo Ova cristalizada. Por outro lado, a quantidade de ovalbumina presente nas duas soluções é diferente e é possível que a dose de antígeno absorvida interfira com a

indução da tolerância oral. Quando diluimos a clara a 1:5, a concentração de ovalbumina equivale a cerca de 13,5 mg/ml e assim cada camundongo ingere cerca de 67,5 mg de antígeno pelo período de 24 horas. Já a diluição de Ova cristalizada a 4 mg/ml permite a ingestão de cerca de 20 mg de antígeno pelo mesmo período de tempo, ou seja cerca de três vezes menos que com a administração de clara de ovo.

Resultados recentes obtidos em nosso laboratório por Juscilene S. Menezes e Beatriz Senra mostram que a clara 1:5 é mais eficiente na indução de tolerância por permitir a ingestão de uma quantidade maior de antígeno. A ingestão voluntária de uma solução contendo Ova cristalizada na mesma concentração da Ova presente na clara de ovo a 1:5 produz o mesmo nível de tolerância observado para a ingestão voluntária com a clara de ovo a 1:5. Este resultado descarta as possibilidades de que a presença de outras proteínas ou a presença de inibidores de protease na clara de ovo possam interferir com a indução de tolerância oral.

Na **figura 10**, a ingestão voluntária foi realizada com administração de clara de ovo. Portanto, os camundongos idosos podem ter se tornado tolerantes para a produção de anticorpos tanto devido à gradualidade de administração quanto devido à administração de três vezes mais antígeno que a administrada por gavagem.

No entanto, na **figura 11**, a ingestão voluntária foi realizada com a administração de Ova cristalizada diluída a 4 mg/ml. Desta forma, todos os camundongos idosos, que receberam um pré-tratamento com o antígeno, ingeriram a mesma quantidade de antígeno. Como podemos observar uma supressão mais acentuada, da reação de imunidade celular, com a ingestão voluntária que com a gavagem (apesar desta diferença não ser significativa), é possível que, também com os idosos, a gradualidade seja mais eficaz que a administração *in bolus* na indução de tolerância oral.

Supressão da reação de DTH com a administração do tolerógeno?

Dados da literatura demonstram que a transferência passiva de soro coletado de camundongos uma hora após a administração por gavagem de Ova é capaz de inibir a indução de DTH específica em receptores singênicos normais, mas que esse mesmo soro não é capaz de alterar a produção de anticorpos após a imunização (Bruce, 1986).

Nossos resultados são semelhantes aos dados anteriormente citados. A análise da produção de anticorpos indicam que não houve supressão, mas a reação de imunidade celular testada *in vivo* foi claramente suprimida pela transferência do soro (**figura 14**). A análise histológica do infiltrado inflamatório 24, 48 e 72 horas após o desafio com Ova mostra uma predominância de eosinófilos e praticamente nenhuma célula mononuclear (dados não mostrados). Este fato aponta para a possibilidade de que o que a transferência de tolerógeno induz não seja uma supressão de DTH mas sim uma supressão da fase tardia da hipersensibilidade imediata (do tipo I).

Como já mencionamos anteriormente, a hipersensibilidade do tipo I é uma reação inflamatória mediada por anticorpos IgE ligados a mastócitos e basófilos; as reações resultam da liberação por estas células de fatores farmacologicamente ativos. Algumas horas após a reação de hipersensibilidade imediata ter se iniciado, uma segunda reação inflamatória pode se desenvolver - a chamada reação de fase tardia. Esta reação ocorre em função da degranulação de neutrófilos e eosinófilos sob a influência de fatores quimiotáticos de mastócitos.

A explicação mais provável para os nossos dados é a diferente susceptibilidade dos isotipos de imunoglobulinas à indução de tolerância oral. Vários autores já demonstraram que, diferentemente de outros isotipos, a IgE é extremamente sensível à supressão desencadeada pela administração oral de antígeno (Ngan, 1978; Saklayen, 1984; Vaz, 1977). No nosso modelo, a transferência de tolerógeno provavelmente suprimiu a produção de anticorpos do isotipo IgE, embora não tenha afetado a produção dos demais isotipos. Assim, é possível que tenha ocorrido a supressão não só da fase tardia mas de todas as etapas da reação de hipersensibilidade imediata. Infelizmente não realizamos a análise da produção de IgE nos animais utilizados para esses experimentos de transferência de tolerógeno.

A menor susceptibilidade à indução de tolerância oral em idosos

O envelhecimento é um processo biológico natural acompanhado de inúmeras alterações em todo o organismo. Essas alterações ocorrem de forma gradativa e levam a diferenças nos vários sistemas biológicos e na sua homeostase. Dentre essas alterações encontram-se as do sistema imune com suas mudanças celulares, moleculares e sistêmicas.

Várias mudanças no fenótipo, repertório (Goidl, 1980) e padrão de citocinas secretados por linfócitos T e B são observadas durante o envelhecimento. A frequência de células T ativadas (CD45RO) aumenta quando comparada com a frequência de células T em repouso (CD45RA) (Nagelkerken, 1991). Além disto, os linfócitos ativados em animais e humanos idosos secretam níveis reduzidos de IL-2, IL-3 e GM-CSF, enquanto que a síntese de IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-6 e IL-10 está aumentada (Daynes, 1992; Daynes, 1993; Wei, 1992). Linfócitos ativados de animais idosos apresentam uma diminuição na transmissão de sinais e uma redução no influxo de cálcio (Philosophe, 1990; Thoman, 1989).

Os órgãos linfóides também mostram sinais de modificações com a idade. Além da involução do timo (George, 1996), o tecido linfóide associado à mucosa parece também apresentar alterações associadas à senescência (Kawanishi, 1987). Os níveis de IgA assim como o número de plasmócitos e de linfócitos T na lâmina própria do intestino está drasticamente reduzido em animais senis (Koyama, 1990).

Além dessas alterações celulares, alguns parâmetros globais da atividade imunológica modificam-se ao longo da vida. Animais experimentais e humanos idosos apresentam um nível reduzido de anticorpos reativos a antígenos externos quando comparados a indivíduos jovens (Furrie, 1995). Entretanto, o título total de imunoglobulinas séricas não se altera, provavelmente porque ocorre um aumento paralelo, nos indivíduos idosos, do nível de auto-anticorpos. Esse nível elevado de auto-anticorpos não parece relacionado a uma maior incidência de patologias autoimunes, mas a um aumento da conectividade interna do sistema já que os autoanticorpos aumentados reagem uns com os outros (Furrie, 1994). Aparentemente, então, mudanças no repertório expresso de linfócitos B em animais idosos tornam o sistema imune desses animais menos plástico já que as interações idiotípicas entre os componentes do sistema são mais abundantes (Banatvala, 1994). A perda de flexibilidade imunológica resultante desse processo de entrelaçamento progressivo do sistema imune pode, segundo Weksler e colaboradores (Furrie, 1994), explicar a incapacidade relativa de indivíduos idosos reagirem a novos antígenos.

Esses dados nos sugerem que modificações globais tanto na conectividade interna das células e moléculas do sistema imune como repercussões de mudanças endócrinas nas citocinas secretadas por linfócitos podem ser responsáveis por alterações pronunciadas na atividade imunológica durante o processo de envelhecimento. Assim, fenômenos sistêmicos como a indução de tolerância a componentes da dieta (tolerância oral) podem estar dramaticamente alterados.

De fato, a susceptibilidade à indução de tolerância oral se encontra diminuída (**figura 10**) ou totalmente abolida (**figura 9**) em animais idosos. Camundongos que são susceptíveis à indução de tolerância oral, por 1 a 5 gavagens, quando jovens (**figura 4**), tornam-se refratários com 25 e 70 semanas de idade (**figuras 9 e 10**). Entretanto, a transferência de células de baço de camundongos de 7 semanas para camundongos de 70 semanas restaura a susceptibilidade à indução de tolerância oral (Lahmann, 1992). Além disso, embora seja difícil induzir tolerância oral em camundongos idosos, a manutenção da tolerância adquirida por via oral para uma determinada proteína ingerida quando jovem não está alterada pelo envelhecimento (Faria, 1998b).

Estes resultados acima relatados podem ser entendidos à luz da hipótese de Weksler e colaboradores (Furrie, 1994). Observamos, em animais idosos, um decréscimo tanto na resposta imune quanto na indução de tolerância a um antígeno novo (**figura 9**) mostrando que provavelmente a plasticidade necessária à incorporação de uma novidade aos circuitos imunológicos já estabelecidos está bastante reduzida com a idade. O fato da manutenção da tolerância oral permanecer inalterada pelo envelhecimento também mostra que, para antígenos previamente apresentados ao animal jovem, a atividade imunológica (seja ela traduzida em imunização ou tolerância) está preservada. A nosso ver, o padrão de conectividade entre células e anticorpos presente no animal jovem e ausente em animais idosos

seria o elemento importante nessa mudança de susceptibilidade à indução de tolerância a novos antígenos. Aparentemente, tal padrão pode ser recuperado nos animais idosos pela transferência de células de baço de jovens (Lahmann, 1992).

O camundongo idoso ao ingerir o antígeno é capaz de produzir tolerógeno?

Além das alterações descritas acima, ocorrem também alterações na fisiologia do trato gastrointestinal que podem afetar a indução de tolerância oral. Com o envelhecimento, ocorre um aumento do peso da porção mais distal do intestino delgado que reflete um aumento na altura dos vilos (Holt, 1984). Além disto, há uma diminuição na taxa de absorção no intestino proximal (onde se encontra a maior concentração do GALT), e o íleo pode compensar a perda, causada pela senescência, da função jejunal (Ferraris, 1994; Reville, 1991). O camundongo idoso apresenta também uma migração mais lenta de células da cripta para o vilos com uma consequente taxa de renovação celular menor (Fry, 1961).

Como descrito na introdução, a produção do tolerógeno parece depender diretamente e/ou indiretamente da presença do sistema imune: animais irradiados ou SCID, que não possuem linfócitos B nem T, são incapazes de produzir o tolerógeno após a administração oral de antígeno (Bruce, 1987; Furrie, 1994).

Como o processo de envelhecimento é acompanhado de alterações tanto no sistema imune quanto no próprio trato gastrointestinal, uma questão a ser investigada era se o camundongo idoso seria menos susceptível à indução de tolerância oral que o camundongo jovem por um mal processamento do antígeno a nível do intestino. Este "mal" processamento resultaria na produção insuficiente ou na não produção do tolerógeno necessário para a indução da tolerância.

Outra possibilidade seria que o camundongo idoso seja capaz de produzir o tolerógeno, mas incapaz de incorporá-lo de forma ideal em seu sistema. Uma última possibilidade seria uma dificuldade do idoso tanto na produção quanto na incorporação do tolerógeno.

Com a intenção de testar essas hipóteses, realizamos transferências de soro de camundongos jovens tratados com salina ou com Ova por via oral para camundongos idosos. Como podemos observar na **figura 13**, a presença de tolerógeno no soro de animais jovens (capaz de transferir tolerância para animais igualmente jovens - **figura 14**) não é capaz de levar à indução de tolerância no camundongo idoso. Aparentemente, então, com a senescência, o camundongo perde a capacidade de incorporar o tolerógeno em seu sistema de forma a se tornar tolerante.

Quanto à análise da capacidade do idoso de produzir o tolerógeno, obtivemos um resultado inesperado (**figura 14**). O grupo controle, ou seja, os camundongos jovens que recebem o soro de camundongos idosos gavados com salina, deveria apresentar inchaço nas patas após as imunizações, uma

vez que recebeu como pré-tratamento somente um soro normal de idosos. Entretanto, estes animais jovens não apresentam reação de imunidade celular 24 horas após o desafio na pata (**figura 14**). Desta forma, o soro normal de camundongos idosos contém algum componente ainda desconhecido capaz de alterar a reatividade imunológica de camundongos jovens e impedir a produção de reação de imunidade celular nesses animais. Assim, o resultado obtido com a transferência de soro de camundongos idosos gavados a uma hora com Ova, para camundongos jovens (**figura 14**) pode ser explicado pela simples presença de soro de animais idosos e não pela presença de um tolerógeno. Com isto não podemos afirmar se o camundongo idoso é ou não capaz de produzir o tolerógeno.

O efeito imunológico do soro normal de camundongo idoso sobre o camundongo jovem

Um mililitro de soro normal de camundongos idosos administrado intraperitonealmente em camundongos jovens impede estes últimos de produzirem reação de imunidade celular à Ova após as imunizações (**figura 14**). Entretanto o processo inverso, a transferência da mesma quantidade de soro normal de camundongos jovens para camundongos idosos, não impede que estes últimos apresentem a mesma reação celular após as imunizações (**figura 13**).

Como já descrito acima, acreditamos que as modificações imunológicas do idoso podem estar associadas a uma perda de flexibilidade imunológica, ou seja, a um aumento da conectividade do sistema imune. Da mesma forma que é difícil de se induzir tolerância ou imunização em camundongos idosos através da introdução de um componente novo (possivelmente devido a um maior entrelaçamento deste sistema), a introdução de soro de camundongos jovens não é capaz de levar a alterações significativas na dinâmica do sistema imune do idoso.

Camundongos jovens, ao contrário, apresentam ainda um sistema imune flexível o suficiente para incorporar novidades antigênicas. Um mililitro de soro normal de camundongos idosos pode conter componentes de uma rede de interrelações estabelecidas ao longo da vida do idoso que ao serem transferidos para jovens, podem causar inúmeras alterações em suas inter-relações celulares e moleculares responsáveis por uma diminuição na capacidade de imunização semelhante àquela observada nos próprios animais idosos (**figura 14**).

Este resultado, ao mesmo tempo obscuro e intrigante, nos abre uma nova linha de trabalho a ser explorada num futuro próximo.

Conclusões

1. O aumento na frequência da administração de ovalbumina por gavagem é capaz de melhorar a eficácia da indução de tolerância oral quando esta é medida enquanto supressão da reação de imunidade celular mas não da produção de anticorpos;
2. A administração gradual de ovalbumina (ingestão voluntária) se mostrou muito mais eficiente como forma de indução de tolerância oral seja esta medida por parâmetros celulares (reação de imunidade celular *in vivo* ou proliferação de linfócitos *in vitro*) ou humorais (produção de anticorpos);
3. A reação de imunidade celular desencadeada pela injeção de Ovalbumina juntamente com adjuvante completo de Freund (CFA) produz uma reação de hipersensibilidade do tipo I sendo sua fase tardia identificada por histologia como um infiltrado predominantemente de eosinófilos na região do desafio com o antígeno solúvel (coxim plantar);
4. Todos os protocolos utilizados (gavagens e ingestão voluntária) foram capazes de suprimir esta reação de imunidade celular mas apenas o protocolo de ingestão voluntária foi eficaz para a supressão da produção de anticorpos medida por ELISA;
5. Camundongos a partir de 25 semanas de idade perdem a susceptibilidade à indução de tolerância oral por uma gavagem de 20 mg de ovalbumina medida pela produção de anticorpos anti-Ova no soro;
6. O aumento da gradualidade de administração de antígeno (ingestão voluntária) mas não o aumento da frequência de administração (múltiplas gavagens) é capaz de restaurar a susceptibilidade em camundongos idosos (70 semanas de idade);
7. A senescência não parece afetar a indução de tolerância oral à reação de imunidade celular medida *in vitro* em nenhum dos protocolos testados;
8. O soro de camundongos jovens tratados com 20 mg de ovalbumina por via oral contém um componente, que chamamos de tolerógeno, capaz de transferir tolerância para animais jovens mas não para animais idosos sugerindo que os animais idosos apresentam um defeito na incorporação desse tolerógeno;
9. O soro normal de camundongos idosos é capaz de inibir a resposta imune celular, medida *in vivo*, em animais jovens.

**Trabalhos publicados com os resultados da presente
dissertação:**

Faria, A. M., Ficker, S. M., Speziali, E., Menezes, I. S., Stransky, B., Verdolin, B. A., Lahmann, W. M., Rodrigues, V. S., & Vaz, N. M. (1998a). Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Braz J Med Biol Res*, 31(1), 35-48.

Faria, A. M., Ficker, S. M., Speziali, E., Menezes, J. S., Stransky, B., Silva Rodrigues, V., & Vaz, N. M. (1998b). Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev*, 102(1), 67-80.

Bibliografia

Abrams, G. D. (1983). Impact of the intestinal microflora on intestinal structure and function, *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, (pp. 291-309): Academic Press. Inc.

Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., Bacon, K. B., & Figdor, C. G. (1997). A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 387(6634), 713-7.

Allan, C. H., & Trier, J. S. (1991). Structure and permeability differ in subepithelial villus and Peyer's patch follicle capillaries. *Gastroenterology*, 100, 1172-9.

Alpers, D. H. (1994). Digestion and Absorption of Carbohydrates and Proteins. In L. R. Johnson (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, (3rd ed., Vol. II, pp. 1723-1749). New York: Raven Press.

Andre, C., Heremans, J. F., Vaerman, J. P., & Cambiaso, C. L. (1975). A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. *J Exp Med*, 142(6), 1509-19.

Aroeira, L. G., Carvalho, C. R., Mengel, J., Garcia, G., & Vaz, N. M. (1993). Hydroxyurea before oral antigen blocks the induction of oral tolerance. *Braz J Med Biol Res*, 26(10), 1057-67.

Atisook, K., & Madara, J. L. (1991). An oligopeptide permeates intestinal tight junctions at glucose- elicited dilatations. Implications for oligopeptide absorption. *Gastroenterology*, 100(3), 719-24.

Balk, S. P., Burke, S., Polischuk, J. E., Frantz, M. E., Yang, L., Porcelli, S., Colgan, S. P., & Blumberg, R. S. (1994). Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science*, 265(5169), 259-62.

Banatvala, N., Davies, J., Kanariou, M., Strobel, S., Levinsky, R., & Morgan, G. (1994). Hypogammaglobulinaemia associated with normal or increased IgM (the hyper IgM syndrome): a case series review. *Arch Dis Child*, 71(2), 150-2.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-52.

Barone, K. S., Jain, S. L., & Michael, J. G. (1995). Effect of in vivo depletion of CD4⁺ and CD8⁺ cells on the induction and maintenance of oral tolerance. *Cell Immunol*, 163(1), 19-29.

Battistini, L., Selmaj, K., Kowal, C., Ohmen, J., Modlin, R. L., Raine, C. S., & Brosnan, C. F. (1995). Multiple sclerosis: limited diversity of the V delta 2-J delta 3 T-cell receptor in chronic active lesions. *Ann Neurol*, 37(2), 198-203.

Beeken, W., Northwood, I., Beliveau, C., & Gump, D. (1987). Phagocytes in cell suspensions of human colon mucosa. *Gut*, 28(8), 976-80.

Bersani-Amado, C. A., Barbuto, J. A., & Jancar, S. (1990). Comparative study of adjuvant induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. II. Effect of oral administration of BCG and PPD. *J Rheumatol*, 17(6), 738-42.

Besredka, A. (1909). De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxie lactique. *Ann. Inst. Pasteur*, 23, 166-174.

Bienenstock. (1974). The physiology of the local immune response and the gastrointestinal tract. *Progr. Immunology*, II, 197-207.

Bjerke, K., & Brandtzaeg, P. (1986). Immunoglobulin- and J chain-producing cells associated with lymphoid follicles in the human appendix, colon and ileum, including Peyer's patches. *Clin Exp Immunol*, 64(2), 432-41.

Bjerke, K., Brandtzaeg, P., & Fausa, O. (1988). T cell distribution is different in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches and villous epithelium. *Clin Exp Immunol*, 74(2), 270-5.

Bland, P. (1988). MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol Today*, 9(6), 174-8.

Bland, P. W., & Kambarage, D. M. (1991). Antigen handling by the epithelium and lamina propria macrophages. *Gastroenterol Clin North Am*, 20(3), 577-96.

Bland, P. W., & Warren, L. G. (1986). Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology*, 58(1), 9-14.

Bland, P. W., & Whiting, C. V. (1989). Antigen processing by isolated rat intestinal villus enterocytes. *Immunology*, 68(4), 497-502.

Bleicher, P. A., Balk, S. P., Hagen, S. J., Blumberg, R. S., Flotte, T. J., & Terhorst, C. (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science*, 250(4981), 679-82.

Bloch, K. J., Perry, R., & Bloch, M. (1983). Induction of (partial) systemic tolerance in primed rats subjected to prolonged oral administration of antigen. *Ann, N. Y. Acad. Sci.*, 409, 787-788.

Blumberg, R. S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F. V., Allan, C. H., Landau, S. B., Trier, J. S., & Balk, S. P. (1991). Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 147(8), 2518-24.

Bonneville, M., Ito, K., Krecko, E. G., Itohara, S., Kappes, D., Ishida, I., Kanagawa, O., Janeway, C. A., Murphy, D. B., & Tonegawa, S. (1989). Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by gamma delta T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(15), 5928-32.

Bonneville, M., Itohara, S., Krecko, E. G., Mombaerts, P., Ishida, I., Katsuki, M., Berns, A., Farr, A. G., Janeway, C. A., Jr., & Tonegawa, S. (1990). Transgenic mice demonstrate that epithelial homing of gamma/delta T cells is determined by cell lineages independent of T cell receptor specificity. *J Exp Med*, 171(4), 1015-26.

Bonneville, M., Janeway, C. A., Jr., Ito, K., Haser, W., Ishida, I., Nakanishi, N., & Tonegawa, S. (1988). Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of gamma delta T cells. *Nature*, 336(6198), 479-81.

Brandtzaeg, P. (1996). The human intestinal immune system: basic cellular and humoral mechanisms. *Baillieres Clin Rheumatol*, 10(1), 1-24.

Brandtzaeg, P. (1998). Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev*, 56(1 Pt 2), S5-18.

Brandtzaeg, P., & Bjerke, K. (1990). Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches. *Digestion*, 46 Suppl 2, 262-73.

Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Kett, K., Krajci, P., Kvale, D., Rognum, T. O., Scott, H., & Sollid, L. M. (1989). Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*, 97(6), 1562-84.

Brocker, T. (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med*, 186(8), 1223-32.

Bruce, M. G., & Ferguson, A. (1986). The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. *Immunology*, 59(2), 295-300.

Bruce, M. G., Strobel, S., Hanson, D. G., & Ferguson, A. (1987). Irradiated mice lose the capacity to 'process' fed antigen for systemic tolerance of delayed-type hypersensitivity. *Clin Exp Immunol*, 70(3), 611-8.

Butcher, E. C., Rouse, R. V., Coffman, R. L., Nottenburg, C. N., Hardy, R. R., & Weissman, I. L. (1982). Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J Immunol*, 129(6), 2698-707.

Cara, D. C. (1995). *Mudanças de Preferência a Sabores Induzida Imunologicamente em Camundongos*. Unpublished Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Carmack, C. E., Shinton, S. A., Hayakawa, K., & Hardy, R. R. (1990). Rearrangement and selection of VH11 in the Ly-1 B cell lineage. *J Exp Med*, 172(1), 371-4.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., & Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med*, 180(5), 1841-7.

Challacombe, S. J. (1983). Salivary antibodies and systemic tolerance in mice after oral immunization with bacterial antigens. *Ann N Y Acad Sci*, 409, 177-93.

Challacombe, S. J., & Tomasi, T. B., Jr. (1980). Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J Exp Med*, 152(6), 1459-72.

Chase, M. (1945). Cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 59, 134-135.

Chase, M. (1949). Studies on the mechanism of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agents. *Bacteriol. Proc.*, 49, 75.

Cheroutre, H., Holcombe, H. R., Tangri, S., Castano, A. R., Teitell, M., Miller, J. E., Cardell, S., Benoist, C., Mathis, D., Huse, W. D., & et al. (1995). Antigen-presenting function of the TL antigen and mouse CD1 molecules. *Immunol Rev*, 147, 31-52.

Chung, S. W., Gorczynski, R. M., Dziadkowiec, I., & Levy, G. A. (1995). Induction of T-cell hyporesponsiveness by intrahepatic modulation of donor antigen-presenting cells. *Immunology*, 85(4), 582-90.

Conde, A. A., Stransky, B., Faria, A. M. C., & Vaz, N. M. (1998). Interruption of recently induced immune responses by oral administration of antigen. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 377-380.

Crispe, I. N., & Mehal, W. Z. (1996). Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today*, 17(11), 522-5.

Croft, M., Duncan, D. D., & Swain, S. L. (1992). Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med*, 176(5), 1431-7.

Croituru, K., & Bienenstock, J. (1994). Characteristics and Functions of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. In P. L. Ogra, W. Sroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of mucosal immunology*, (pp. 141-149). San Diego: Academic Press.

D'Imperio Lima, M. R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kipnis, T., & Eisen, H. (1985). Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol*, 15(2), 201-3.

Daynes, R. A., & Araneo, B. A. (1992). Natural regulators of T-cell lymphokine production in vivo. *J Immunother*, 12(3), 174-9.

Daynes, R. A., Araneo, B. A., Ershler, W. B., Maloney, C., Li, G. Z., & Ryu, S. Y. (1993). Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *J Immunol*, 150(12), 5219-30.

De Geus, B., Van den Enden, M., Coolen, C., Nagelkerken, L., Van der Heijden, P., & Rozing, J. (1990). Phenotype of intraepithelial lymphocytes in euthymic and athymic mice: implications for differentiation of cells bearing a CD3-associated gamma delta T cell receptor. *Eur J Immunol*, 20(2), 291-8.

Dobbins, W. O. d. (1986). Human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gut*, 27(8), 972-85.

Eastwood, G. L. (1977). Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterology*, 962-75.

Ermak, T. H., & Owen, R. L. (1986). Differential distribution of lymphocytes and accessory cells in mouse Peyer's patches. *Anat Rec*, 215(2), 144-52.

Faria, A. M., Ficker, S. M., Speziali, E., Menezes, I. S., Stransky, B., Verdolin, B. A., Lahmann, W. M., Rodrigues, V. S., & Vaz, N. M. (1998a). Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Braz J Med Biol Res*, 31(1), 35-48.

Faria, A. M., Ficker, S. M., Speziali, E., Menezes, J. S., Stransky, B., Silva Rodrigues, V., & Vaz, N. M. (1998b). Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev*, 102(1), 67-80.

Faria, A. M., Garcia, G., Rios, M. J., Michalaros, C. L., & Vaz, N. M. (1993). Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology*, 78(1), 147-51.

Faria, A. M. C. (1989). *Consequências Imunológicas da Administração de Antígeno por Via Oral em Camundongos*. Unpublished Dissertação de Mestrado, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte.

Ferraris, R. P. (1994). Regulation of Intestinal Nutrient Transport. In L. R. Johnson (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, (3^a ed., Vol. 2, pp. 1821-1844). New York: Raven Press.

Fisher, R. B. (1954). *Protein Metabolism*. London: Methuen.

Forster, I., Gu, H., & Rajewsky, K. (1988). Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *Embo J*, 7(12), 3693-703.

Fox, S. W., & Foster, J. F. (1957). Some notable protein systems, *Introduction to protein chemistry*, (pp. 353-365). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Freitas, A. A., & Coutinho, A. (1981). Very rapid decay of mature B lymphocytes in the spleen. *J Exp Med*, 154(3), 994-9.

Fry, R. J. M., Leshner, S., & Kohn, H. I. (1961). Age effect on cell-transit time in mouse jejunal epithelium. *Am J Physiol*, 201, 213-216.

Fujiwara, H., Qian, J. H., Satoh, S., Kokudo, S., Ikegami, R., & Hamaoka, T. (1986). Studies on the induction of tolerance to alloantigens. II. The generation of serum factor(s) able to transfer alloantigen-specific tolerance for delayed-type hypersensitivity by portal venous inoculation with allogeneic cells. *J Immunol*, 136(8), 2763-8.

Furrie, E., Turner, M. W., & Strobel, S. (1994). Failure of SCID mice to generate an oral tolerogen after a feed of ovalbumin: a role for a functioning gut-associated lymphoid system. *Immunology*, 83(4), 562-7.

Furrie, E., Turner, M. W., & Strobel, S. (1995). Partial characterization of a circulating tolerogenic moiety which, after a feed of ovalbumin, suppresses delayed-type hypersensitivity in recipient mice. *Immunology*, 86(3), 480-6.

Garside, P., Steel, M., Liew, F. Y., & Mowat, A. M. (1995a). CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. *Int Immunol*, 7(3), 501-4.

Garside, P., Steel, M., Worthey, E. A., Satoskar, A., Alexander, J., Bluthmann, H., Liew, F. Y., & Mowat, A. M. (1995b). T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J Immunol*, 154(11), 5649-55.

George, A. J., & Ritter, M. A. (1996). Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? [see comments]. *Immunol Today*, 17(6), 267-72.

Goidl, E. A., Thorbecke, G. J., Weksler, M. E., & Siskind, C. W. (1980). Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response: changes in the auto-anti-idiotypic antibody response and the idiotype repertoire associated with aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(11), 6788-92.

Golder, J. P., & Doe, W. F. (1983). Isolation and preliminary characterization of human intestinal macrophages. *Gastroenterology*, 84(4), 795-802.

Goodman, T., & Lefrancois, L. (1988). Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature*, 333(6176), 855-8.

Goodman, T., & Lefrancois, L. (1989). Intraepithelial lymphocytes. Anatomical site, not T cell receptor form, dictates phenotype and function. *J Exp Med*, 170(5), 1569-81.

Gorczyński, R. M. (1994). Adoptive transfer of unresponsiveness to allogeneic skin grafts with hepatic gamma delta + T cells. *Immunology*, 81(1), 27-35.

Gorczyński, R. M., Chen, Z., Hoang, Y., & Rossi-Bergman, B. (1996). A subset of gamma delta T-cell receptor-positive cells produce T-helper type-2 cytokines and regulate mouse skin graft rejection following portal venous pretransplant preimmunization. *Immunology*, 87(3), 381-9.

Gorczyński, R. M., Cohen, Z., Levy, G., & Fu, X. M. (1996). A role for gamma(delta)TCR+ cells in regulation of rejection of small intestinal allografts in rats. *Transplantation*, 62(6), 844-51.

Gorczyński, R. M., Hozumi, N., Wolf, S., & Chen, Z. (1995). Interleukin 12 in combination with anti-interleukin 10 reverses graft prolongation after portal venous immunization. *Transplantation*, 60(11), 1337-41.

Green, F. H. Y., & Freed, D. L. J. (1978). Antibody facilitated digestion and the consequences of its failure. In W. A. Hemmings (Ed.), *Antigen Absorption by the Gut*, (pp. 226). Lancaster, England: MTP Press Limited.

Guy Grand, D., Cerf Bensussan, N., Malissen, B., Malassis Seris, M., Briottet, C., & Vassalli, P. (1991). Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med*, 173(2), 471-81.

Guy-Grand, D., Griscelli, C., & Vassalli, P. (1978). The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J Exp Med*, 148(6), 1661-77.

Guy-Grand, D., Malassis-Seris, M., Briottet, C., & Vassalli, P. (1991). Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J Exp Med*, 173(6), 1549-52.

Hagemann, R. F., Sigdestad, C. P., & Lesher, S. (1970). A quantitative description of the intestinal epithelium of the mouse. *Am J Anat*, 129(1), 41-51.

Hall, J. G. (1978). The traffic of lymphocytes through the gut of mammals. In W. A. Hemmings (Ed.), *Antigen Absorption by the Gut*, (pp. 207-217). Lancaster, England: MTP Press Limited.

Halstensen, T. S., Scott, H., & Brandtzaeg, P. (1990). Human CD8⁺ intraepithelial T lymphocytes are mainly CD45RA-RB⁺ and show increased co-expression of CD45R0 in celiac disease. *Eur J Immunol*, 20(8), 1825-30.

Hanson, D. G. (1981). Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns. *J Immunol*, 127(4), 1518-24.

Hanson, D. G., Roy, M. J., Green, G. M., & Miller, S. D. (1993). Inhibition of orally-induced immune tolerance in mice by prefeeding an endopeptidase inhibitor. *Reg Immunol*, 5(2), 76-84.

Hanson, D. G., Vaz, N. M., Maia, L. C., Hornbrook, M. M., Lynch, J. M., & Roy, C. A. (1977). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 55(1-6), 526-32.

Hanson, D. G., Vaz, N. M., Rawlings, L. A., & Lynch, J. M. (1979). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Effects of prior passive and active immunization. *J Immunol*, 122(6), 2261-6.

Hardy, R., & Hayakawa, K. (1992). Generation of Ly-1 B cells from developmentally distinct precursors. Enrichment by stromal-cell culture or cell sorting. *Ann NY Acad Sci*, 651, 99-111.

Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Riblet, R. J., & Hayakawa, K. (1989). A single VH gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the VH11 family. *J Immunol*, 142(10), 3643-51.

Hardy, R. R., & Hayakawa, K. (1986). Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B. *Immunol Rev*, 93, 53-79.

Harvey, J., & Jones, D. B. (1991). Human mucosal T lymphocyte and macrophage subpopulations in normal and inflamed intestine. *Clin Exp Allergy*, 21(5), 549-60.

Hayakawa, K., & Hardy, R. R. (1988). Normal, autoimmune, and malignant CD5⁺ B cells: the Ly-1 B lineage? *Annu Rev Immunol*, 6, 197-218.

Hershberg, R., Eghtesady, P., Sydora, B., Brorson, K., Cheroutre, H., Modlin, R., & Kronenberg, M. (1990). Expression of the thymus leukemia antigen in mouse intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24), 9727-31.

Herzenberg, L. A., Stall, A. M., Lalor, P. A., Sidman, C., Moore, W. A., Parks, D. R., & Herzenberg, L. A. (1986). The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev*, 93, 81-102.

Higgins, P. J., & Weiner, H. L. (1988). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. *J Immunol*, 140(2), 440-5.

Holt, P. G., Britten, D., & Sedgwick, J. D. (1987). Suppression of IgE responses by antigen inhalation: studies on the role of genetic and environmental factors. *Immunology*, 60(1), 97-102.

Holt, P. R., Pascal, R. R., & Kotler, D. P. (1984). Effect of aging upon small intestinal structure in the Fischer rat. *J Gerontol*, 39(6), 642-7.

Hoyne, G. F., Callow, M. G., Kuo, M. C., & Thomas, W. R. (1993). Presentation of peptides and proteins by intestinal epithelial cells. *Immunology*, 80(2), 204-8.

Hummel, K. P., Richardson, F. L., & Fekete, E. (1966). *Biology of the Laboratory Mouse*. New York: Dover.

Husby, S., Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Holland, S., & Elson, C. O. (1994). Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J Immunol*, 152(9), 4663-70.

Imani, F., & Soloski, M. J. (1991). Heat shock proteins can regulate expression of the Tla region-encoded class Ib molecule Qa-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23), 10475-9.

Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., & Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med*, 178(2), 479-88.

Inaba, K., Pack, M., Inaba, M., Sakuta, H., Isdell, F., & Steinman, R. M. (1997). High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med*, 186(5), 665-72.

Inaba, K., & Steinman, R. M. (1984). Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp Med*, 160(6), 1717-35.

Inaba, K., Witmer, P. M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., & et, a. I. (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med*, 180(5), 1849-60.

James, S. P. (1991). Mucosal T-cell function. *Gastroenterol Clin North Am*, 20(3), 597-612.

James, S. P., Fiocchi, C., Graeff, A. S., & Strober, W. (1986). Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterology*, 91(6), 1483-9.

Jarry, A., Cerf-Bensussan, N., Brousse, N., Selz, F., & Guy-Grand, D. (1990). Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol*, 20(5), 1097-103.

Jerne, N. K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*, 125C(1-2), 373-89.

Kabat, E. A. (1968). *Structural concepts in immunology and immunochemistry*. New York: Holt Rinehart & Winston Inc.

Kagnoff, M. F. (1981). Immunology of the digestive system. In L. R. Johnson (Ed.), *Physiology of the Digestive System*, (pp. 1337-1359). New York: Raven Press.

Kagnoff, M. F. (1982). Oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 392, 248-65.

Kagnoff, M. F. (1980). Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. IV. Similarity between the suppressor factor in mice after erythrocyte-lysate injection and erythrocyte feeding. *Gastroenterology*, 79(1), 54-61.

Kagnoff, M. F. (1978). Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. II. Suppression of delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol*, 120(5), 1509-13.

Kaiserlian, D. (1991). Murine gut epithelial cells express Ia molecules antigenically distinct from those of conventional antigen-presenting cells. *Immunol Res*, 10(3-4), 360-4.

Kaiserlian, D., Nicolas, J. F., & Revillard, J. P. (1990). Constitutive expression of Ia molecules by murine epithelial cells: a comparison between keratinocytes and enterocytes [letter; comment]. *J Invest Dermatol*, 94(3), 385-6.

Kaiserlian, D., Vidal, K., & Revillard, J. P. (1989). Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II- restricted CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 19(8), 1513-6.

Kammer, G. M., & Unanue, E. R. (1980). Accessory cell requirement in the proliferative response of T lymphocytes to hemocyanin. *Clin Immunol Immunopathol*, 15(3), 434-43.

Kantor, A. B., & Herzenberg, L. A. (1993). Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 11, 501-38.

Kantor, A. B., Stall, A. M., Adams, S., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1992). Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8), 3320-4.

Kantor, A. (1991). A new nomenclature for B cells. *Immunol Today*, 12(11), 388.

Kato, T., & Owen, R. L. (1994). Structure and Function of Intestinal Mucosal Epithelium. In P. L. Ogra, W. Stroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (pp. 11-26). San Diego: Academic Press.

Kawanishi, H., & Kiely, J. (1987). Immunoregulatory defects in murine aged Peyer's patches. *Eur J Immunol*, 17(9), 1223-8.

- Kay, R. A., & Ferguson, A. (1989). The immunological consequences of feeding cholera toxin. II. Mechanisms responsible for the induction of oral tolerance for DTH. *Immunology*, 66(3), 416-21.
- Ke, Y., & Kapp, J. A. (1996). Oral antigen inhibits priming of CD8⁺ CTL, CD4⁺ T cells, and antibody responses while activating CD8⁺ suppressor T cells. *J Immunol*, 156(3), 916-21.
- Keren, D. F. (1992). Antigen processing in the mucosal immune system. *Semin Immunol*, 4(4), 217-26.
- Kipps, T. J. (1989). The CD5 B cell. *Adv Immunol*, 47, 117-85.
- Kitajima, T., Ariizumi, K., Bergstresser, P. R., & Takashima, A. (1996). A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J Clin Invest*, 98(1), 142-7.
- Kiyono, H., & McGhee, J. R. (1994). T Helper Cells for Mucosal Immune responses. In P. L. Ogra, W. Sroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (pp. 263-274). San Diego: Academic Press.
- Klein, J. R. (1986). Ontogeny of the Thy-1-, Lyt-2⁺ murine intestinal intraepithelial lymphocyte. Characterization of a unique population of thymus-independent cytotoxic effector cells in the intestinal mucosa. *J Exp Med*, 164(1), 309-14.
- Koyama, K., Hosokawa, T., & Aoike, A. (1990). Aging effect on the immune functions of murine gut-associated lymphoid tissues. *Dev Comp Immunol*, 14(4), 465-73.
- Kraehenbuhl, J. P., & Neutra, M. R. (1992). Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev*, 72(4), 853-79.
- Kroese, F. G., Butcher, E. C., Stall, A. M., Lalor, P. A., Adams, S., & Herzenberg, L. A. (1989). Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol*, 1(1), 75-84.
- Kroese, F. G. M., Kantor, A. B., & Herzenberg, L. A. (1994). The Role of B-1 Cells in Mucosal Immune Responses. In P. L. Ogra, W. Sroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of mucosal immunology*, (pp. 217-224). San Diego: Academic Press.
- Lafont, S., Andre, C., Andre, F., Gillon, J., & Fargier, M. C. (1982). Abrogation by subsequent feeding of antibody response including IgE, in parenterally immunized mice. *J Exp Med*, 155(5), 1573-8.
- Lahmann, W. M., Menezes, J. S., Verdolin, B. A., & Vaz, N. M. (1992). Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. *Braz J Med Biol Res*, 25(8), 813-21.
- Lalor, P. A., Herzenberg, L. A., Adams, S., & Stall, A. M. (1989). Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur J Immunol*, 19(3), 507-13.
- Lamont, A. G., Mowat, A. M., Browning, M. J., & Parrott, D. M. (1988). Genetic control of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunology*, 63(4), 737-9.

Lamont, J. T. (1992). Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. *Ann N Y Acad Sci*, 664, 190-201.

Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*, 314(6011), 537-9.

Lee, J. S. (1971). Contraction of villi and fluid transport in dog jejunal mucosa in vitro. *Am J Physiol*, 221(2), 488-95.

Lefrancois, L. (1991). Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol*, 147(6), 1746-51.

Lefrancois, L. (1994). Basic Aspects of Intraepithelial Lymphocyte Immunobiology. In P. L. Ogra, W. Stroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (pp. 287-297). San Diego: Academic Press.

Li, Y., Yio, X. Y., & Mayer, L. (1995). Human intestinal epithelial cell-induced CD8+ T cell activation is mediated through CD8 and the activation of CD8-associated p56lck. *J Exp Med*, 182(4), 1079-88.

Liu, L. M., & MacPherson, G. G. (1993). Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J Exp Med*, 177(5), 1299-307.

Lopes, L. M. (1987). *Ativação Policlonal de Linfócitos B na Esquistosomose Mansônica Experimental*. Unpublished Dissertação de Mestrado, ICB, UFMG, Belo Horizonte.

Louis, E., Franchimont, D., Deprez, M., Lamproye, A., Schaaf, N., Mahieu, P., & Belaiche, J. (1996). Decrease in systemic tolerance to fed ovalbumin in indomethacin-treated mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 109(1), 21-6.

Louis, E., Franchimont, D., Lamproye, A., van Kemseke, C., Schaaf, N., Mahieu, P., & Belaiche, J. (1995). Systemic immune response after rectocolonic administration of ovalbumin in mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 108(1), 19-23.

Lyscom, N., & Brueton, M. J. (1982). Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology*, 45(4), 775-83.

Lyscom, N., & Brueton, M. J. (1983). The development of intraepithelial and Peyer's patch lymphocyte sub- types in the small intestine of newborn rats. *Clin Exp Immunol*, 54(1), 158-62.

Macatonia, S. E., Knight, S. C., Edwards, A. J., Griffiths, S., & Fryer, P. (1987). Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med*, 166(6), 1654-67.

MacDonald, T. T., & Carter, P. B. (1982). Isolation and functional characteristics of adherent phagocytic cells from mouse Peyer's patches. *Immunology*, 45(4), 769-74.

MacDonald, T. T., & Spencer, J. (1994). Gut-Associated Lymphoid Tissue. In P. L. Ogra, W. Stroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (pp. 415-424). San Diego: Academic Press.

MacPherson, G. G., Jenkins, C. D., Stein, M. J., & Edwards, C. (1995). Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol*, 154(3), 1317-22.

Madara, J. L., Parkos, C., Colgan, S., Nusrat, A., Atisook, K., & Kaoutzani, P. (1992). The movement of solutes and cells across tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 664, 47-60.

Mahida, Y. R., Wu, K. C., & Jewell, D. P. (1988). Characterization of antigen-presenting activity of intestinal mononuclear cells isolated from normal and inflammatory bowel disease colon and ileum. *Immunology*, 65(4), 543-9.

Marshall, R. D., & Neuberger, A. (1959). Hen's egg albumin, *The proteins*, (Vol. 1, pp. 732-761).

Matthews, D. M. (1974). Absorption of amino acids and peptides from the intestine. *Clin Endocrinol Metab*, 3(1), 3-16.

Mayer, L., Eisenhardt, D., Salomon, P., Bauer, W., Plous, R., & Piccinini, L. (1991). Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease [see comments]. *Gastroenterology*, 100(1), 3-12.

Mayer, L., Panja, A., & Li, Y. (1991). Antigen recognition in the gastrointestinal tract: death to the dogma. *Immunol Res*, 10(3-4), 356-9.

Mayer, L., Panja, A., Li, Y., Siden, E., Pizzimenti, A., Gerardi, F., & Chandswang, N. (1992). Unique features of antigen presentation in the intestine. *Ann N Y Acad Sci*, 664(39), 39-46.

Mayer, L., & Shlien, R. (1987). Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med*, 166(5), 1471-83.

Mayer, L., So, L. P., Yio, X. Y., & Small, G. (1996). Antigen trafficking in the intestine. *Ann N Y Acad Sci*, 778, 28-35.

Mayrhofer, G., Pugh, C. W., & Barclay, A. N. (1983). The distribution, ontogeny and origin in the rat of Ia-positive cells with dendritic morphology and of Ia antigen in epithelia, with special reference to the intestine. *Eur J Immunol*, 13(2), 112-22.

McDermott, M. R., & Bienenstock, J. (1979). Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol*, 122(5), 1892-8.

McGhee, J. R., Mestecky, J., Elson, C. O., & Kiyono, H. (1989). Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol*, 9(3), 175-99.

McMenamin, C., McKersey, M., Kuhnlein, P., Hunig, T., & Holt, P. G. (1995). Gamma delta T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol*, 154(9), 4390-4.

Mega, J., Bruce, M. G., Beagley, K. W., McGhee, J. R., Taguchi, T., Pitts, A. M., McGhee, M. L., Bucy, R. P., Eldridge, J. H., Mestecky, J., & et, a. I. (1991). Regulation of mucosal responses by CD4+ T lymphocytes: effects of anti- L3T4 treatment on the gastrointestinal immune system. *Int Immunol*, 3(8), 793-805.

Melamed, D., & Friedman, A. (1994). In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur J Immunol*, 24(9), 1974-81.

Mengel, J., Cardillo, F., Aroeira, L. S., Williams, O., Russo, M., & Vaz, N. M. (1995). Anti-gamma delta T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol Lett*, 48(2), 97-102.

Mestecky, J. (1987). The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol*, 7(4), 265-76.

Metlay, J. P., Pure, E., & Steinman, R. M. (1989). Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells: a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes. *Adv Immunol*, 47, 45-116.

Michael, J. G. (1989). The role of digestive enzymes in orally induced immune tolerance. *Immunol Invest*, 18(9-10), 1049-54.

Miller, S. D., & Hanson, D. G. (1979). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin. *J Immunol*, 123(5), 2344-50.

Moll, H., Fuchs, H., Blank, C., & Rollinghoff, M. (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol*, 23(7), 1595-601.

Moog, F. (1981). The lining of the small intestine. *Sci Am*, 245(5), 154-8.

Moutcastle, V. B. (1974). *Fisiologia Médica. Vol II.* (13^a ed. ed.). Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.

Mowat, A. M. (1994). Oral Tolerance and Regulation of Immunity to Dietary Antigens. In P. L. Ogra, W. Stroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (pp. 185-201). San Diego: Academic Press.

Mowat, A. M., Strobel, S., Drummond, H. E., & Ferguson, A. (1982). Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology*, 45(1), 105-13.

Mowat, A. M., Lamont, A. G., & Bruce, M. G. (1987). A genetically determined lack of oral tolerance to ovalbumin is due to failure of the immune system to respond to intestinally derived tolerogen. *Eur J Immunol*, 17(11), 1673-6.

Mowat, A. M., & Viney, J. L. (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev*, 156, 145-66.

Mowat, A. M., & Weiner, H. L. (1998). Oral Tolerance: Physiological Basis and Clinical Applications. In P. L. Ogra, W. Sroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (Second ed.,). San Diego: Academic Press.

Munk, M. E., Schoel, B., Modrow, S., Karr, R. W., Young, R. A., & Kaufmann, S. H. (1989). T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self- epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J Immunol*, 143(9), 2844-9.

Nagelkerken, L., Hertogh-Huijbregts, A., Dobber, R., & Drager, A. (1991). Age-related changes in lymphokine production related to a decreased number of CD45RBhi CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 21(2), 273-81.

Ngan, J., & Kind, L. S. (1978). Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J Immunol*, 120(3), 861-5.

Nicklin, S. (1987). Intestinal Uptake of Antigen - Immunological Consequences. In K. Miller & S. Nicklin (Eds.), *Immunology of the Gastrointestinal Tract*, (Vol. I, pp. 87-109). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Panja, A., Blumberg, R. S., Balk, S. P., & Mayer, L. (1993). CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med*, 178(3), 1115-9.

Panja, A., & Mayer, L. (1994). Diversity and Function of Antigen-Presenting Cells in Mucosal Tissues. In P. L. Ogra, W. Sroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (pp. 177-183). San Diego: Academic Press.

Parrott, D. M., Tait, C., MacKenzie, S., Mowat, A. M., Davies, M. D., & Micklem, H. S. (1983). Analysis of the effector functions of different populations of mucosal lymphocytes. *Ann NY Acad Sci*, 409, 307-20.

Pavli, P., Woodhams, C. E., Doe, W. F., & Hume, D. A. (1990). Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology*, 70(1), 40-7.

→ Peng, H. J., Turner, M. W., & Strobel, S. (1989a). Failure to induce oral tolerance to protein antigens in neonatal mice can be corrected by transfer of adult spleen cells. *Pediatr Res*, 26(5), 486-90.

Peng, H. J., Turner, M. W., & Strobel, S. (1989b). The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunology*, 67(3), 425-30.

Peng, H. J., Turner, M. W., & Strobel, S. (1990). The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin Exp Immunol*, 81(3), 510-5.

Pennell, C. A., Arnold, L. W., Haughton, G., & Clarke, S. H. (1988). Restricted Ig variable region gene expression among Ly-1+ B cell lymphomas. *J Immunol*, 141(8), 2788-96.

Phillips-Quagliata, J. M., & Lamm, M. E. (1994). Lymphocyte Homing to Mucosal Effector Sites. In P. L. Ogra, W. Stroben, J. Mestecky, J. R. McGhee, M. E. Lamm, & J. E. Bienenstock (Eds.), *Handbook of Mucosal Immunology*, (pp. 225-239). San Diego: Academic Press.

Philosophe, B., & Miller, R. A. (1990). Diminished calcium signal generation in subsets of T lymphocytes that predominate in old mice. *J Gerontol*, 45(3), B87-93.

Qian, J., Hashimoto, T., Fujiwara, H., & Hamaoka, T. (1985). Studies on the induction of tolerance to alloantigens. I. The abrogation of potentials for delayed-type-hypersensitivity response to alloantigens by portal venous inoculation with allogeneic cells. *J Immunol*, 134(6), 3656-61.

Reis, e, Sousa, C, Stahl, P. D., & Austyn, J. M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med*, 178(2), 509-19.

Reville, M., Gosse, F., Kachelhoffer, J., Doffoel, M., & Raul, F. (1991). Ileal compensation for age-dependent loss of jejunal function in rats. *J Nutr*, 121(4), 498-503.

Richman, L. K. (1978). Enterically-induced immunological tolerance. *Immunology of Breast Milk*, 49-62.

Rios, M. J., Pereira, M. A., Lopes, L. M., Faria, A. M., Gontijo, C. M., Castanheira, E. B., & Vaz, N. M. (1988). Tolerance induction and immunological priming initiated by mucosal contacts with protein antigens in inbred strains of mice. *Braz J Med Biol Res*, 21(4), 825-36.

Rocha, B., Vassalli, P., & Guy, G. D. (1991). The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *J Exp Med*, 173(2), 483-6.

Rodewald, R., & Kraehenbuhl, J. P. (1984). Receptor-mediated transport of IgG. *J Cell Biol*, 159s-164s.

Roux, M. E., McWilliams, M., Phillips-Quagliata, J. M., & Lamm, M. E. (1981). Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell Immunol*, 61(1), 141-53.

Rubin, D., Weiner, H. L., Fields, B. N., & Greene, M. I. (1981). Immunologic tolerance after oral administration of reovirus: requirement for two viral gene products for tolerance induction. *J Immunol*, 127(4), 1697-701.

Saklayen, M. G., Pesce, A. J., Pollak, V. E., & Michael, J. G. (1984). Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 73(1), 5-9.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [see comments]. *J Exp Med*, 182(2), 389-400.

Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179(4), 1109-18.

Sanderson, I. R., & Walker, W. A. (1995). Uptake and Transport of Macromolecules by the Intestine. In A. L. Weck & H. A. Sampson (Eds.), *Intestinal Immunology and Food Allergy*, (Vol. 34, pp. 19-36). New York: Raven Press.

Sato, S., Qian, J. H., Kokudo, S., Ikegami, R., Suda, T., Hamaoka, T., & Fujiwara, H. (1988). Studies on the induction of tolerance to alloantigens. III. Induction of antibodies directed against alloantigen-specific delayed-type hypersensitivity T cells by a single injection of allogeneic lymphocytes via portal venous route. *J Immunol*, 140(3), 717-22.

Sayegh, M. H., Zhang, Z. J., Hancock, W. W., Kwok, C. A., Carpenter, C. B., & Weiner, H. L. (1992). Down-regulation of the immune response to histocompatibility antigens and prevention of sensitization by skin allografts by orally administered alloantigen. *Transplantation*, 53(1), 163-6.

Schieferdecker, H. L., Ullrich, R., Weiss-Breckwoldt, A. N., Schwarting, R., Stein, H., Riecken, E. O., & Zeitz, M. (1990). The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J Immunol*, 144(7), 2541-9.

Schild, H., Mavaddat, N., Litzenberger, C., Ehrlich, E. W., Davis, M. M., Bluestone, J. A., Matis, L., Draper, R. K., & Chien, Y. H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell*, 76(1), 29-37.

Selby, W. S., Poulter, L. W., Hobbs, S., Jewell, D. P., & Janossy, G. (1983). Heterogeneity of HLA-DR-positive histiocytes in human intestinal lamina propria: a combined histochemical and immunohistological analysis. *J Clin Pathol*, 36(4), 379-84.

Shanahan, F. (1994). The Intestinal Immune System. In L. R. Johnson (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, (3rd ed., Vol. I, pp. 643-684). New York: Raven Press.

Silk, D. B. (1974). Progress report. Peptide absorption in man. *Gut*, 15(6), 494-501.

Sminia, T., & Jeurissen, S. H. (1986). The macrophage population of the gastrointestinal tract of the rat. *Immunobiology*, 172(1-2), 72-80.

Soesatyo, M., Biewenga, J., Kraal, G., & Sminia, T. (1990). The localization of macrophage subsets and dendritic cells in the gastrointestinal tract of the mouse with special reference to the presence of high endothelial venules. An immuno- and enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res*, 259(3), 587-93.

Solvason, N., Lehuen, A., & Kearney, J. F. (1991). An embryonic source of Ly1 but not conventional B cells. *Int Immunol*, 3(6), 543-50.

Spalding, D. M., & Griffin, J. A. (1986). Different pathways of differentiation of pre-B cell lines are induced by dendritic cells and T cells from different lymphoid tissues. *Cell*, 44(3), 507-15.

Spalding, D. M., Koopman, W. J., Eldridge, J. H., McGhee, J. R., & Steinman, R. M. (1983). Accessory cells in murine Peyer's patch. I. Identification and enrichment of a functional dendritic cell. *J Exp Med*, 157(5), 1646-59.

Spalding, D. M., Williamson, S. I., Koopman, W. J., & McGhee, J. R. (1984). Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell-T cell mixtures. *J Exp Med*, 160(3), 941-6.

Spencer, J., MacDonald, T. T., & Isaacson, P. G. (1987). Heterogeneity of non-lymphoid cells expressing HLA-D region antigens in human fetal gut. *Clin Exp Immunol*, 67(2), 415-24.

Staples, P. J., & Talal, N. (1969). Relative inability to induce tolerance in adult NZB and NZB-NZW F1 mice. *J Exp Med*, 129(1), 123-39.

Stephens, R. J., & Thomson, A. W. (1996). Dendritic cells and tolerance induction. *Clin Exp Immunol*, 105(3), 397-402.

Stevens, L. (1991). Egg white proteins. *Comp Biochem Physiol [B]*, 100(1), 1-9.

Stites, D. P., & Terr, A. I. (1992). *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro, RJ: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda.

Stok, W., van der Heijden, P. J., & Bianchi, A. T. (1994). Conversion of orally induced suppression of the mucosal immune response to ovalbumin into stimulation by conjugating ovalbumin to cholera toxin or its B subunit. *Vaccine*, 12(6), 521-6.

Stokes, C. R., Swarbrick, E. T., & Soothill, J. F. (1983). Genetic differences in immune exclusion and partial tolerance to ingested antigens. *Clin Exp Immunol*, 52(3), 678-84.

Stokes, C. R., Newby, T. J., Huntley, J. H., Patel, D., & Bourne, F. J. (1979). The immune response of mice to bacterial antigens given by mouth. *Immunology*, 38(3), 497-502.

Stransky, B. (1996). *As Fases Iniciais da Tolerância Oral*. Unpublished Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte.

Stransky, B., Faria, A. M. C., & Vaz, N. M. (1998). Oral tolerance induction with altered forms of ovalbumin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31, 381-386.

Strobel, S. (1993). Mechanisms of mucosal immunology and gastrointestinal damage. *Pediatr Allergy Immunol*, 4(3 Suppl), 25-32.

Strobel, S. (1996). Neonatal oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*, 778(Feb 13), 88-102.

Strobel, S., & Ferguson, A. (1984a). Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatr Res*, 18(7), 588-94.

Strobel, S., & Ferguson, A. (1984b). Immune responses to fed protein antigens in mice. III. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatr Res*, 18(7), 588-594.

Strobel, S., Mowat, A. M., Drummond, H. E., Pickering, M. G., & Ferguson, A. (1983). Immunological responses to fed protein antigens in mice. II. Oral tolerance for CMI is due to activation of cyclophosphamide-sensitive cells by gut-processed antigen. *Immunology*, 49(3), 451-6.

Svensson, M., Stockinger, B., & Wick, M. J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol*, 158(9), 4229-36.

Swarbrick, E. T. (1979). *Antigen processing by the intestine*. Unpublished M. D. Thesis, University of London.

Tarlinton, D., Stall, A. M., & Herzenberg, L. A. (1988). Repetitive usage of immunoglobulin VH and D gene segments in CD5+ Ly-1 B clones of (NZB x NZW)F1 mice. *Embo J*, 7(12), 3705-10.

Thoman, M. L., & Weigle, W. O. (1989). The cellular and subcellular bases of immunosenescence. *Adv Immunol*, 46, 221-61.

Thomas, H. C., & Parrott, M. V. (1974). The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology*, 27(4), 631-9.

Thomas, H. C., Ryan, C. J., Benjamin, I. S., Blumgart, L. H., & MacSween, R. N. (1976). The immune response in cirrhotic rats. The induction of tolerance to orally administered protein antigens. *Gastroenterology*, 71(1), 114-7.

Titus, R. G., & Chiller, J. M. (1981). A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. *J Immunol Methods*, 45(1), 65-78.

Tomasi, T. J. (1980). Oral tolerance. *Transplantation*, 29(5), 353-6.

Trier, J. S. (1991). Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am*, 20(3), 531-47.

Turner, M. W., Boulton, P., & Strobel, S. (1995). Experimental intestinal hypersensitivity. Effect of four anti-allergic drugs on protein uptake, permeability to sugars and mucosal mast-cell activation. *Clin Exp Allergy*, 25(5), 448-55.

Ugolev, A. M. (1972). Progress report: membrane digestion. *Gut*, 13, 735-747.

Van der Heijden, P. J., Bianchi, A. T., Bokhout, B. A., Dol, M., Scholten, J. W., & Stok, W. (1989). Quantification of antigen-specific antibody-secreting cells in the small intestine and other lymphoid organs of mice after oral booster immunization. *Immunology*, 66(3), 404-9.

Van der Heijden, P. J., Bianchi, A. T., Stok, W., & Bokhout, B. A. (1988). Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine as a function of age. *Immunology*, 65(2), 243-8.

van der Heijden, P. J., Stok, W., & Bianchi, A. T. (1987). Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology*, 62(4), 551-5.

Van, W. E., Van, H. I., Breve, J., Scheper, R. J., & Kraal, G. (1994). Dendritic cells of the oral mucosa and the induction of oral tolerance. A local affair. *Immunology*, 83(1), 128-32.

Vaz, N., Faria, A. M., Verdolin, B. A., & Carvalho, C. R. (1997). Immaturity, ageing and oral tolerance. *Scand J Immunol*, 46(3), 225-9.

Vaz, N. M. (1988). Ordem e desordem: uma abordagem imunológica. *Ciência e Cultura*, 40, 452-459.

Vaz, N. M., & Faria, A. M. C. (1993). *Guia Incompleto de Imunobiologia (Imunologia como se o organismo importasse)*. Belo Horizonte: COOPMED.

Vaz, N. M., Maia, L. C., Hanson, D. G., & Lynch, J. M. (1977). Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol*, 60(2), 110-5.

Vaz, N. M., Rios, M. J., Lopes, L. M., Gontijo, C. M., Castanheira, E. B., Jacquemart, F., & Andrade, L. A. (1987). Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. *Braz J Med Biol Res*, 20(6), 785-90.

Verdolin, B. A., Carvalho, C. R., & Vaz, N. M. (1996,). *Inhibition of oral tolerance induction by polyspecific mouse immunoglobulins*. Paper presented at the IV Latin American Congress of Immunology.

Verdolin, B. A., Faria, A. M., Carvalho, C. R., Lahmann, W. M., & Vaz, N. M. (1993). Systemic immunization of mature mice by the oral route. *Braz J Med Biol Res*, 26(7), 725-34.

Viney, J. L., Mowat, A. M., O'Malley, J. M., Williamson, E., & Fanger, N. A. (1998). Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol*, 160(12), 5815-25.

Vistica, B. P., Chanaud, N. P. r., Felix, N., Caspi, R. R., Rizzo, L. V., Nussenblatt, R. B., & Gery, I. (1996). CD8 T-cells are not essential for the induction of "low-dose" oral tolerance. *Clin Immunol Immunopathol*, 78(2), 196-202.

Vives, J., Parks, D. E., Weigle, W. O. (1980). Immunologic unresponsiveness after gastric administration of human gamma-globulin: antigen requirements and cellular parameters. *J Immunol*, 125(4), 1811-6.

Volkheimer, G. (1975). Hematogenous dissemination of ingested polyvinyl chloride particles. *Ann N Y Acad Sci*, 246(164), 164-71.

Walker, A. W. (1975). Antigen absorption from the small intestine and gastrointestinal disease. *Ped Clin N Amer*, 22, 731-746.

Weaver, L. T., & Walker, W. A. (1988). Epidermal growth factor and the developing human gut. *Gastroenterology*, 94(3), 845-7.

Wei, J., Xu, H., Davies, J. L., & Hemmings, G. P. (1992). Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life Sci*, 51(25), 1953-6.

Weiner, H. L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S. J., al, S. A., Santos, L., Sayegh, M., Nussenblatt, R. B., Trentham, D. E., & Hafler, D. A. (1994). Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol*, 12(809), 809-37.

Weintraub, B. C., Jackson, M. R., & Hedrick, S. M. (1994). Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol*, 153(7), 3051-8.

Wells, H. G. (1908). Studies on the chemistry of anaphylaxis. *J. Inf. Dis.*, 5, 449-483.

Wells, H. G. (1911). Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg. *J. Exp. Med.*, 9, 147-171.

Wilders, M. M., Sminia, T., Plesch, B. E., Drexhage, H. A., Weltevreden, E. F., & Meuwissen, S. G. (1983). Large mononuclear Ia-positive veiled cells in Peyer's patches. II. Localization in rat Peyer's patches. *Immunology*, 48(3), 461-7.

Wildner, G., Hunig, T., & Thureau, S. R. (1996). Orally induced, peptide-specific gamma/delta TCR+ cells suppress experimental autoimmune uveitis. *Eur J Immunol*, 26(9), 2140-8.

Wilson, A. D., Bland, P. W., & Stokes, C. R. (1990). Expression and distribution of Ia antigen in the murine small intestine. Influence of environment and cholera toxin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 91(4), 348-53.

Winter, H. S., Cole, F. S., Huffer, L. M., Davidson, C. B., Katz, A. J., & Edelson, P. J. (1983). Isolation and characterization of resident macrophages from guinea pig and human intestine. *Gastroenterology*, 85(2), 358-63.

Wiseman, G. (1964). *Absorption from the Small Intestine*. New York and London: Academic Press.

Wojnarowska, F., & Gray, G. M. (1975). Intestinal surface peptide hydrolases: identification and characterization of three enzymes from rat brush border. *Biochim Biophys Acta*, 403(1), 147-60.

Wu, X. M., Nakashima, M., & Watanabe, T. (1998). Selective suppression of antigen-specific Th2 cells by continuous micro-dose oral tolerance. *Eur J Immunol*, 28(1), 134-42.

Yang, R., Liu, Q., Grosfeld, J. L., & Pescovitz, M. D. (1994). Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg*, 29(8), 1145-8.

Zeitz, M., Schieferdecker, H. L., Ullrich, R., Jahn, H. U., James, S. P. & Riecken, E. O. (1991). Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *Immunol Res*, 10(3-4), 199-206.