

**MANUTENÇÃO DOS PADRÕES DE REATIVIDADE
IMUNOLÓGICA DURANTE O PROCESSO DE SENESCÊNCIA**

Elaine Speziali de Faria

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Área de concentração: Imunologia

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Elaine Speziali de faria

**MANUTENÇÃO DOS PADRÕES DE REATIVIDADE IMUNOLÓGICA DURANTE
O PROCESSO DE SENESCÊNCIA**

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria
Área de concentração: Imunologia

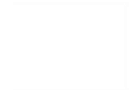
Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção
Do Título de Mestre em Ciências

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia
do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

“Assim como as pedras são polidas por atrito, as provações tornam os homens brilhantes”.

Provérbio Indiano



Aos meus queridos pais Luiz e Marly, e ao meu irmão Dálcio, por me fortalecerem sempre.
São meus exemplos de perseverança e luta.
Simplesmente obrigada por fazerem parte da minha vida!

Agradecimentos

À Dra. Ana Maria Caetano de Faria, acima de tudo pela orientação, confiança, carinho, compreensão e pela amizade conquistada ao longo desses anos. Mas também pela competência profissional e exemplo de pesquisadora e imunologista que é.

Às amigas: Léia, Juscilene e Frank pela incontestável amizade e, por simplesmente, fazerem parte da minha vida nesses longos anos de trabalho.

Aos amigos do laboratório de Imunobiologia pelo carinho e gratificante convívio.

À Celise pela disposição em ajudar na parte burocrática.

Acima de tudo, a DEUS.

Muito Obrigada.

Índice

1. Introdução	17
2. Objetivo geral	35
3. Materiais e Métodos	37
4. Resultados	50
4.1 Produção de imunoglobulinas totais no soro após um ano da indução de tolerância oral.....	50
4.2 Isotipos anti-Ova em animais idosos tratados por via oral quando jovens.....	53
4.3 Anticorpos anti-Ova medidos após o desafio com Ova e CFA em camundongos idosos uma ano e meio após a indução da tolerância oral	56
4.4 Atividade proliferativa de células linfocitárias do baço e linfonodos inguinais um ano após a indução da tolerância oral.....	57
4.5 Produção da citocinas IL-2 por células linfoides esplênicas medida no sobrenadante da cultura celular.....	58
4.6 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH) um ano após a indução de tolerância oral.....	60
4.7 Caracterizar o tipo de reação celular nos diferentes grupos por meio do corte histológico do coxim plantar dos camundongos.....	62
4.8 Produção de anticorpos anti-Ova e IgE total no soro dos camundongos.....	64
4.9 Produção das citocinas IL-4 e INF- γ por células linfoides do baço em animais idosos que foram tolerizados e imunizados quando jovens.....	65
4.10 Análise da produção de anticorpos totais e das classes IgM, IgG e IgA no soro de camundongos jovens e idosos.....	66
4.11 Células produtoras de imunoglobulinas totais e das classes IgM, IgG e IgA no baço e medula óssea.....	67

4.12	Atividade proliferativa de células linfocitárias presentes no baço de camundongos jovens e idosos.....	70
5.	Discussão.....	71
6.	Conclusões.....	94
7.	Trabalhos publicados com parte dos resultados da presente dissertação.....	95
8.	Perspectivas.....	96
9.	Bibliografia.....	97

Lista de Figuras

Figura 1- Protocolo experimental básico.....	46
Figura 2- Anticorpos anti-Ova medidos em camundongos idosos que foram tolerizados e imunizados quando jovens.....	49
Figura 3A- Padrão isotípico dos anticorpos anti-Ova antes do primeiro desafio e após o desafio com Ova ou com Ova em adjuvante.....	51
Figura 3B- Padrão isotípico dos anticorpos anti-Ova após o desafio com Ova e alumínio e o 3º desafio somente com a Ova.....	54
Figura 4- Anticorpos anti-Ova medidos em camundongos idosos que foram tolerizados e imunizados quando jovens.....	55
Figura 5- Capacidade proliferativa de células do baço e linfonodos inguinais	56
Figura 6- Secreção de IL-2 por linfócitos T do baço no sobrenadante da cultura celular .	57
Figura 7- Hipersensibilidade tardia (DTH) em camundongos tolerizados e imunizados quando jovens.....	59
Figura 8- Microscopia óptica do infiltrado celular do coxim plantar de camundongos idosos que foram desafiados com Ova + CFA e tratados quando jovens	61
Figura 9- Anticorpos totais anti-Ova de camundongos tratados quando jovens e desafiados com Ova + CFA quando idosos.....	63
Figura 10- IgE total no soro de camundongos tratados quando jovens e desafiados com Ova+CFA quando idosos.....	63
Figura 11- Produção de IL-4 e INF- γ por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de células.....	64
Figura 12- Título de anticorpos totais e das classes IgM, IgG e IgA de camundongos normais jovens e idosos.....	65
Figura 13A: Quantificação das células produtoras de imunoglobulinas totais e dos isotipos IgM, IgG e IgA no baço.....	67
Figura 13B- Quantificação das células produtoras de imunoglobulinas totais e dos isotipos IgM, IgG e IgA na medula óssea.....	68

Figura 14 - Capacidade proliferativa de células do baço de camundongos normais jovens e idosos.....	69
Figura 15 - Modelo explicativo para as interações do sistema imune do animal velho	.94

Lista de Abreviaturas

AL(OH)₃: hidróxido de alumínio

APC: célula apresentadora de antígeno

BCG: mycobacterium Calmette-GuÈrin

CD3: marcador de superfície para linfócitos

CD4: marcador de superfície para linfócitos T com função auxiliadora

CD8: marcador de superfície para linfócitos T com função citotóxica

CD44: receptor de adesão

CD62L: receptores ligados a migração de linfócitos para linfonodos periféricos

CD45RB: marcador de superfície ligado ao fenótipo de memória ou virgem das células T CD4⁺ e TCD8⁺

CDR3: regiões hipervariáveis das imunoglobulinas

CFA: adjuvante completo de *Freund*

ConA: concanavalina A

DNCB: dinitroclorobenzeno

DNP: hapteno dinitrofenil

DTH: hipersensibilidade do tipo tardia

EAE: encefalomielite autoimune experimental

E.L.I.S.A: *Enzime Linked Immunosorbent Assay*

ELISPOT: ELISA SPOT ASSAY - ESA

GALT: tecido linfóide associado à mucosa

HPA: *hypothalamic-pituitary-adrenal*

IL-2: interleucina 2

IL-2R: receptor de IL-2

IL-4: interleucina 4

IL-5: interleucina 5

IL-10: interleucina 10

IFN-γ: interferon-gama

IgA: imunoglobulina A

Ig: intragástrica
IgG: imunoglobulina G
IgE: imunoglobulina E
IgM: imunoglobulina M
I.P: intraperitoneal
KLH: *Keyhole limpet haemocyanin*
LPS: mitógeno lipopolissacáride
MBP: proteína básica de mielina
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
MS: esclerose múltipla humana
NaCl: cloreto de sódio
OPD: ortofenileno-diamino
OVA: ovalbumina
PFC: formadoras de placas
PHA: *phytohemagglutinin M-form*
rIL-10: IL-10 recombinante
RPM: rotações por minuto
RPMI: meio de cultivo celular para ensaios de estimulação *in vitro*.
SC: subcutânea
SRBC: eritrócitos de carneiro
TCR: receptor de célula T
Thy 1⁺: células recém migradas do timo
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
Trg: células T reguladoras

Resumo

Tolerância oral é definida como um estado de hipo-reatividade sistêmica frente a um antígeno que foi previamente administrado por via oral. Muitos fatores afetam a indução de tolerância oral, alguns deles relacionados com o antígeno, alguns relacionada com o animal. A idade do animal é um dos fatores mais importantes que afetam a indução de tolerância oral como o envelhecimento, que induz muitas alterações na resposta imune. A tolerância oral é mantida durante um longo período de tempo. Nosso estudo mostrou que tanto a tolerância oral, bem como a reatividade imune é mantida até um ano e meio e que essa manutenção pode ser visto em muitos aspectos da resposta imune em camundongos idosos que tiveram contato prévio com o antígeno quando jovem. Observou-se a manutenção da tolerância oral por meio da resposta humoral, após vários desafios com a Ova ($p < 0.001$) e que, animais idosos previamente imunizados continuaram susceptíveis à indução de imunização sistêmica, pois o título de anticorpos destes animais apresentou-se mais alto após as imunizações intraperitoneais. Além disso, as células do baço e linfonodos inguinais dos animais normais (desafiados somente quando idosos) apresentaram baixa capacidade proliferativa quando comparado com os animais tolerantes e imunes que obtiveram um índice de proliferação maior, semelhante ao observado na produção de anticorpos anti-Ova por animais imunes, tolerantes e normais senis que foram tratados quando jovens. Com relação ao grupo tolerante, este apresentou uma capacidade proliferativa menor que a do grupo imune, indicando que na senescência tanto a persistência da tolerância oral quanto a diferença no padrão de resposta imunológica apresentado por animais normais (tratados somente quando idosos) e animais tolerantes e imunes previamente tratados são observados *in vitro*. Também foi demonstrado que a resposta celular dos camundongos normais (desafiados somente quando idosos) 24h depois do desafio, medida através da reação de DTH, foi maior do que a reação apresentada nos camundongos que foram imunizados quando jovens. No entanto, a reação de DTH nos animais idosos tornados tolerantes quando jovens foi significativamente menor que dos camundongos imunes ($p < 0.025$), mostrando mais uma vez que a tolerância oral pode ser mantida por um longo período. Nossos resultados confirmam novamente os dados da literatura de que ocorre um aumento do estado geral de ativação do sistema imune na senescência. Este aumento global está refletido numa elevação nos títulos de

imunoglobulinas séricas, do número total de células produzindo anticorpos e também da atividade proliferativa dos linfócitos T quando comparados com os mesmos parâmetros do animal jovem. Essa hiperatividade imunológica provavelmente representa a memória de interações com antígenos internos e externos acumulados ao longo da vida do animal. O aumento dessas interações torna o sistema imune do velho menos flexível e, portanto, relativamente refratário à incorporação de novas reatividades à sua dinâmica de funcionamento. O sistema imune do jovem, ao contrário, reflete a precariedade das suas experiências prévias e, ao mesmo tempo, sua enorme plasticidade para mudanças, para novas interações. No caso dos animais normais desafiados somente quando idosos, a Ova representa uma novidade para o seu sistema imune, para qual ele é menos susceptível, justamente por seu sistema imune já se encontrar ativado e envolvido em outras interações das quais a Ova não faz parte. No entanto, os animais imunes e tolerantes, por terem interagido com a Ova quando jovens, são capazes de evocar uma reatividade a este antígeno. Nesses animais, a reatividade à Ova não representa a incorporação de uma novidade, mas apenas a reativação de interações já presentes, a recuperação da memória de circuitos que agora são parte da atividade normal do sistema imune do velho. Essa memória imunológica se refere não somente à quantidade de anticorpos e atividade proliferativa, mas também ao padrão da resposta que pode ser evocada. O padrão de uma reatividade adquirida na juventude aparentemente é mantido por circuitos de memória imunológica que podem ser recuperados na velhice. Interessantemente, mesmo estímulos fortes como outros adjuvantes são incapazes de modificar esse padrão indicando que a memória de ativações anteriores é fortemente entrelaçada em circuitos provavelmente muito estáveis.

Abstract

The oral tolerance is defined as a systemic hypo-reactivity state against an antigen that was previously orally administered. Many factors affect the induction of oral tolerance, some of them antigen-related, others are related to the animal. The animal age is one of factors more important that affect the induction of oral tolerance, as the aging process that induces many changes on the immune response. The oral tolerance is maintained during a long period of time. Our study showed that both oral tolerance and immune reactivity is maintained up to a year and a half and that this maintenance can be seen in many aspects of the immune response in older mice that have had previous contact with the antigen when young. It was observed the maintenance of oral tolerance through the humoral response after multiple challenges with OVA ($p < 0.001$) and old animals previously immunized remained susceptible to induction of systemic immunization, because the antibody titers of these animals presented higher after intraperitoneal immunizations. Moreover, the splenic cells and inguinal lymph nodes of normal animals (challenged only in old age) presents low proliferative potential when compared to the tolerant animals and immune animals that obtained a greater proliferation score, similar to the observed on the anti-OVA antibodies production by the immune animals, tolerant animals and normal old animals treated when young. Regarding to the tolerant group, it presented a lower proliferative ability than immune group, indicating that in senescence both the persistence of oral tolerance and the difference in the immune response pattern presented by normal animals (treated only in old age) and by tolerant animals and immune animals previously treated are observed in vitro. It was also demonstrated that the cellular response of normal mice (challenged only in old age) 24 hours after the challenge, measured through the DTH reaction, was higher than the reaction presented in the mice that were immunized in young age. However, the DTH reaction in old animals tolerized in young age was significantly lower than immune mice ($p < 0.025$), showing once more that the oral tolerance can be maintained for a long period. Our results confirmed again the data of literature that occurs an increase of the general state of immune system activation in senescence. This global increase is reflected on the rising on the seric immunoglobulin titer, the increase of the total numbers of cells producing antibody and also the increase of the proliferative activity of the T cells when compared to

the same parameters in the young animals. This immunological hyperactivity probably represents the memory of the interaction with intern and extern antigens cumulated in the animal lifetime. The increase of this interactions makes the immune system of elderly less flexible and, therefore relatively refractory to incorporation of new reactivity to its dynamic operation. The immune system of young, on the other hand, reflects the precarity of its previous experiences, and, at the same time, the great plasticity of this group to changes to news interactions. In the case of normal animals challenged only in old age, the OVA represents news to your immune system, to which it is less susceptible, because its immune system is already activated and involved in other interactions which OVA is not a part. However, the immune animals and the tolerant animals, because they had interacted with Ova in young age, they are able to evoke a reactivity to this antigen. In these animals, the reactivity to OVA does not represent the incorporation of a novelty, but only the reactivation of interactions already present, the recovery of the memory circuits that are now part of the normal activity of the immune system of elderly. This immunological memory refers not only to the quantity of antibodies and proliferative activity, but also to the pattern of response that can be evoked. The pattern of reactivity acquired in youth is apparently maintained by immune memory circuits that can be recovered in old age. Interestingly, even strong stimuli like other adjuvants are unable to modify this pattern indicating that the memory of previous activations is strongly interlaced in probably very stable circuits.

1.Introdução

O sistema linfoide associado às mucosas

A maior parte dos contatos com materiais antigênicos ocorre na superfície das mucosas. A área total da superfície mucosa do trato gastrointestinal, estimada em 300 m², é 100 vezes maior que a superfície da pele, em média 2 m² (Moog, 1981). A mucosa intestinal é revestida por uma única camada de células epiteliais com propriedades absorptivas que está constantemente exposta a materiais antigênicos. Estima-se que aproximadamente uma tonelada de nutrientes passam pelo intestino humano durante um ano e, 130 a 190 g destas proteínas são absorvidas diariamente neste local (Brandtzaeg, 1998).

A característica mais marcante, no entanto, da mucosa intestinal é a abundância do tecido linfoide associado a ela. Existem 10¹² células linfoides por metro de intestino humano e, segundo Van der Heijden e Mestecky, o número de células secretoras de imunoglobulinas localizadas no intestino murino e humano excede em várias vezes o número das mesmas células presentes nos demais órgãos linfoides (van der Heidjen, 1987; Mestecky, 1987). Sabemos que uma parte dos linfócitos da mucosa intestinal está distribuída ao longo do intestino delgado, na *lamina propria* e entre os enterócitos (linfócitos intraepiteliais ou IEL). Outra parte está localizada em folículos formando as placas de *Peyer*. Assim, podemos afirmar que o tecido linfoide associado à mucosa intestinal representa o maior órgão linfoide do corpo.

As consequências imunológicas e fisiológicas do contato constante de materiais antigênicos com esta vasta superfície do corpo são: 1) o desenvolvimento de uma imunidade local não inflamatória, representada pela produção de IgA secretória; 2) a indução de imunidade sistêmica traduzida por altos níveis de anticorpos séricos e 3) a indução de um estado de supressão sistêmico a futuras imunizações parenterais com o mesmo antígeno, chamado de tolerância oral.

Tolerância Oral: origem e definição

A primeira evidência do fenômeno da tolerância oral foi o relato do cientista russo Alexandre Besredka mostrando que cobaias alimentadas com leite tanto por via oral quanto retal se tornavam refratárias a reações anafiláticas induzidas por injeções intracerebrais de leite (Besredka, 1909). Besredka foi o primeiro a desenvolver pesquisas sobre imunologia de mucosas. Em 1919, ele desenvolveu o conceito da resposta imune local no intestino independente da imunidade sistêmica (Besredka, 1919). Quase concomitantemente, o americano H. G. Wells relatou que múltiplas injeções de um antígeno proteico, como os da clara do ovo, causavam a morte de cobaias por reações anafiláticas. No entanto, quando os animais eram alimentados previamente com essas proteínas, as reações anafiláticas não ocorriam (Wells, 1911). Quarenta anos mais tarde, M. W. Chase mostrou que cobaias alimentadas com dinitroclorobenzeno (DNCB) apresentaram uma resistência ao desenvolvimento de reações cutâneas de hipersensibilidade desencadeadas pelo pincelamento da pele dos animais com o mesmo agente sensibilizante (Chase, 1946). Em 1945, Chase havia demonstrado que a sensibilização de contato é um fenômeno imunológico celular, pois ela pode ser transferida somente por linfócitos, e não por anticorpos. Estes trabalhos destacaram, então, a natureza imunológica da tolerância oral. Além disto, Chase mostrou a especificidade do fenômeno da tolerância oral e já observou que é mais fácil induzi-lo em animais normais como prevenção do que em animais já sensibilizados como tratamento.

Nos anos 70, uma nova onda de trabalhos sobre o fenômeno foi responsável pelo início do estudo dos mecanismos envolvidos na indução da tolerância oral (André, Heremans, Vaerman & Cambiaso, 1975; Thomas & Parrot, 1974; Titus & Chiller, 1981; Vaz, Maia, Hanson & Lynch, 1977). Ela foi, então, definida como a supressão específica da resposta celular e humoral para um antígeno através da administração prévia por via oral desse mesmo antígeno.

A tolerância oral pode afetar de várias maneiras o sistema imune, de forma a alterar vários parâmetros imunológicos: 1) inibição profunda da produção de imunoglobulinas das classes IgM, IgG e IgE (Hanson et al., 1977; Ngan & Kind, 1978; Vaz et al., 1977; Wu, Nakashima & Watanabe, 1998); 2) diminuição da resposta

proliferativa dos linfócitos T (Garside, Steel, Liew & Mowat, 1995b; Titus & Chiller, 1981); 3) supressão da reação de hipersensibilidade tardia ou DTH (Leishman, Garside & Mowat, 1998; Miller & Hanson, 1979; Mowat, Strobel, Drummond & Ferguson, 1982) (Franco, Benedetti, Ferek & Massouch, 1998) 4) inibição da produção de citocinas secretadas por linfócitos do tipo Th1 e Th2 (Garside et al., 1995c; Melamed, Fishmann-Lobell, Uni, Weiner & Friedman, 1996; Melamed & Friedman, 1994). Essa gama de atuações mostra, então, a grande importância do fenômeno da tolerância oral nas respostas imunes desenvolvidas pelo organismo.

Mecanismos explicativos da Tolerância oral

Desde Besredka, diversos trabalhos confirmaram que o estado de tolerância poderia ser induzido por administração oral de agentes sensibilizantes de contato, bem como antígenos proteicos. As investigações sobre os mecanismos envolvidos na tolerância oral iniciaram-se em 1970 e início de 1980 paralelamente aos estudos envolvendo a tolerância imunológica. O mecanismo explicativo para este último fenômeno envolvia a deleção de clones autorreativos no timo, onde células T imaturas sofriam apoptose após sua interação com antígenos autólogos expressos na membrana de células apresentadoras de antígenos (APC). Nesta mesma época, surgiram alguns modelos de mecanismos celulares explicativos para a tolerância oral.

Em 1975, André e colaboradores relataram que camundongos que recebiam várias doses intragástricas de eritrócitos de carneiro (SRBC) ficavam tolerantes a posteriores injeções de SRBC. No soro desses animais, os pesquisadores encontraram a presença de complexos antígeno-anticorpo que poderiam potencialmente ser os mediadores da inibição do estado de tolerância (André et al., 1975).

O mecanismo mais amplamente aceito, no entanto, para explicar a indução da tolerância oral foi o desenvolvimento, após a administração oral do antígeno, de linfócitos T supressores específicos. As primeiras investigações realizadas neste sentido foram realizadas por Ngan e Kind que mostraram a geração destas células em camundongos alimentados por via oral com várias doses de Ova. A supressão foi demonstrada pela capacidade de células do baço e das placas de *Peyer* transferidas

adotivamente de camundongos tolerantes à Ova em inibir a formação de IgG e IgE em camundongos singênicos normais (Ngan & Kind, 1978). Os linfócitos das placas de *Peyer* dos animais tolerantes foram mais efetivos em suprimir a formação de anticorpos quando comparados com as células do baço, uma vez que 10^7 células das placas de *Peyer* foram capazes de suprimir a formação de IgE enquanto 10^8 células do baço foram necessárias para produzir um efeito similar. Este resultado indicava que as placas de *Peyer* poderiam ser a fonte de células supressoras posteriormente encontradas no baço e linfonodos de animais tolerantes (Ngan & Kind, 1978).

Em 1978, Richman demonstrou que a administração por via oral de uma única dose de Ova era suficiente para a geração de células T supressoras no baço. A transferência dessas células para recipientes letalmente irradiados e normais suprimiu a formação de células formadoras de placas (PFC) para Ova. O tratamento das células supressoras do baço com anti-Thy-1.2 e complemento inibiu a capacidade dessas células em transferir a tolerância indicando que os linfócitos T seriam os responsáveis pela supressão da resposta imune (Richman, Chiller, Brown, Hanson & Vaz, 1978).

Tornou-se de grande interesse, então, estudar o fenótipo das células responsáveis pela regulação da resposta imune. Inicialmente, foi proposto que os linfócitos T $CD8^+$ específicos para o antígeno seriam os responsáveis pelo efeito regulador descrito. Lider demonstrou que linfócitos T $CD8^+$ isolados do baço e linfonodos mesentéricos de ratos Lewis tolerantes transferiam adotivamente a proteção para encefalomielite autoimune experimental (EAE). Além disso, essas células eram capazes de suprimir a resposta proliferativa *in vitro* e também a produção de anticorpos específicos para a proteína básica de mielina (MBP) antígeno utilizado para a indução da doença (Lider, Santos, Lee, Higgins & Weiner, 1989).

Posteriormente, alguns pesquisadores demonstraram que os linfócitos T $CD4^+$, e não os linfócitos T $CD8^+$ seriam essenciais tanto para a indução quanto para a manutenção da tolerância oral. (Barone, Jain & Michael, 1995) (Garside, Steel, Liew & Mowat, 1995a). Por outro lado, estudos similares realizados também em modelos murinos mostraram que tanto as células T $CD4^+$ quanto as células T $CD8^+$ podem estar envolvidas na supressão ativa presente no fenômeno da tolerância oral (Chen, Kuchroo, Inobe, Hafler & Weiner, 1994) (Chen, Inobe, Marks, Gonnella & Kuchroo, 1995).

A ideia de um mecanismo supressor ativo supõe que a indução do fenômeno da tolerância oral depende da ativação preferencial de uma determinada subpopulação de linfócitos T e ao mesmo tempo, a supressão de outra subpopulação. Fishman-Lobell propôs que as células Th1 caracterizadas por secretar citocinas do tipo Th1, tais como IL-2 e INF- γ seriam afetadas pela administração oral de baixas doses do antígeno, mas em contrapartida, as células Th2 estariam intactas. Estes achados foram demonstrados pela diminuição na expressão de genes relacionados com a síntese de INF-gama e o aumento da expressão do gene para IL-4 (Fishman-Lobell, Friedman & Weiner, 1994).

Entretanto, existem autores que discordam deste ponto de vista e, utilizando-se modelos animais similares, Wu e colaboradores observaram que a resposta proliferativa, bem como a produção de IL-4 por linfócitos Th2 de animais tolerantes apresentaram-se diminuídas. Já a produção de citocinas do tipo Th1 como IL-2 ou INF- γ não foi alterada. Estes dados mostraram que as células Th2 e não as Th1 seriam afetadas pela tolerância oral induzida por baixas doses do antígeno (Wu et al., 1998).

Nos últimos anos, o envolvimento de linfócitos T- $\gamma\delta$ na indução da tolerância oral em modelos murinos tem sido cada vez mais destacado. A primeira evidência da participação desses linfócitos na tolerância oral foi relatada por Mengel e colaboradores que demonstraram que a depleção de linfócitos T $\gamma\delta$ *in vivo* reverteu a indução deste fenômeno em animais já tolerizados. Além disso, ele observou que a transferência de células T $\gamma\delta$ /CD3⁺ de animais tolerantes para recipientes normais foi capaz de induzir a tolerância oral nestes animais (Mengel et al., 1995). Esses dados foram confirmados por Ke e colaboradores que mostraram que a administração oral de baixas doses de antígeno não induziu tolerância em camundongos knockout para a cadeia δ do TCR (Ke, Pearce, Lake, Ziegler & Kapp, 1997).

As citocinas geralmente associadas à supressão ativa observada na tolerância oral são IL-4, IL-10 e TGF- β . Sua produção é atribuída à subpopulação de linfócitos Th2, mas recentemente foi descrita uma nova subpopulação de linfócitos T chamada Tr1 que secretaria altos níveis de IL-10 e baixos níveis de TGF- β (Groux et al., 1997). Uma subpopulação proposta como reguladora na tolerância oral tem sido as células Th3 que secretariam preferencialmente TGF- β (Faria & Weiner, 1999). Esta última citocina parece exercer um papel fundamental na manutenção da tolerância oral e doenças

autoimunes como EAE. Miller confirmou a sua importância através da neutralização de TGF- β por administração de anticorpos. O autor mostrou que esta neutralização foi capaz de reverter a tolerância oral previamente induzida (Miller, Lider, Roberts, Sporn & Weiner, 1992). Outros trabalhos já demonstraram a participação de TGF- β na tolerância oral (Khoury, Hancock & Weiner, 1992; Miller, al-Sabbagh, Santos, Das & Weiner, 1993; Santos, al-Sabbagh, Londono & Weiner, 1994). Células secretoras de TGF- β foram descritas nas placas de *Peyer* de camundongos transgênicos para Ova 6 horas depois da administração oral de Ova (Gonnella et al., 1998). Recentemente, Shi e colaboradores também obtiveram resultados interessantes a despeito do papel da interleucina TGF- β na regulação da resposta imune após a indução da tolerância oral. Eles demonstraram que camundongos deficientes em Th1 (STAT-4 $^{-/-}$) e Th2 (STAT-6 $^{-/-}$) quando tratados com Ova por via oral apresentaram uma supressão na resposta proliferativa e na produção de citocinas específicas para Ova comparável à do grupo normal (wild type), mostrando que nenhuma das duas populações é essencial para a indução de tolerância oral. Por outro lado, a administração oral do antígeno suprimiu a resposta proliferativa nas placas de *Peyer* somente nos animais knockout. Além disso, a utilização de anticorpos anti-TGF- β aboliu a tolerância observada na mucosa e não na periferia, sugerindo, então, um papel regulatório para esta citocina em sítios locais de indução de tolerância oral (Shi, Grusby & Nagler- Anderson, 1999).

Alguns autores acreditam que o fenômeno da tolerância oral possa ser regulado por interações anti-idiotípicas entre linfócitos onde todos os anticorpos do organismo estariam interconectados numa rede complexa. Vaz, em 1993, além de propor a existência de interações idiotípicas como mecanismo explicativo para a tolerância oral, também propôs que estas interações entre os anticorpos aconteceriam fisiologicamente e que nem sempre reações entre os componentes celulares ou produtos dos mesmos com autocomponentes seria patológico para o organismo (Vaz & Faria, 1993). Interessantemente, raças de camundongos tais como NZB e NZW que apresentam padrões anormais de conectividade idiotípica quando jovens são mais susceptíveis a patologias autoimunes e tendem a ser refratárias à indução de tolerância oral (Dighiero et al., 1987; Staples & Talal, 1969). Tais interações idiotípicas poderiam potencialmente ocorrer também entre os linfócitos T. Existem dados sugerindo que a cadeia α do TCR

pode ser importante em algumas formas de supressão ativa (Kuchroo et al., 1991) e linfócitos T anti-idiotípicos já foram demonstrados por Sercarz e Krzych (Sercarz & Krzych, 1991).

Existem evidências na literatura mostrando que a supressão ativa não é a única responsável pela indução da tolerância oral. Tem sido proposto que a tolerância oral pode ser induzida pela deleção de clones de linfócitos T periféricos autorreativos para antígenos ingeridos, similarmente ao que acontece com timócitos presentes no córtex tímico que são eliminados ao interagirem com alta avidéz com o complexo antígeno próprio e moléculas do MHC presentes na membrana de células apresentadoras de antígenos. Existem evidências de que esta deleção clonal, mediada por apoptose, poderia vir precedida por uma ativação parcial dos linfócitos T. Chen observou que a administração oral de altas doses de ovalbumina em camundongos transgênicos para o gene receptor de células T específico para Ova, levaria a deleção de subpopulações de linfócitos T do tipo Th1 e Th2 específicos para Ova nas placas de *Peyer*, mas que estas células eram capazes de proliferar antes de serem deletadas. Além disso, houve uma diminuição significativa na secreção de interleucinas como IL-2, IL-4, IL-10 e INF- γ . Por outro lado, a produção de TGF- β manteve-se constante sugerindo, então, a existência de uma terceira população de linfócitos T, a subpopulação Th3 produtores de TGF- β e resistentes à deleção (Chen et al., 1995).

Pesquisas também realizadas em camundongos não transgênicos evidenciaram que a administração oral de doses altas do antígeno em animais normais acarretaria em um aumento na susceptibilidade à morte por apoptose de seus linfócitos T após o desafio sistêmico com o antígeno em adjuvante. Mowat e colaboradores mostraram que as células T desses animais morriam rapidamente quando colocados em cultura *in vitro* na ausência do antígeno (Garside et al., 1996).

Recentemente, Goldman mostrou em modelos de EAE induzidos em ratos, que a expressão do RNA para o TCR-V β 8.2⁺ (expresso em células T encefalopatogênicas) estava diminuída nos linfonodos que drenam o local do desafio com o antígeno de ratos tolerizados oralmente com altas doses do antígeno. Não houve alteração na expressão do RNA para o TCR-V β 8.2⁺ nos linfonodos mesentéricos (Goldman-Brezinski et al., 1998).

Diversos autores acreditam que a tolerância oral possa ser mantida pela anergia, que é definida como um estado de inativação de linfócitos T, caracterizado pela incapacidade de proliferarem e de secretarem interleucina 2 (IL-2), bem como não apresentarem receptores para IL-2 quando colocados em cultura com o mesmo antígeno administrado por via oral. Além disso, foi observada a reversão deste perfil quando células anérgicas em presença de IL-2 recombinante, *in vitro*, recuperaram a capacidade de proliferação e produção de IL-2 (Melamed & Friedman, 1993a) (Melamed & Friedman, 1994). A ausência de moléculas coestimuladoras como B7/CD28 durante a interação entre o TCR e moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) seria responsável pela indução do estado de anergia.

Van Houten também evidenciou a presença de linfócitos anérgicos em sistemas de transferência utilizando-se células T transgênicas para receptores de linfócitos T (TCR) específicos para Ova. Linfócitos T retirados de camundongos com alta expressão de TCR transgênicos para Ova (Tg⁺) foram transferidos para camundongos da raça BALB/c. Posteriormente os animais quiméricos foram tolerizados com uma única dose alta de Ova e a presença de células T Tg⁺ na ausência de resposta proliferativa para o antígeno, nestes animais, demonstrou que estas células estavam anérgicas (Houten & Blake, 1996).

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) tem sido utilizada extensivamente como um modelo animal para esclerose múltipla humana (MS). A administração oral de altas doses de MBP em roedores, antes do desafio com o mesmo antígeno, evita o desenvolvimento de EAE. Jewell, recentemente, utilizando este modelo experimental, mostrou que o tratamento oral com MBP torna os linfócitos específicos para MBP anérgicos impedindo que eles participem do desencadeamento da EAE. Nesse modelo, a exposição das células MBP- específicas a estímulos com IL-2 foi capaz de reverter o perfil anérgico (Jewell, Gienap, Cox & Whitacre, 1998).

Segundo Weiner, a diferença básica entre mecanismos de supressão ativa e mecanismos passivos (deleção clonal e anergia) seria determinada pela dose do antígeno administrada por via oral: baixas doses favoreceriam a supressão ativa e altas doses ativariam preferencialmente a deleção ou anergia das células T específicas (Weiner, 1997). Na verdade, esses mecanismos não parecem excludentes e podem se imbricar em

vários casos especialmente quando doses fora dos extremos considerados como alta e baixa são utilizadas (Faria & Weiner, 1999).

Cinética da tolerância oral

A tolerância oral tem sido observada 24 horas após a administração oral de antígeno e estudos em animais transgênicos sugerem que os circuitos envolvidos na indução de tolerância oral podem ser acionados até 6 horas depois dessa administração. Seis horas após a administração de 0.5 mg de Ova em camundongos transgênicos para Ova ocorre um aumento marcante das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β medidas por imunohistoquímica no tecido linfóide associado à mucosa intestinal (Gonnella et al., 1998). Além disto, a administração oral de 0.5 mg de citocromo c em camundongos com alta frequência de linfócitos T transgênicos para citocromo c induz o aparecimento de linfócitos T ativados no baço e linfonodos mesentéricos 6 horas depois (Gütgemann, Fahrer, Altman, Davis & Chien, 1998). Esses dados sugerem que a tolerância oral é uma sequência de eventos que começa nas primeiras 24 horas após a ingestão do antígeno embora, segundo Mowat, a supressão máxima da resposta imune ocorra normalmente 7-14 dias depois da administração oral do antígeno (Mowat, 1994).

A tolerância oral pode persistir por longos períodos. A supressão da imunidade celular (reações de hipersensibilidade retardada ou DTH) pode persistir por 17 meses após uma única gavagem com altas doses de antígeno (Strobel & Ferguson, 1987) enquanto que a resposta proliferativa de linfócitos dura aproximadamente 6 meses (Melamed & Friedman, 1993b). Alguns autores sugerem que a persistência da tolerância pode estar relacionada ao mecanismo desencadeado na tolerância: altas doses desencadeariam a deleção ou anergia das células T gerando uma tolerância mais duradoura que aquela induzida por baixas doses onde células T regulatórias estariam envolvidas. A inibição observada no modelo de EAE quando utilizada uma dose baixa de antígeno no tratamento oral, por exemplo, persiste por 2 a 3 meses apenas (Higgins & Weiner, 1988).

Dados antigos da literatura descrevem a tolerância oral para a resposta humoral como sendo menos duradoura. A supressão dos níveis de IgG sérica específica persiste por apenas dois a três meses depois do tratamento oral com altas doses de hemácias de carneiro (SRBC) (Challacombe & Tomasi, 1980) ou ovalbumina (Ova) (Ngan & Kind, 1978; Vaz, Faria, Verdolin & Carvalho, 1997). Strobel e Ferguson também demonstraram que a supressão da produção de anticorpos está presente 3 meses após o tratamento oral com Ova e que com 6 meses esta supressão já desapareceu (Strobel & Ferguson, 1987).

Pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pela manutenção da tolerância oral. Autores como Melamed e Friedman levantam a possibilidade de que a persistência do antígeno seja fundamental para esta manutenção. Eles demonstraram que a tolerância oral persiste por mais tempo em camundongos desafiados com o antígeno em adjuvante completo de Freund (CFA) após o tratamento oral do que em camundongos simplesmente tratados por via oral. No entanto, o efeito do adjuvante neste caso pode não ser devido à persistência do antígeno, mas à criação através do fenômeno inflamatório desencadeado por ele de circuitos imunológicos de manutenção da memória do evento inicial à tolerância oral (Melamed & Friedman, 1993b).

Fatores que influenciam a indução da tolerância oral

Desde a descoberta da tolerância oral até os dias atuais, os fatores responsáveis por impedir o seu estabelecimento têm sido intensamente estudados (Faria & Weiner, 1999). São eles:

- os ligados ao antígeno: dose e natureza;
- variações de protocolo nas exposições orais ao antígeno: duração, frequência e intervalos entre os tratamentos orais;
- os relacionados aos animais: idade, espécie, raça e *status* imunológico.

Senescência e Tolerância oral

Está bem documentado na literatura que a idade com a qual o animal entra em contato pela primeira vez por via oral com antígenos é um fator essencial para o desencadeamento da sensibilização ou tolerância após posteriores contatos com o mesmo antígeno. Alguns pesquisadores mostraram que animais neonatos ao receberem uma única administração do antígeno por via oral entre o primeiro ou segundo dia de vida não foram capazes de desenvolverem a tolerância oral. Além disso, eles demonstraram que a transição entre o estado da sensibilização para a tolerância ocorreu durante o sétimo ao décimo dia de vida do animal, demonstrando, então, que a susceptibilidade à indução da tolerância oral surge neste período (Strobel & Ferguson, 1984)(Rios et al., 1988) (Faria, Garcia, Rios, Michalaros & Vaz, 1993). Entretanto, essa perda da susceptibilidade pode ser revertida pela transferência de células do baço de animais jovens para receptores neonatos. Em contraste, a transferência de células do baço de animais senis para camundongos jovens os torna menos susceptíveis à tolerância oral (Lahmann, Menezes, Verdolin & Vaz, 1992).

Rios e colaboradores (Rios et al., 1988) e, posteriormente, Faria e colaboradores (Faria et al., 1993) demonstraram que a susceptibilidade à tolerância oral induzida por uma gavagem de 20 mg de Ova começa a declinar em camundongos a partir de 20-24 semanas de idade. Segundo os mesmos autores, camundongos C57BL/6 e B6D2F1 senis (70 semanas de idade) são totalmente refratários à indução de tolerância oral por gavagens de 20 mg de Ova (Faria et al., 1998a; Faria et al., 1998b). Essa refratariedade, no entanto, pode ser corrigida pela administração oral contínua do antígeno por um ou vários dias consecutivos. O fator importante parece ser a exposição do animal a pequenas doses continuamente (solução apresentada na mamadeira) e não a duração dessa exposição (Faria, Ficker, Rodrigues, Lahman & Vaz, 1995) (Faria et al., 1998b). Moreau e Gaboriau-Routhiau mostraram que é possível induzir tolerância oral para a produção de IgG e IgE em camundongos C3H/He de 20 meses de idade. A duração desse estado de tolerância, no entanto, é muito menos duradouro. Tem sido descrito também um decréscimo na susceptibilidade à indução de tolerância por via parenteral em camundongos BALB/c, C57BL/6 e CBA/CaJ (Moreau & Gaboriau-Routhiau, 1996).

Como a tolerância oral é um evento iniciado em nível das mucosas, mas de efeitos sistêmicos, provavelmente tanto alterações de fatores locais como relacionados à operação global do sistema imune durante o processo de senescência podem estar relacionados ao seu declínio. Dados mostrando um decréscimo marcante na produção de IgA, no número de células da *lamina propria* assim como na capacidade proliferativa de linfócitos T presentes na mucosa intestinal nos sugerem que modificações locais podem alterar a indução local do fenômeno. No entanto, Lahmann e colaboradores já mostraram que a transferência de células de baço de camundongos de 7 semanas de idade para camundongos de 70 semanas é capaz de restaurar a susceptibilidade à tolerância oral nos animais senis (Lahmann et al., 1992). Esse resultado indica claramente que os linfócitos presentes no baço são necessários e suficientes para o desencadeamento da tolerância oral e que, provavelmente, essa população e suas interações se modificam ao longo da vida do animal.

Senescência e o sistema imunológico

A imunosenescência tem sido bem descrita em humanos e em uma variedade de espécies animais apresentando grande influência nas alterações funcionais do sistema imune, tais modificações podem ser observadas tanto em órgãos linfoides, quanto nos componentes celulares do sistema imunológico. O principal efeito do envelhecimento no sistema imunológico pode ser observado no timo. Este órgão, local primário para desenvolvimento de células T, é composto pelas regiões cortical e medular que durante o processo de senescência sofre uma grande atrofia caracterizada pela perda da região cortical mas não da região medular acarretando, então, na perda de timócitos imaturos o que ocasionaria a diminuição na população de células presentes neste local. O mais importante é que alterações no epitélio cortical afetam a maturação das células T por alterarem o processo de seleção dos linfócitos (Takeoka et al., 1996). Recentemente vários autores mostraram que a atrofia tímica estaria relacionada a deficiência no processo de diferenciação das células progenitoras que migraram para o timo, uma vez que as análises fenotípicas dos estágios de diferenciação intratímica das células T de animais de várias idades revelou que o número de células imaturas apresentando o

fenótipo triplo-negativas CD3⁻CD4⁻CD8⁻ caracterizadas pelos marcadores CD44⁺CD25⁻ não diminuiu com a idade. Entretanto, houve uma redução nos animais idosos, na população de células T triplo negativas com o fenótipo CD44⁻CD25⁺ característico de células maduras, mostrando uma ineficiência durante a transição do fenótipo mais imaturo para o mais maduro nestes animais. Além disso, o autor demonstrou que a deficiência na diferenciação estaria relacionada ao rearranjo ineficiente do DNA para produção da cadeia β do TCR das células T (Aspinall, 1997); Thoman, 1997 #1541.

Bem antes, em 1988, Eren havia relatado que o processo de senescência também poderia afetar a capacidade de proliferação e diferenciação das células tronco no microambiente tímico, pois células da medula de camundongos senis apresentaram uma baixa capacidade de reconstituição do timo fetal após a transferência *in vitro* (Eren, Zharhary, Abel & Globerson, 1988).

Existem relatos na literatura mostrando que o envelhecimento também estaria relacionado a alterações nos fenótipos das células T do sistema imune. Tais alterações poderiam incluir mudanças nos marcadores de membrana como o receptores de adesão (CD44), receptores ligados a migração de linfócitos para linfonodos periféricos (CD62L) e CD45RB que são responsáveis pelo fenótipo de memória ou “virgem” das células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como alterações na proporção destas células. Vários autores mostraram que camundongos idosos apresentariam uma diminuição na proporção de linfócitos T CD4⁺, mas não de células T CD8⁺, quando comparados com animais jovens. Além disso, a frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados (caracterizado pela expressão CD44^{hi} CD45RB^{lo} CD62L^{lo}) nos animais idosos seria muito maior. Por outro lado, a proporção de células T “virgens” (caracterizada pela presença dos marcadores CD44^{lo} CD45RB^{hi} CD62L^{hi}) em camundongos idosos estaria diminuída (Ernst, Weigle, Noonan, McQuitty & Hoobs, 1993); (Barrat et al., 1995) (Kurashima & Utsuyama, 1997) (Timm & Thoman, 1999).

O acúmulo do fenótipo de memória nas células T em animais idosos poderia explicar algumas, mas não todas as alterações associadas ao envelhecimento. Ele pode explicar, por exemplo, as alterações observadas no potencial para produção de citocinas secretado pelos linfócitos T de animais idosos, uma vez que as células T “virgens”

secretam um perfil de citocinas diferente das células T ativadas. Um conjunto de experimentos mostrou que a síntese de IL-2 por células T CD4⁺ ativadas está diminuída em relação à síntese da mesma citocina pelas células “virgens”. Em contrapartida, a produção de IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e INF- γ por estas células T apresentou-se aumentada com o envelhecimento, consistente com a maior concentração de linfócitos T ativados nos animais idosos (Hobbs et al., 1993) (Hobbs, Weigle & Ernst, 1994). Além disso, observou-se que as alterações no perfil de citocinas relacionadas ao envelhecimento ocorrem gradualmente ao longo da vida do animal (Hobbs et al., 1993).

Entretanto, existem resultados contrastantes, nos quais foi observado uma semelhança no perfil de produção de determinadas citocinas em animais jovens e idosos que poderia ser explicado por diferenças no tempo de cultura das células, pela presença dos sinais co-estimuladoras via moléculas acessórias, pela purificação ou não das subpopulações das células T, bem como diferenças nas raças de camundongos (Araneo, Woods II & Daynes, 1993) (Engwerda, Fox & Handwerker, 1996).

A literatura têm demonstrado que as células T CD8⁺ também sofreriam alterações com relação a produção de citocinas durante o processo de envelhecimento. Mu and Thoman relataram que a produção de citocinas por estas células seria diferente em animais idosos e jovens. Ocorre um aumento na produção de IL-4 e INF- γ nos animais idosos quando comparados com animais jovens e, por outro lado, a síntese de IL-2 apresentou-se reduzida nos mesmos animais (Mu & Thoman, 1999).

A senescência também está associada a alterações nas atividades globais do sistema imune caracterizadas pelo declínio na imunidade humoral, onde animais experimentais e humanos idosos apresentariam uma redução na produção de anticorpos específicos para antígenos externos. Essa observação foi feita pela primeira vez em 1932 por Paul e colaboradores que relataram uma redução da resposta de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (SRBC) em idosos quando comparados com jovens humanos (Paul & Bunnell, 1932). Posteriormente, em 1968, outros pesquisadores também observaram o mesmo efeito na resposta humoral em idosos. Robert e colaboradores relataram uma diminuição na produção de imunoglobulinas anti- *salmonella flagelin* ao mesmo tempo em que os anticorpos específicos para DNA estavam aumentados (Roberts-Thomson, Whittingham, Youngchaiyud & Mackay, 1968) Recentemente,

utilizando modelos murinos, Adkins and Riley demonstraram que o declínio imunológico decorrente do processo de envelhecimento seria acompanhado pelo aumento significativo no título de autoanticorpos IgM reativos com timócitos e células T CD4⁺ e CD8⁺ periféricas do baço e linfonodo. Além disso, estes autores demonstraram a presença de autoanticorpos ligados à superfície de timócitos *in vitro* e *in vivo* em animais idosos (Adkins & Riley, 1998).

Muitas pesquisas têm investigado o efeito do envelhecimento na produção de imunoglobulinas em animais imunizados e, existem relatos na literatura mostrando que a resposta humoral para antígenos timo-dependentes estaria diminuída na senescência. Alguns pesquisadores observaram que anticorpos específicos para gamaglobulina bovina ligada ao hapteno dinitrofenil (DNP) apresentaram-se reduzidos em animais idosos. Em contraste, a produção de anticorpos para o antígeno timo-independente DNP-ficoll não se alterou com a senescência (LeMaout, Szabo & Weksler, 1997b).

O envelhecimento também estaria relacionado à alterações no repertório de linócitos B. Essa observação foi recentemente confirmada por Joël LeMaout e colaboradores que demonstraram, através de análises da diversidade das regiões hipervariáveis das imunoglobulinas (CDR3) nas células do baço, a perda da heterogeneidade da resposta humoral em animais idosos quando comparados com animais jovens. Os autores demonstraram que camundongos com idade acima de 18 meses apresentavam distribuições mais limitadas e um perfil reduzido a um único pico (pico dominante) que constitui mais de 70% da área total do perfil de CDR3. Este pico era encontrado em mais de 85% dos animais idosos. Em experimentos adicionais, eles também caracterizaram a população de células que apresentavam os picos dominantes e observaram o fenótipo CD5⁺ CD45R¹⁰ característico das populações de células B1a presentes em maior proporção em animais idosos (LeMaout et al., 1997a); (LeMaout et al., 1999).

Uma série de trabalhos têm relatado alterações na resposta humoral associadas ao envelhecimento. No entanto, em proporções mais limitadas, vários pesquisadores têm avaliado o efeito da idade na resposta proliferativa da células B e, nos últimos anos, a literatura têm mostrado linhas de pensamento diferentes a respeito das alterações na proliferação das células B na senescência. Alguns atribuem o declínio na atividade

mitogênica das células B a uma redução no número de células reativas ao estímulo, e não alterações na capacidade de divisão destas (Abraham, Tal & Gershon, 1977). Em contraste, existem autores que acreditam que a redução da resposta proliferativa das células B estaria relacionada a um defeito intrínseco às células B específicas e não ao seu número reduzido (Averill & Wolf, 1985).

Souvannavong e colaboradores, adeptos da ideia de que a resposta humoral estaria relacionada a uma redução no número de células reativas ao estímulo, observaram que populações de células totais do baço de animais idosos apresentaram uma diminuição na resposta proliferativa quando comparados com os animais jovens, embora a cinética da resposta de ambos os grupos tenha sido semelhante. Entretanto, ao comparar linfócitos B purificados de animais jovens e idosos, esta diferença não mais foi observada. Além disso, eles também mostraram uma resposta proliferativa reduzida das células totais esplênicas em animais idosos quando estimuladas com o mitógeno lipopolissacáride (LPS). Tal diminuição não foi observada na população de linfócitos B purificados mostrando, novamente, que a redução da capacidade de proliferação das células B associada à senescência seria mediada por outras células presentes no baço e não por defeitos da própria célula B (Souvannavong, Lemaire, Andreau, Brown & Adam, 1998).

As alterações no sistema imune associadas ao envelhecimento também podem ser observadas nos tecidos linfoides associados à mucosa e tais modificações podem ser observadas tanto em modelos animais quanto no homem. Existem relatos mostrando que o padrão de imunoglobulinas da classe IgA presente no intestino estaria alterado durante o envelhecimento tanto em modelos murinos quanto em humanos. Senda, em 1988, demonstrou que o nível de IgA no muco intestinal em animais idosos estaria aumentado em relação aos animais jovens, mas por outro lado, o isotipo IgM apresentou-se inalterado durante o processo de envelhecimento. O autor também observou que este efeito estaria exacerbado no soro dos animais. Além disso, foi relatado um aumento de IgA no *lumen* intestinal nos animais senis, embora este aumento não tenha sido observado no isotipo IgM (Senda, Cheng & Kawanishi, 1988).

Recentemente, Fló e Massouh demonstraram que as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ presentes no tecido linfoide associado à mucosa (GALT) também

sofrieriam alterações associadas à senescência. Eles observaram uma redução das células T CD4⁺ Thy 1⁺ (células recém migradas do timo), bem como na proporção de linfócitos T CD4⁺ “virgens” caracterizado pelo fenótipo CD4⁺ CD45RC⁺ das placas de Peyer em ratos idosos. Em contraste, houve um aumento relacionado ao envelhecimento das células T de memória (CD4⁺ CD45RC⁻) nas placas de *Peyer* destes animais (Fló & Massouh, 1997). Todas estas modificações sistêmicas e locais no sistema imune podem atuar no declínio da atividade imunológica do animal senil, inclusive no declínio da tolerância oral.

No caso dessa última, o início da perda de susceptibilidade parece ocorrer ainda precocemente já que camundongos de 20-24 semanas de idades não podem ser considerados senis. Por outro lado, como a tolerância oral é fenômeno de longa duração, principalmente no que se refere à supressão da imunidade celular, uma questão interessante que permanece é relacionar a cinética da sua manutenção com o processo concomitante de envelhecimento do animal já tolerizado. Aparentemente existe uma diferença entre a susceptibilidade à indução, que declina com a idade e os processos que asseguram sua manutenção.

Por outro lado, o processo de envelhecimento também está associado a um declínio na capacidade de imunização a antígenos novos. A capacidade de manutenção da imunidade adquirida de jovem parece ser variável dependendo do antígeno e do tipo de resposta estimulada. Em geral, a resposta humoral a infecções virais, como a hepatite, a poliomielite ou a varíola, persiste por toda a vida. Outros antígenos de microorganismos utilizados em programas de vacinação, como o toxóide tetânico ou diftérico, são incapazes de produzir uma produção duradoura de anticorpos (Mortimer, 1978). A persistência das reações celulares também é menos variável. A imunidade celular à tuberculose, por exemplo, seja ela adquirida através da vacinação com o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) ou pelo contato com o próprio bacilo da tuberculose humana, dura também toda a vida e pode ser facilmente verificada pelo teste de hipersensibilidade retardada na pele (May, 1995). A manutenção da memória dessa reatividade tem sido atribuída à sobrevivência das células B e T específicas estimuladas na primeira imunização. No entanto, já foi demonstrado que a memória das respostas de linfócitos B e T diminui rapidamente quando essas células primadas são transferidas

para receptores singênicos. Esses dados levantam a questão para alguns autores de que a persistência das células primadas depende da presença do antígeno original ou de outros antígenos que tenham reatividade cruzada com este (Sprent & Tough, 1994).

O objetivo dessa dissertação foi estudar o processo de manutenção durante o processo de envelhecimento desses dois fenômenos sistêmicos desencadeados no animal jovem: a tolerância oral e a imunização sistêmica.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar a capacidade de manutenção, durante o processo de senescência, da tolerância oral e da memória dos padrões de ativação imunológica desencadeados em animais jovens por um antígeno em adjuvante.

Objetivos Específicos

1. Investigar a manutenção, após um ano, de dois padrões imunológicos diferentes de ativação sistêmica, tolerância oral e imunização induzidos em camundongos jovens para o antígeno ovalbumina (Ova), através dos seguintes parâmetros:

a- produção de anticorpos séricos específicos de diferentes isotipos (IgM, IgG, IgA, IgE);

b- proliferação de linfócitos isolados do baço e linfonodos após estimulação *in vitro* com ovalbumina;

c- produção de citocinas (IL-2, IL-4 e IFN- γ) no sobrenadante de cultura dos mesmos linfócitos;

d- reação de hipersensibilidade retardada (DTH) desencadeada *in vivo* com ovalbumina.

2. Comparar os padrões imunológicos fisiológicos de ativação em camundongos jovens e idosos pela medida:

a- dos níveis séricos de anticorpos inespecíficos de diferentes isotipos (IgM, IgG, IgA);

b- do número de células produtoras de anticorpos desses mesmos isotipos no baço e medula óssea;

c- proliferação dos linfócitos do baço estimulados *in vitro* com o mitógeno concanavalina A.

3. Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados, neste trabalho, camundongos jovens (entre 8 e 9 semanas de idade) e senis (entre 70 e 100 semanas), de ambos os sexos, da primeira geração (F1) do cruzamento das linhagens isogênicas C57BL6/J e DBA/2, denominados abreviadamente B6D2F1, criados no Biotério do ICB - UFMG.

Todos os animais foram mantidos com ração padrão para camundongos e água *ad libidum* no Biotério do laboratório de Imunobiologia .

Em todos os experimentos, o número de animais por grupo (n) variou entre 5 e 7, com uma média predominante de 7 camundongos.

Antígeno

Ovalbumina 3 ou 5 vezes cristalizada (OVA, albumina da clara do ovo, SIGMA Grades III ou V, SIGMA Chemical Co., ST. Louis, MO, USA) foi utilizada dissolvida em salina fisiológica (solução de NaCl 0,85% em água bidestilada) para os tratamentos orais por gavagem e para as imunizações parenterais.

A Ova agregada após desnaturação térmica, utilizada nos ensaios de reação celular (DTH - *Delayed Type Hypersensitivity*), foi preparada a partir de Ovalbumina 5 vezes cristalizada (OVA Grade V), submetida a um procedimento semelhante ao descrito por Titus & Chiller (Titus & Chiller, 1981). Inicialmente, uma solução de Ova a 2% foi preparada através do aquecimento a 100°C por 5 min. Após seu resfriamento, a solução foi centrifugada a 5000 rpm, por 10min, a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e a Ova agregada ressuspensa em PBS. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente desprezado e a Ova agregada, ressuspensa num volume igual ao volume da solução inicial a 2%. Essa suspensão final foi assumida como contendo Ova desnaturada pelo calor a 2%.

Adjuvantes

Foi utilizado 1 mg de hidróxido de alumínio Al(OH)_3 (alúmen) adicionado a soluções contendo 10 μg de Ova (Grade III), para realizar a imunização parenteral primária e posterior análise da produção dos 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 durante os experimentos de indução de DTH, proliferação celular e dosagem de citocinas. O CFA foi utilizado numa emulsão de proporção de 1:1 com uma solução de Ova (Grade V) a 5 mg/ml.

Atividades imunológicas

Administração Oral do antígeno para a indução de tolerância oral

Os camundongos receberam por via oral 0,2 ml da solução de antígeno (100 mg/ml) em salina (NaCl 0,15 M) através de uma agulha com ponta arredondada acoplada a uma seringa de 1 ml, administrada diretamente no esôfago do animal. A cada gavagem, os camundongos receberam de uma só vez 20 mg de Ova (*in bolus*). Foram administradas 3 gavagens, uma gavagem diária durante 3 dias consecutivos. Este tratamento foi realizado 7 dias antes das imunizações parenterais.

Imunizações

A imunização primária consistiu de uma injeção intraperitoneal de 10 μg de OVA (Grade III) e 1 mg de hidróxido de alumínio Al(OH)_3 , como adjuvante, diluídos em 0,2 ml de salina fisiológica (NaCl 0,15 M) q. s.p. por animal. Essa solução foi injetada diretamente na cavidade peritoneal do camundongo.

A imunização secundária também intraperitoneal, foi feita 14 dias após a imunização primária e consistiu de 10 µg de OVA (GradeIII) diluída em 0,2 ml de salina fisiológica (NaCl 0,15 M) q.s.p., por animal.

Para a análise de reação celular *in vivo*, proliferação celular e dosagem de citocinas os camundongos foram inicialmente imunizados por via sc, na base da cauda, com 100µg de Ova emulsificada em CFA em uma proporção de 1:1 v/v.

Sangria e obtenção dos soros

Cem microlitros do sangue de cada animal foram coletados por punção do plexo venoso retro - orbital com micropipetas calibradas (fabricadas pela Vidrotec - LTDA), em diferentes momentos dos protocolos experimentais (ver resultados). Depois da coagulação, as amostras individuais foram centrifugadas a 3500 rpm, durante 8 min. Os soros foram retirados e diluídos a 1:10 em salina fisiológica, em tubos individuais. As amostras foram congeladas a -20° C até a dosagem das imunoglobulinas por ELISA.

Quantificação dos anticorpos no soro

As imunoglobulinas foram dosadas pelo ensaio E.L.I.S.A.(*Enzime 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 ou 0.1 µg de anticorpo de cabra contra imunoglobulinas de camundongo diluídos em 100 µl por poço de tampão carbonato pH=9,6. 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 1 hora, com 100 µl/poço dos soros a serem testados, iniciando com uma diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5, diluições 1:100 a 1:12800) ou com 100 µl de muco

intestinal, iniciando com uma diluição de 1:20000 até 1:640000. As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween 0,05% e incubadas, por 1 hora a 37°C, com 100 µl/poço de uma solução de anticorpos poliespecíficos de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongo marcado com peroxidase ou contra as cadeias µ, g1, g2a, g2b, g3 ou a para a análise dos isotipos (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA). As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100 µl/poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo 2 µl de H₂O₂ e 4 mg ortofenileno-diamino (OPD) por placa para dar cor, por reação enzimática catalizada. Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl/poço 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). Em todas as placas foi feito um controle positivo padrão (pool de soros de animais imunes), um controle negativo (pool de soros de animais normais), além de um controle da própria placa sem a adição de soro (branco).

Os valores de absorbância dos soros padrões 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 compatíveis entre si.

Avaliação dos dados por ELISA*

O valor de cada amostra de soro foi expresso como ELISA* (ELISA-score), obtido através do somatório das densidades ópticas das 8 diluições (de 1/100 a 1/12.800). Os resultados expressos nos gráficos foram obtidos pelo cálculo da média de cada grupo experimental (\pm erro padrão da média).

Medida de reação de DTH

Para a análise da reação celular *in vivo* foi medido o inchaço das patas traseiras dos camundongos e também feita uma análise histológica dos tipos celulares presentes

no tecido inflamado. Os camundongos receberam, como descrito anteriormente uma imunização com OVA + CFA por via sc, na base da cauda e após 28 dias um desafio com 40µl de Ova a 2%, agregada por desnaturação térmica (600µg de Ova por animal), no coxim plantar da pata esquerda. Como controle inespecífico do teste, foi dada uma injeção de 40 µl de salina na pata direita. Setenta e duas horas após as injeções nas patas, o inchaço (incremento de espessura em relação ao basal) de ambas as patas de cada animal foi medido por paquímetro e expresso em milímetros. A diferença entre as patas foi considerada como 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). Foram também retiradas as patas esquerda e direita de 3 camundongos por grupo 72 horas após o desafio para a análise histológica.

Análise histológica da reação de DTH

As patas coletadas 72 horas após o desafio foram fixadas em formol tamponado (concentração 10%) 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 4µm 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*.

Proliferação celular e dosagem de citocinas

Para a análise da proliferação celular e dosagem de citocinas, foi seguido protocolo descrito abaixo.

Os camundongos foram imunizados, na base da cauda, como descrito anteriormente e 10 dias após os linfonodos inguinais, baço e medula óssea foram removidos em ambiente asséptico e as suspensões celulares obtidas de cada grupo experimental foram colocadas em meio RPMI completo (RPMI 1640 medium - Gibco

BRL - suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1mM de piruvato de sódio, 2mM de 1 - glutamina, 5×10^{-5} M de 2 - mercaptoetanol, 25 mM HEPES, 100U/ml de penicilina, 100 µl/ml de fungizona 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 µl/poço da suspensão de células na concentração de 5×10^6 /ml. As células foram, então, incubadas com 100 µl por poço das soluções de 0.5 e 5 mg/ml de Ova ou 2, 4 e 8 µg/ml de concanavalina A (conA) para baço e 16, 32 e 64 µg/ml de concanavalina A para a medula óssea. As células foram incubadas em uma estufa a 37°C, 5 % de CO₂ por 24, 40 ou 72 horas.

Para a medida de proliferação celular, após 72 horas, foi adicionado 25 µl de timidina tritiada [metil-³H] (20 µCi/ml; sp ativ. 5 Ci/mmol) por um período de 18 horas. As células foram aspiradas após 6 a 8 h através do *Cell Harvester* automático em um papel de filtro de fibra de vidro. Os discos do filtro foram colocados em tubos contendo líquido de cintilação não aquoso e a radioatividade beta foi determinada através de um contador de radiação beta. Os resultados foram expressos como a média aritmética da contagem em c.p.m. ± o erro padrão das células em triplicata, após a subtração dos valores obtidos com os controles negativos. Foi utilizado também índice de estimulação, que é a razão entre a contagem em c.p.m. da cultura com o antígeno dividido pela células não estimuladas.

Os sobrenadantes foram coletados para serem testados para a presença de citocinas por ELISA após 24 horas para IL-2 e IL-4, 48 horas para INF-g.

Para o controle negativo, as células foram incubadas somente com meio.

Elisa para dosagem das citocinas IL-2, IL-4 e INF- γ

As citocinas foram dosadas pelo ensaio ELISA, descrito resumidamente a seguir.

Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas overnight a 4°C, com 10µg dos anticorpos diluídos em 10 ml de tampão carbonato pH=9,6 (*coating buffer*), sendo que, as diluições foram feitas diferentemente para cada anticorpo, da seguinte maneira: utilizou-se 1 mg/ml dos anticorpos anti-IL-2 e anti-IL-4

e anti IFN-g. Após 20 horas, as placas foram lavadas duas vezes e bloqueadas com 200 µl/well de uma solução de BSA (albumina sérica bovina) a 1% por 2 a 4 horas. Após este procedimento, as placas foram novamente lavadas 4 vezes e incubadas, por 1 hora, com os anticorpos anti- IL-2, anti-IL-4 e anti-IFN-g marcados com biotina na concentração de 0,5 mg/ml diluídos numa solução aquosa contendo 0.3% de BSA. A etapa seguinte, após ter lavado as placas seis vezes, consistiu na adição da avidina peroxidase (0,5 mg/ml na mesma solução aquosa de 0.3% BSA) à placa e posterior incubação por 30 minutos. As placas foram, então, lavadas novamente 6 vezes e incubadas no escuro, com 100 µl/poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H₂O₂ e ortofenileno-diamino (OPD) para dar cor, por reação enzimática catalizada. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl/poço de H₂SO₄ a 2N. A absorbância do comprimento de onda de 450 nm foi aferida por leitor automático (*Model 450 microplate Reader*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Através das curvas padrões para cada citocina (construídas utilizando-se a citocina recombinante) foram calculadas as concentrações de cada citocina nos sobrenadantes.

Técnica de ELISPOT para enumeração das células secretoras de imunoglobulinas no baço e medula óssea

A quantificação das células produtoras de anticorpos foi feita por *ELISPOT* (*ELISA SPOT ASSAY - ESA*) das células do baço e medula óssea segundo o método descrito por Sedgwick, (Sedgwick, et al 1983), sumarizado abaixo.

Para a sensibilização, as microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas, overnight a 4°C com 2 µg/poço de anticorpo de cabra contra imunoglobulinas totais de camundongo (Sourthen Biotechnology) diluído em tampão K₁ K₂ (pH 8,0 ; 0,05M), 50 µl/poço. Como controle negativo, não foi adicionado o anticorpo em uma das linhas da placa. Após 18 horas no mínimo, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS, mergulhando as placas numa cuba por 5 minutos. Para o bloqueio da reação as placas foram, então, saturadas (200 µl/poço) com PBS caseína

0,25%, por 1h à temperatura ambiente e posteriormente, foram lavadas 3 vezes em PBS, mergulhando numa cuba sem esperar durante as lavagens.

Para a preparação das células, foram retirados o baço e medula óssea e macerados em redes de metal em 3 ml de meio RPMI incompleto e, foi acrescentado mais 3 ml de RPMI incompleto. Os tubos foram inclinados por 3 minutos e o sobrenadante retirado, centrifugado a 1000 rpm a 4^o C por 5 min e o *pellet* ressuspendido em 1 ml de meio RPMI completo. Para lisar as hemácias, foram acrescentados às células 9 ml de água bidestilada e imediatamente após, adicionado mais 1 ml de PBS 10 x concentrado. As células foram novamente centrifugadas a 4^o C, 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspendidas em 1 ml de meio RPMI completo. As células viáveis foram contadas através do uso do corante eritrocina (coloração das células mortas), preparada a partir de uma solução estoque contendo 0,8 mg/ml de eritrocina em meio RPMI completo. Logo após, foram misturados 50 µl da suspensão celular (diluídas 100 vezes a partir de 1 ml da suspensão) em volume igual da solução de eritrocina. Esta solução, foi colocada em uma quantidade suficiente para preencher a Câmara de Neubauer. As células não coradas (viáveis) e as coradas (não viáveis) foram contadas em um microscópio óptico e o número de células foi expresso através da fórmula: $(\text{no. cells} \times 10^6)/\text{ml} = (\text{cells viáveis} \times \text{diluição})/\text{no. campos contados na Câmara de Neubauer}$ e, posteriormente, foram feitas as diluições necessárias. Estes cálculos foram feitos apenas para a primeira diluição usada. As demais diluições foram feitas de forma seriada a partir da primeira, de forma que a concentração seguinte foi sempre metade da anterior. As diluições das células para cada anticorpo testado foi a seguinte: para Ig total ($5 \times 10^4/\text{ml}$); IgG ($1 \times 10^5/\text{ml}$); IgM ($2 \times 10^5/\text{ml}$) e IgA ($2 \times 10^5/\text{ml}$).

Como outro controle negativo, não foram adicionadas células em uma das linhas.

Logo após este procedimento, as células foram incubadas (100 µl/poço) a 37^o C em atmosfera de 5% de CO₂ por 4 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes, sendo que, a primeira com água contendo 0,05% de Tween 20 (para lisar as células), mergulhando-a rapidamente por 20-30 segundos aproximadamente. As outras três lavagens foram feitas em PBS-Tween 0,05%, mergulhando numa cuba por 5 min, para retirar os detritos da lise celular. Nos intervalos das lavagens as placas foram agitadas *novortex*..

Os anticorpos anti-camundongo (totais ou isotipos-específicos) marcados com biotina (50µl/poço) foram adicionados e diluídos de acordo com as especificações do fabricante (Ig -1:20000; IgG -1:20000- *Southern biotechonology*; IgM -1:4000; IgA - 1:4000 - *SIGMA*) em PBS caseína 0,25%. Nesta etapa, as placas foram incubadas *overnight* a 4°C.

A etapa seguinte, após ter lavado as placas 3 vezes, consistiu na adição da streptavidina conjugada à fosfatase alcalina, para a revelação da reação (50µl/poço) na diluição indicada pelo fabricante (1:4000 - *SIGMA*) e incubada por 1h a 37°C. A streptavidina foi diluída em PBS-caseína 0,25% . As placas foram lavadas 5 vezes em em PBS - Tween 0,05%, usando uma cuba por 5 min agitando a placa no *Vortex*. entre as lavagens. Foi adicionado, então, o substrato (BCIP-Sigma B-8503) diluído no tampão do substrato junto com a agarose, pré-aquecidos a 44-46°C (50µl /poço) na placa mantida sobre o gelo.

Após estes procedimentos, as placas foram incubadas a 37°C por 1-8 horas até que os spots aparecessem.

Os *spots* foram contados e expressos como número de *spots* por 10⁶ células.

Protocolos experimentais

Efeito do envelhecimento na manutenção da tolerância oral

Camundongos da raça B6D2F1 de 8 semanas de idade foram separados em três grupos, de acordo com o tratamento imunológico administrado:

- *Normal*: Os camundongos desse grupo não receberam nenhum tratamento antigênico.

- *Tolerante*: Os camundongos receberam Ova por via intragástrica (gavagem) para a indução de tolerância oral e posteriormente, imunizações primária e secundária;

- *Imune*: Os camundongos receberam salina por via intragástrica antes das imunizações primária e secundária;

Todos os grupos foram sangrados no plexo venoso retro - orbital para a análise dos títulos de anticorpos, para então serem classificados como camundongos tolerantes, imunes e normais. Esses animais foram mantidos no biotério por 62 semanas sem nenhuma manipulação.

Medida de anticorpos

Ao completarem 70 semanas, todos os grupos receberam novas imunizações intraperitoneais: uma imunização que consistiu de 10 µg de Ova diluído em 0,2 ml de salina fisiológica q.s.p., por animal. Sete dias depois, uma outra imunização foi administrada com 10 µg de OVA e 1 mg de hidróxido de alumínio, como adjuvante, diluídos em 0,2 ml de salina fisiológica q.s.p., por animal. E, 14 dias após, um último desafio foi dado com 10 µg de OVA diluída em 0,2 ml de salina fisiológica q.s.p., por animal. Todos os animais foram sangrados antes e após cada imunização para a análise do título de anticorpos medidos por ELISA (**Figura 1A**).

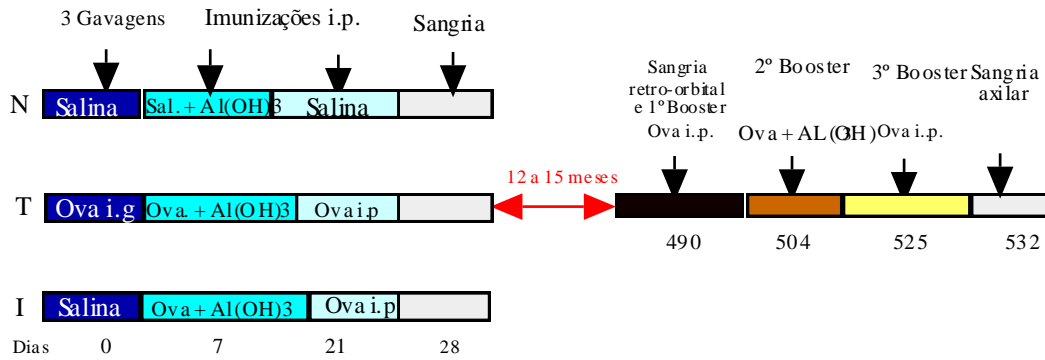
Medida da reação de DTH

Ao completarem 70 semanas de idade todos os grupos receberam imunizações sc na base da cauda com 100 µg/ml de Ova emulsificada em CFA. Vinte e oito dias depois, foi dado um desafio com Ova desnaturada no coxim plantar da pata esquerda e uma injeção de salina fisiológica no coxim plantar da pata traseira direita, como controle inespecífico do teste. Após 72 horas, o inchaço (incremento de espessura) da pata esquerda em relação à direita de cada animal foi medido por paquímetro como medida da reação de DTH (**Figura 1B**).

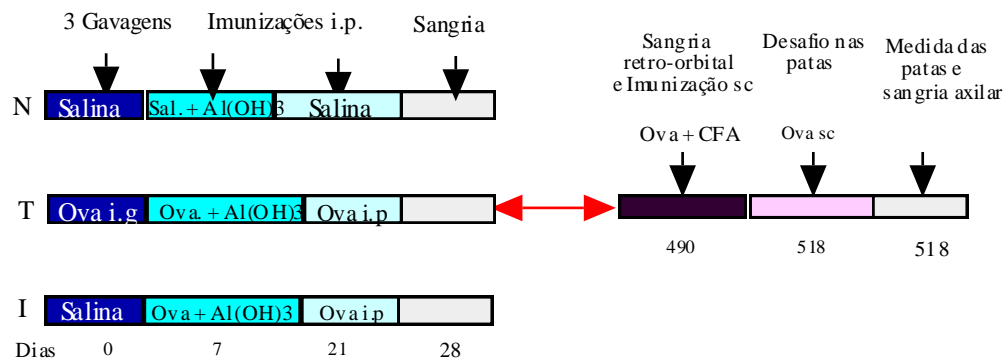
Medida da proliferação celular *in vitro* e dosagem de citocinas

Ao completarem 70 semanas de idade, todos os grupos, classificados como camundongos normais, tolerantes e imunes, quando jovens, receberam imunizações sc na base da cauda com 100 µg/ml de Ova emulsificada em CFA. Após 10 dias, os linfonodos inguinais, baço e medula óssea foram removidos em ambiente asséptico e as suspensões celulares obtidas de cada grupo experimental foram colocadas em cultura e estimuladas com o antígeno, como descrito anteriormente, para análise da proliferação celular e dosagem de citocinas (**Figura 1C**).

A) Medida de anticorpos



B) Indução de DTH



C) Proliferação celular e dosagem de citocinas

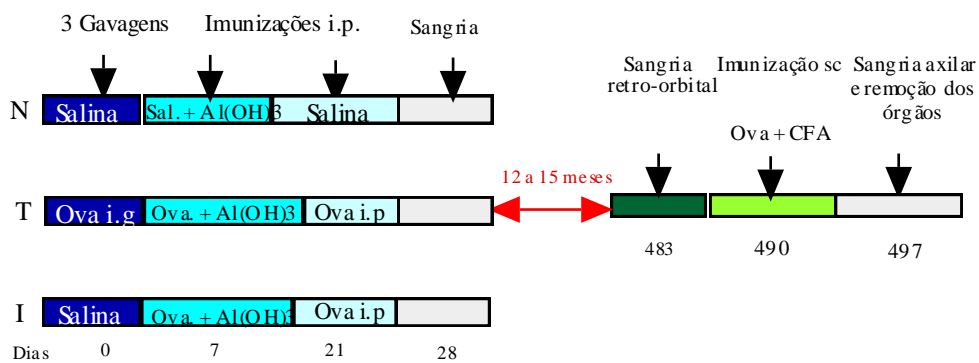


Figura 1 Protocolo experimental básico

Alterações, no sistema imunológico, relacionadas ao envelhecimento

Camundongos normais da raça B6D2F1 foram separados em dois grupos: jovens (8 a 9 semanas de idade) e idosos (70 a 100 semanas de idade) e sacrificados para que essas alterações imunológicas fossem analisadas de acordo com os parâmetros descritos abaixo.

Todos os dois grupos foram sangrados para análise dos anticorpos totais no soro (Ig, IgM, IgG e IgA) medidos através do ELISA. O baço e medula óssea dos animais foram retirados para a enumeração das células produtoras de imunoglobulinas totais e das classes IgM, IgG e IgA nestes órgãos. Foi investigado também a capacidade proliferativa das células linfóides do baço presentes nesses camundongos.

4. Resultados

Fatores imunológicos importantes para a manutenção da tolerância oral na senescência

4.1 Produção de imunoglobulinas totais no soro após um ano da indução de tolerância oral

Camundongos da raça B6D2F1, de 8 semanas de idade, foram submetidos ao tratamento para indução de tolerância oral. Sete dias depois eles receberam a imunização primária com Ova + AL(OH)₃. Os animais controles receberam apenas salina ig antes das imunizações parenterais. Ao completarem 70 semanas de idade, todos os camundongos receberam três novas imunizações intraperitoneais com Ova, como mostra o protocolo da **figura 1a**. A análise de títulos de anticorpos de camundongos B6D2F1 de 70 semanas tornados tolerantes por via oral quando jovens indica que o estado de tolerância foi mantido ($p < 0.01$), quando comparado com o grupo imune idoso, que apresentou título de anticorpos anti-Ova superior aos animais tolerantes (**figura 2**, gráfico a). Os gráficos da **figura 2** (b, c, e d) mostram também, que a tolerância oral foi mantida após vários desafios com a Ova ($p < 0.001$) e que, animais idosos previamente imunizados continuaram susceptíveis à indução de imunização sistêmica, pois o título de anticorpos destes animais apresentou-se mais alto após as imunizações intraperitoneais. Estes resultados mostram que o fenômeno da tolerância oral, bem como a susceptibilidade à imunizações podem ser mantidos pelo menos por quinze meses.

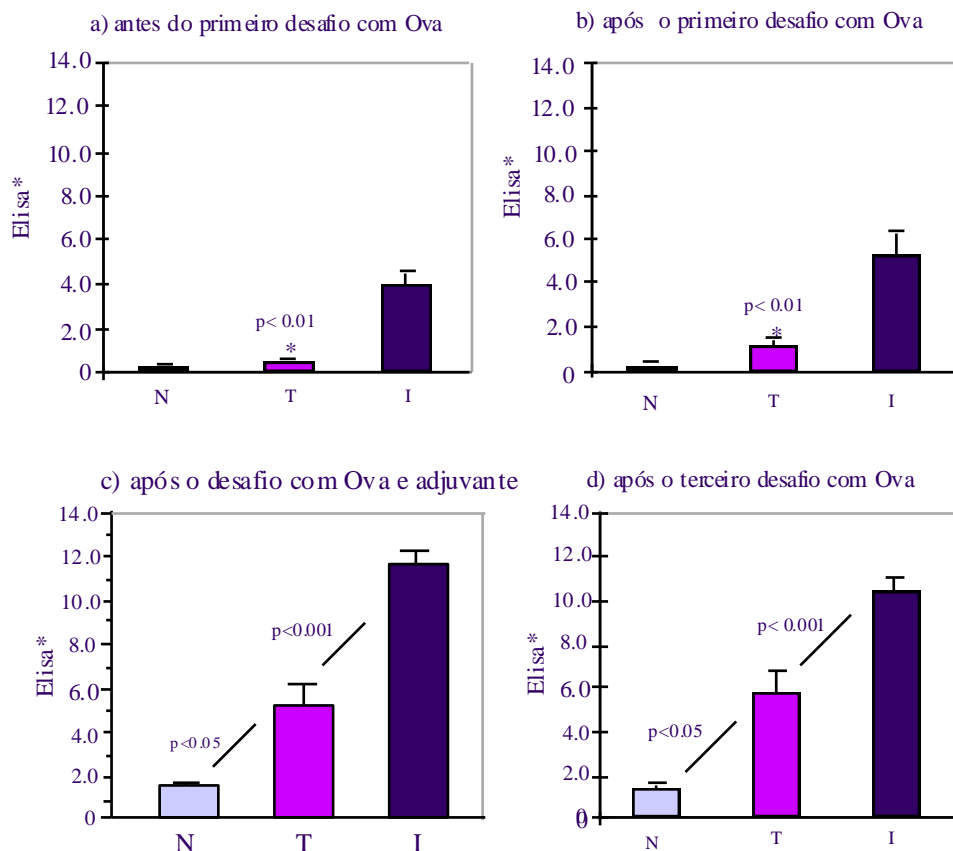


Figura 2: Anticorpos anti-Ova medidos em camundongos idosos tolerizados e imunizados quando jovens. Os animais foram tratados para indução de tolerância oral quando completaram 8 semanas de idade. Nessa idade, os camundongos foram tratados com 20 mg de Ovalbumina (grupo tolerante) ou salina (grupos normal e imune) por gavagem 7 dias antes da imunização primária com 10 mg de Ova + 1mg Al(OH)₃ i.p. Eles receberam a imunização secundária com 10 µg i.p. de Ova 14 dias depois da imunização 1^ª foram sangrados 7 dias depois. O grupo normal recebeu salina em todos os tratamentos. Os anticorpos séricos anti-Ova foram medidos por ELISA e os grupos classificados como normal, tolerante e imune. Após esses tratamentos, os animais foram mantidos em condições normais por 62 semanas e então sangrados novamente (a). Após essa sangria todos os grupos receberam um 1^º desafio com 10 µg de Ova i.p., (b). Sete dias depois receberam o 2^º desafio com 10 µg de Ova + 1mg Al(OH)₃ (c) e 21 dias após, receberam um terceiro desafio somente com 10µg de Ova (d). As sangrias foram realizadas após cada desafio para realização do teste ELISA. As barras representam a média da somatória (ELISA*) das diluições 1/100 a 1/12400 no grupo (n=6-8) e a significância entre os grupos foi calculada pelo *Student t-test*.

4.2 Isotipos anti-Ova em animais idosos tratados por via oral quando jovens

O padrão isotípico dos anticorpos anti-Ova do soro de camundongos idosos que foram tolerizados e imunizados quando jovens também foi testado.

A **figura 3A** mostrou que o grupo normal imunizado somente quando idoso apresentou um título de anticorpos anti-Ova muito baixo antes e após as imunizações com a proteína, mas com um pequeno aumento da classe IgM ao longo das imunizações. O grupo tolerante, antes dos desafios, apresentou um padrão isotípico semelhante ao dos animais normais com uma predominância de IgM. No entanto, após o desafio com Ova este perfil alterou-se, no qual houve um aumento de IgG1 que foi acentuado após o desafio com a Ova e alumínio. Os animais imunes apresentaram um padrão isotípico semelhante, no qual a classe de imunoglobulinas que também se mostrou predominante foi IgG.

Figura 3A: Padrão isotópico dos anticorpos anti-Ova antes do primeiro desafio e após o desafio com Ova ou com Ova em adjuvante. Camundongos B6D2F1 de 70 semanas de idade foram tratados conforme explicado no protocolo experimental da figura 1a. Os gráficos mostram o padrão isotópico dos camundongos normais, tolerantes e imunes. As barras representam a média do ELISA* no grupo (n=6-8).

A **figura 3B** mostrou que após o terceiro desafio com a Ova desafio o grupo normal continuou a apresentar baixos títulos de anticorpos e apresentou um pequeno aumento de IgM. O padrão isotípico dos grupos tolerante e imune também não apresentaram alterações no perfil de imunoglobulinas, no qual o padrão isotípico dos dois grupos ainda permaneceu semelhante, ou seja, houve uma predominância de IgG1.

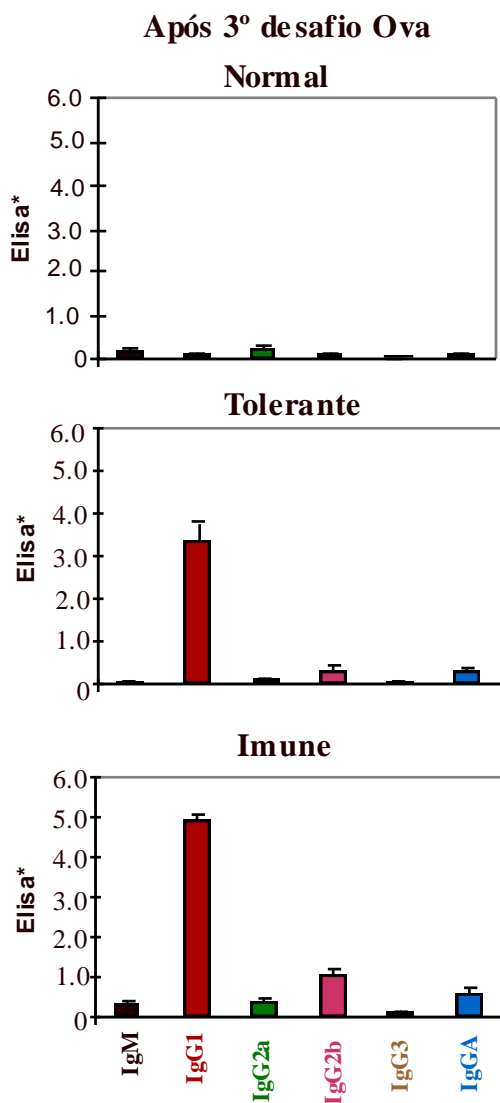


Figura 3B: Padrão isotípico dos anticorpos anti-Ova após o desafio com Ova e alumínio e o 3º desafio somente com a Ova. Camundongos B6D2F1 de 70 semanas de idade foram tratados conforme explicado no protocolo experimental da figura 1a. Os gráficos mostram o padrão isotípico dos camundongos normais, tolerantes e imunes após o desafio com Ova e alumínio e também após o terceiro desafio apenas com a Ova. Os soros foram coletados 7 dias após os respectivos desafios com a Ova. As barras representam a média do ELISA* no grupo (n=6-8).

4.3 Anticorpos anti-Ova medidos após o desafio com Ova e CFA em camundongos idosos uma ano e meio após a indução da tolerância oral

Nosso próximo objetivo foi analisar na senescência, o título de anticorpos dos animais tratados ou não quando jovens, frente a um desafio com a Ova na presença de um potente adjuvante como o CFA com o objetivo de investigarmos se o desafio i.p com a Ova seria suficiente para a indução da tolerância oral nos animais idosos desafiados somente quando idosos. Como mostrou a **figura 4**, os animais normais desafiados somente quando idosos apresentaram títulos muito baixos de anticorpos anti-Ova mesmo após o desafio com a Ova na presença do CFA, diferente dos animais tolerantes e imunes que apresentaram títulos mais altos de anticorpos.

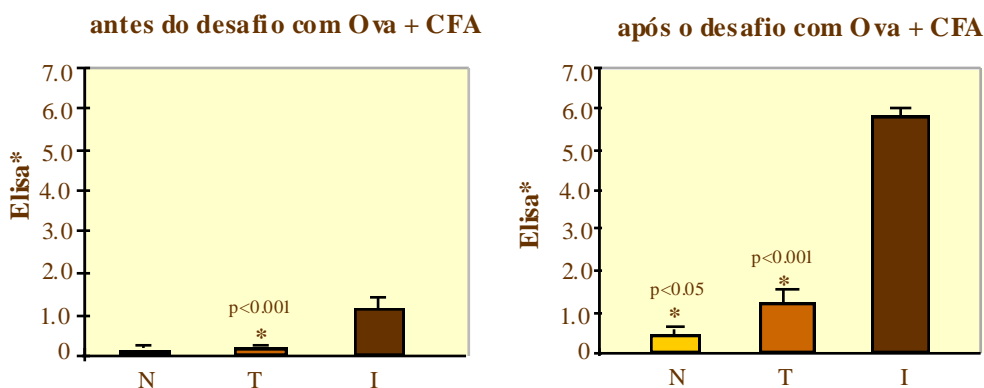


Figura 4: Anticorpos anti-Ova medidos em camundongos idosos tolerizados e imunizados quando jovens. Grupos de 6 animais receberam 0,2 ml ig de salina (normal e imune) ou 0,2 ml de Ova-100 mg/ml (tolerante). Após 7 dias os animais foram imunizados com 10 µg de Ova + 1 mg AL(OH)₃ i.p.. O grupo normal recebeu salina. Na imunização secundária os grupos tolerante e imune receberam 10 µg de Ova em 0,2 ml de salina i.p. e o grupo normal recebeu apenas salina i.p.. Os animais foram sangrados 7 dias após a imunização ^{2^{ária}} para que fossem, então, classificados como normais, tolerantes e imunes.. Após estes tratamentos, os animais foram mantidos em condições normais por 62 semanas e então receberam na base da cauda a solução de 100µg/animal de Ova + CFA. Após 8 dias foi feita a sangria axilar e a remoção do baço e linfonodos inguinais. As barras representam a média da somatória (ELISA*) das diluições 1/100 a 1/12400 no grupo (n=6-8)

4.4 Atividade proliferativa de células linfocitárias do baço e linfonodos inguinais um ano após a indução da tolerância oral

A **figura 5** mostrou que as células linfoides do baço e linfonodos inguinais dos animais normais (desafiados somente quando idosos) apresentaram baixa capacidade proliferativa quando comparado com os animais tolerantes e imunes que obtiveram um índice de proliferação maior, semelhante ao observado na produção de anticorpos anti-Ova por animais imunes, tolerantes e normais senis que foram tratados quando jovens (observar **figura 2**). Com relação ao grupo tolerante, este apresentou uma capacidade proliferativa menor que a do grupo imune.

Estes resultados mostram que na senescência tanto a persistência da tolerância oral quanto a diferença no padrão de resposta imunológica apresentado por animais normais (tratados somente quando idosos) e animais tolerantes e imunes previamente tratados são observados *in vitro* e na produção de anticorpos.

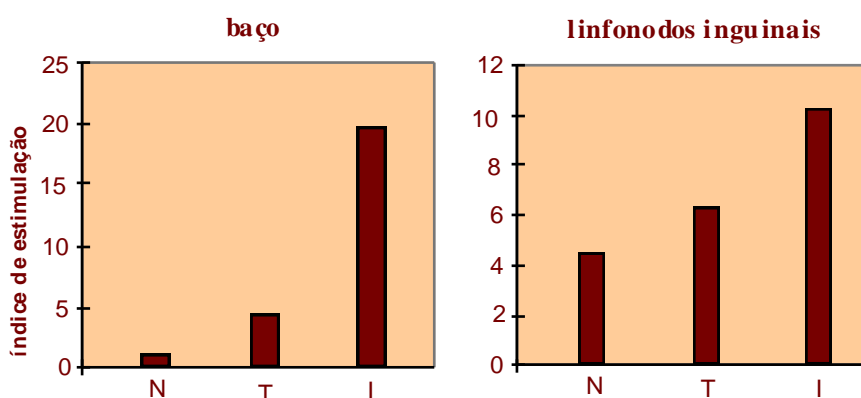


Figura 5: Capacidade proliferativa de células do baço e linfonodos inguinais. Camundongos B6D2F1 idosos foram tratados quando jovens conforme explicado no protocolo experimental da figura 1C e, posteriormente mantidos em condições normais por 62 semanas. Eles receberam na base da cauda a solução de 100µg/animal de Ova + CFA. Após 8 dias foi feita a sangria axilar e a remoção do baço e linfonodos inguinais para posterior estimulação das células com 10 mg/ml de Ova. As barras representam o índice de estimulação (aumento de CPM em relação às células estimuladas com o meio).

A produção da citocinas IL-2 por células linfoides esplênicas medida no sobrenadante da cultura celular também foi analisada. Como mostra a **figura 6**, os linfócitos T dos animais normais desafiados apenas quando idosos secretaram baixas quantidades desta citocina, ao contrário das células dos animais idosos previamente tratados (tolerantes e imunes) que foram capazes de secretar quantidades bem maiores. Este resultado está coerente com o da atividade proliferativa nestes animais, uma vez que a IL-2 está envolvida no processo de proliferação celular, as células dos animais normais também secretaram menores quantidades de IL-2.

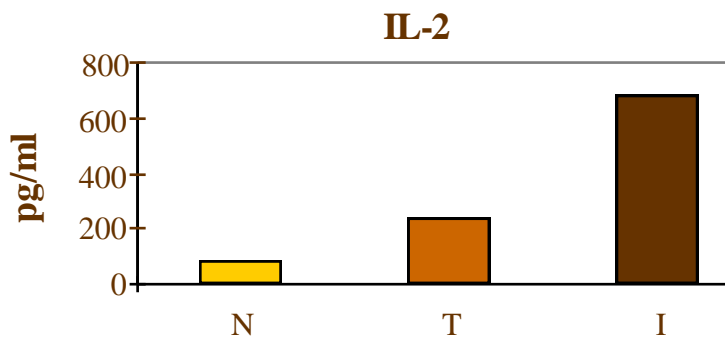


Figura 6: Secreção de IL-2 por linfócitos T do baço no sobrenadante da cultura celular. Células do baço de camundongos dos grupos Normal (N), tolerante (T) e Imune (I) foram coletadas no 7º dia após o desafio e cultivadas em meio RPMI completo contendo 500 µg /ml de ovalbumina por 24 horas. Os sobrenadantes foram colhidos e testados por ELISA para a presença de IL-2. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade óptica obtida para a IL-2 recombinante.

4.5 Reação de hipersensibilidade tardia (DTH) um ano após a indução de tolerância oral

O próximo objetivo, com o intuito de verificar a manutenção da tolerância oral e o padrão de resposta imunológica apresentados por animais idosos normais e previamente tratados, foi analisar a resposta celular medida através da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) dos camundongos idosos tornados tolerantes e imunes quando jovens. Os camundongos ao completarem 8 semanas de idade foram tolerizados e imunizados e, ao completarem 70 semanas de idade todos os grupos receberam um desafio com Ova + CFA na base da cauda, para indução da reação de DTH, conforme mostra o protocolo experimental da **figura 1b**.

Como podemos observar na **figura 7**, a resposta celular dos camundongos normais (desafiados somente quando idosos) 24h depois do desafio, medida através da reação de DTH, foi maior do que a reação apresentada nos camundongos que foram imunizados quando jovens. No entanto, a reação de DTH nos animais idosos tornados tolerantes quando jovens foi significativamente menor que dos camundongos imunes ($p < 0.025$), mostrando mais uma vez que a tolerância oral pode ser mantida por um longo período. A resposta celular dos animais normais permaneceu alta até 72h após o desafio com a Ova e CFA. Em contraste, a resposta celular dos animais imunes não ocorreu em 48h e 72h após o desafio indicando que a reação induzida nestes camundongos ocorreu apenas após 24 horas, pois a espessura das patas medidas em 48h e 72h pode ser considerada normal.

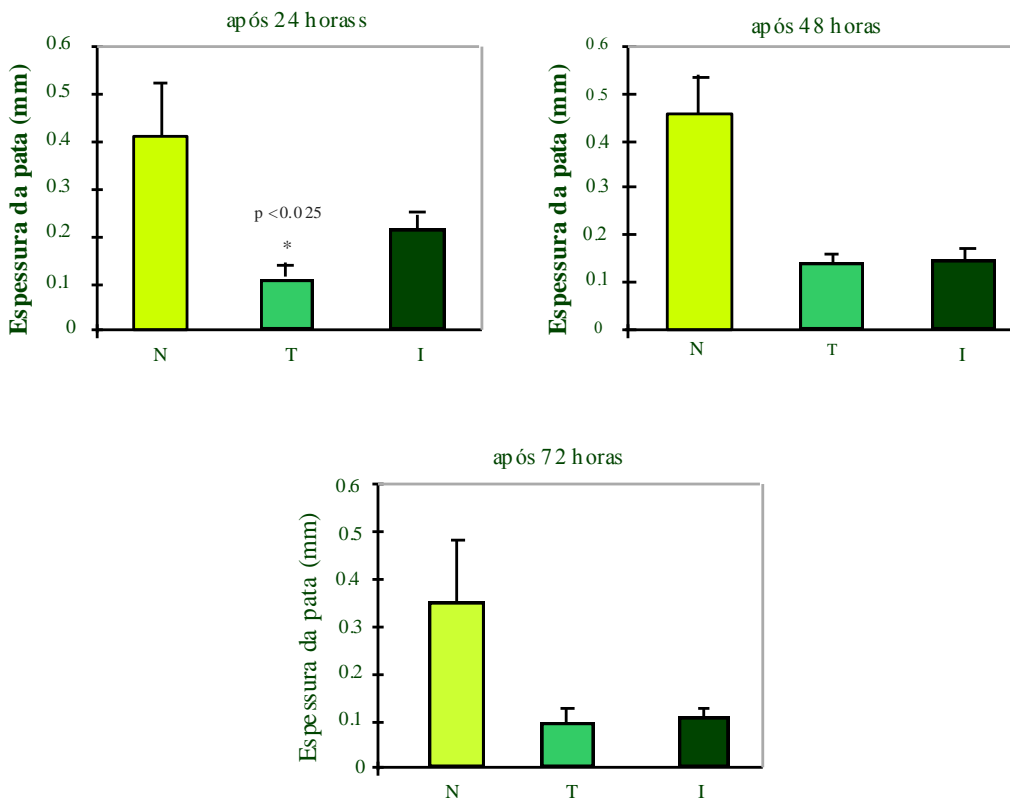


Figura 7: Hipersensibilidade tardia DTH em camundongos tolerizados e imunizados quando jovens. Camundongos B6D2F1 idosos foram tratados quando jovens. Grupos de 6 camundongos foram submetidos a um tratamento oral com 0,2 ml de salina (normal e imune) ou 0,2 ml de Ova-100 mg/ml (tolerante). Após 7 dias os animais foram imunizados com 10 μ g de Ova + 1mg AL(OH)₃ i.p.. o grupo normal recebeu salina. Na imunização secundária, os grupos tolerante e imune receberam 10 μ g de Ova em 0,2 ml de salina i.p. e o grupo normal recebeu apenas salina i.p.. Os animais foram sangrados 7 dias após a imunização 2^{aria}. Após esses tratamentos, os camundongos foram mantidos em condições normais por 72 semanas e, então, receberam na base da cauda a solução de 100 μ g/animal de OVA+CFA. Após mais 28 dias, os animais foram desafiados com Ova solúvel sc e salina sc nas patas esquerda e direita respectivamente. A medida das patas foi feita 24h, 48h e 72h após o desafio com a Ova. A sangria axilar foi feita 72h após o desafio. As barras representam a média da espessura das patas.

Para caracterizar o tipo de reação celular que ocorreu nos diferentes grupos devido à variações no tempo de ocorrência da reação foi feito um corte histológico do coxim plantar da pata esquerda e direita dos camundongos (**figura 8**). O grupo normal apresentou um aumento da espessura da pata com infiltrado de células mononucleares, linfócitos e macrófagos mantendo este padrão celular por até 72 horas, indicando ser uma reação de hipersensibilidade do tipo IV. Já nos grupos imunes e tolerantes as células que se mostraram predominantes no infiltrado celular foram os eosinófilos, sendo que o grupo imune apresentou uma maior proporção destas células e os animais tolerantes apenas alguns eosinófilos, indicando ser uma reação tardia de hipersensibilidade do tipo I. Este resultado demonstra, então, por uma reação celular *in vivo* a manutenção da tolerância oral. Além disso, foi possível demonstrar que o tipo de reação imunológica específica desenvolvida na senescência foi diferente daquela observada em animais tratados quando jovens.

Normal



Tolerante



Imune

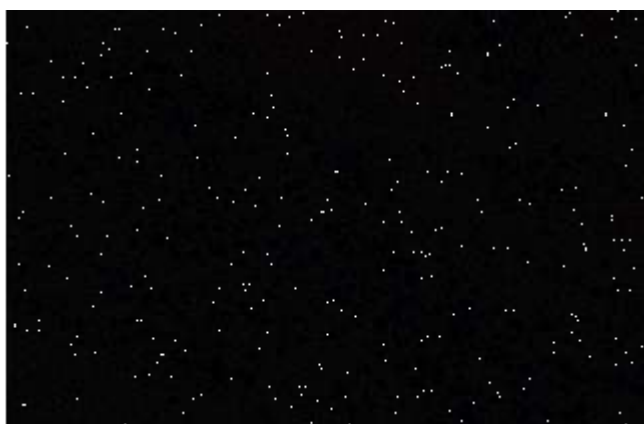


Figura 8: Microscopia óptica mostrando o infiltrado celular do coxim plantar da pata esquerda de camundongos B6D2F1 idosos que foram desafiados com Ova + CFA e tratados quando jovens. A figura (A) mostra o infiltrado celular em animais normais controles, (B) animais normais que foram tratados somente quando idosos; (C) animais tolerantes ; (D) animais imunes. Aumento 40 x 3,3.

Para confirmar a diferença do tipo de reação celular observada nos três diferentes grupos, foi medida a produção de anticorpos anti-Ova e IgE total no soro destes camundongos.

De acordo com o resultado da **figura 9**, pode-se observar que há uma diferença significativa na produção de anticorpos anti-Ova entre os grupos tolerante e imune ($p < 0.05$). No entanto, a produção de anticorpos no grupo normal foi muito menor do que no grupo imune, apesar da reação celular ter se apresentado maior neste grupo indicando, realmente, que o tipo de reação induzida nestes camundongos não foi dependente de anticorpos, ao contrário do grupo imune que apresentou altos títulos de anticorpos.

Com relação à produção de IgE por estes animais, pode-se observar que o grupo imune apresentou níveis de anticorpos anti-Ova maior que o grupo normal indicando que a reação que ocorreu nos animais imunes pode ser dependente de anticorpos, mais especificamente IgE. Pode-se observar também que os animais imunes apresentaram o título de anticorpos estatisticamente maior ($p < 0,05$) que os animais tolerantes (**figura 10**).

Estes resultados demonstram mais uma vez que o padrão de respostas imunológicas desenvolvido nos animais idosos normais foi diferente daquele desenvolvido nos animais idosos tratados quando jovens.

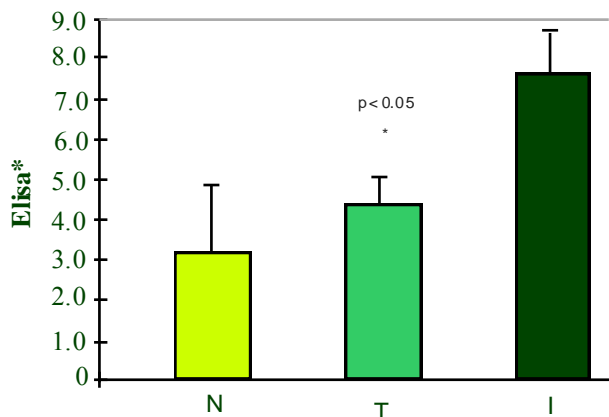


Figura 9: Anticorpos totais anti-Ova. Camundongos B6D2F1 foram tratados quando jovens e desafiados com Ova+CFA quando idosos conforme explicado no protocolo experimental da figura 1B. O gráfico mostra o título de anticorpos totais medidos por Elisa produzidos 72 horas após o desafio com Ova+CFA. As barras representam a média da somatória (ELISA*) das diluições 1/100 a 1/12400 no grupo (n=6-8) e a significância entre os grupos foi calculada pelo *Student t-test*.

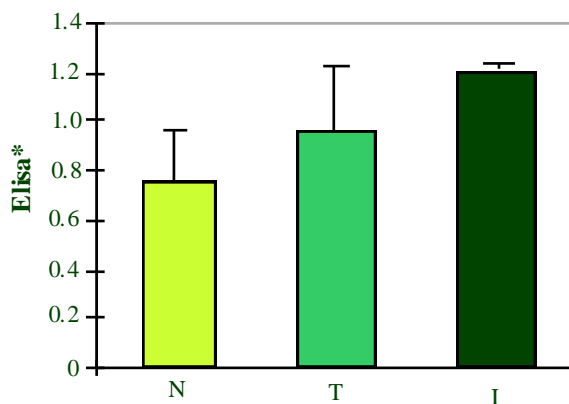


Figura 10: IgE total no soro. Camundongos B6D2F1 foram tratados quando jovens e desafiados com Ova+CFA quando idosos conforme explicado no protocolo experimental da figura 1B. O gráfico mostra o título de anticorpos totais da classe IgE medidos por Elisa produzidos 72 horas após o desafio com Ova+CFA. As barras representam a média da somatória (ELISA*) das diluições 1/100 a 1/12400 no grupo (n=6-8) e a significância entre os grupos foi calculada pelo *Student t-test*.

4.6 Produção das citocinas IL-4 e INF- γ por células linfoides do baço em animais idosos que foram tolerizados e imunizados quando jovens

Nosso próximo objetivo foi analisar a produção de citocinas como IL-4 e INF γ . Nos animais tratados ou não quando jovens. A **figura 11** mostrou que os linfócitos T dos animais normais desafiados somente quando idosos foram capazes de secretar grandes quantidades de INF- γ , mas não de IL-4, indicando um padrão tipicamente Th1. Por outro lado, os animais tolerantes apresentaram um perfil diferente, no qual houve uma maior produção de IL-4 por células do baço ao mesmo tempo em que houve uma diminuição de INF- γ , demonstrando ser uma padrão Th2.

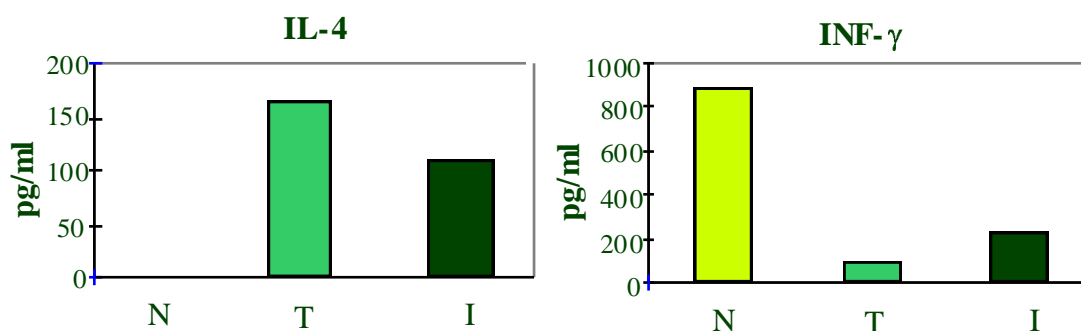


Figura 11: Produção de IL-4 e INF- γ por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de células. Células do baço de camundongos dos grupos Normal (N), tolerante (T) e Imune (I) foram coletadas no 7º dia após o desafio e cultivadas em meio RPMI completo contendo 500 μ g/ml de ovalbumina por 24 horas (para medida de IL-4) e 48 horas (para medida de INF- γ). Os sobrenadantes foram colhidos e testados por ELISA para a presença de IL-4 e INF- γ . As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IL-4 e INF- γ recombinantes.

4.7 Análise da produção de anticorpos totais e das classes IgM, IgG e IgA no soro de camundongos jovens e idosos

Os resultados à seguir são de experimentos realizados em camundongos jovens e idosos que não receberam qualquer tipo de tratamento prévio, com o objetivo de mostrar quais as alterações que ocorrem no sistema imune do animal idoso que poderiam impedir o estabelecimento da tolerância oral. Foi feita, então, a análise do título de anticorpos no soro dos camundongos jovens e idosos.

O resultado abaixo mostra um aumento no título de imunoglobulinas totais no soro dos animais idosos quando comparados com os animais jovens ($p < 0,001$) e, esse aumento pode ser devido a uma elevação do título IgG e IgA, mas não IgM (**figura 12**).

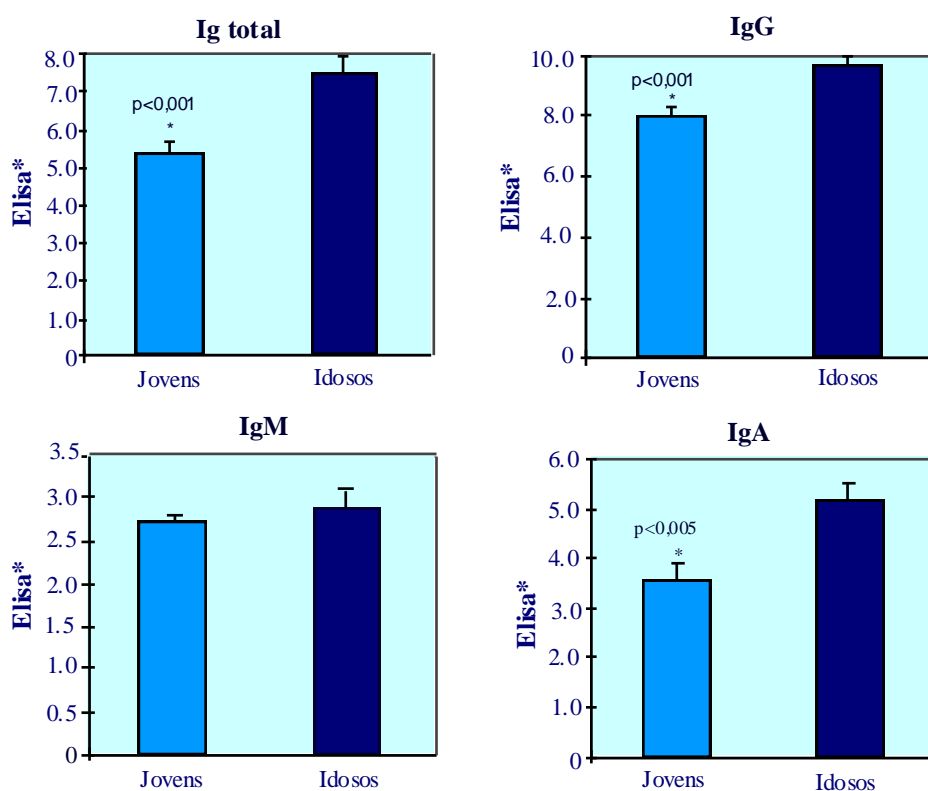


Figura12: Título de anticorpos totais e das classes IgM, IgG e IgA. Camundongos normais jovens e idosos foram sangrados no plexo axilar para posterior análise do título de imunoglobulinas no soro. As barras representam a média da somatória (ELISA*) das diluições 1/100 a 1/12400 no grupo de 6 camundongos

4.8 Células produtoras de imunoglobulinas totais e das classes IgM, IgG e IgA no baço e medula óssea

Como o título de anticorpos no soro dos animais idosos estava aumentado em relação aos animais jovens, foi de interesse nosso observar se haveria um aumento de células produtoras de imunoglobulinas totais e das classes IgM, IgG e IgA no baço e medula óssea dos animais jovens e idosos. Foi possível observar um aumento das células produtoras de imunoglobulinas totais dos animais idosos, tanto no baço (**figura 13A**) quanto na medula óssea (**figura 13B**), quando comparado com os camundongos jovens. E, esse aumento pode ser devido a uma elevação das células produtoras de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA. Em se tratando da análise de células produtoras de imunoglobulinas da classe IgM, foi observado um aumento do número destas células no baço e medula óssea dos animais idosos, quando comparados com os animais jovens, mas que não reflete em um aumento sérico de IgM nesses camundongos (**figura 12**).

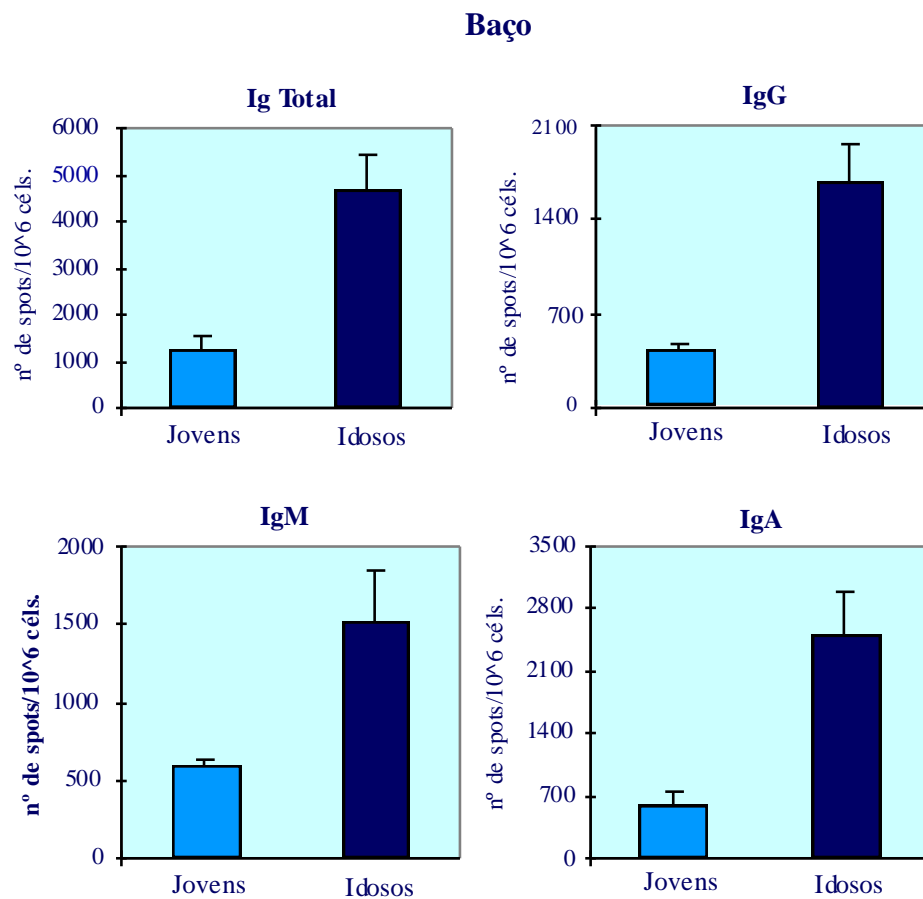


Figura 13A: Quantificação das células produtoras de imunoglobulinas totais e dos isotipos IgM, IgG e IgA no baço. Camundongos normais jovens e idosos foram sacrificados para a retirada da medula óssea e posterior contagem das células produtoras de anticorpos. As barras representam a média por grupo do n° de células produtoras de Ig neste órgão, que foi dado pelo n° SPOTS/células x 10⁶.

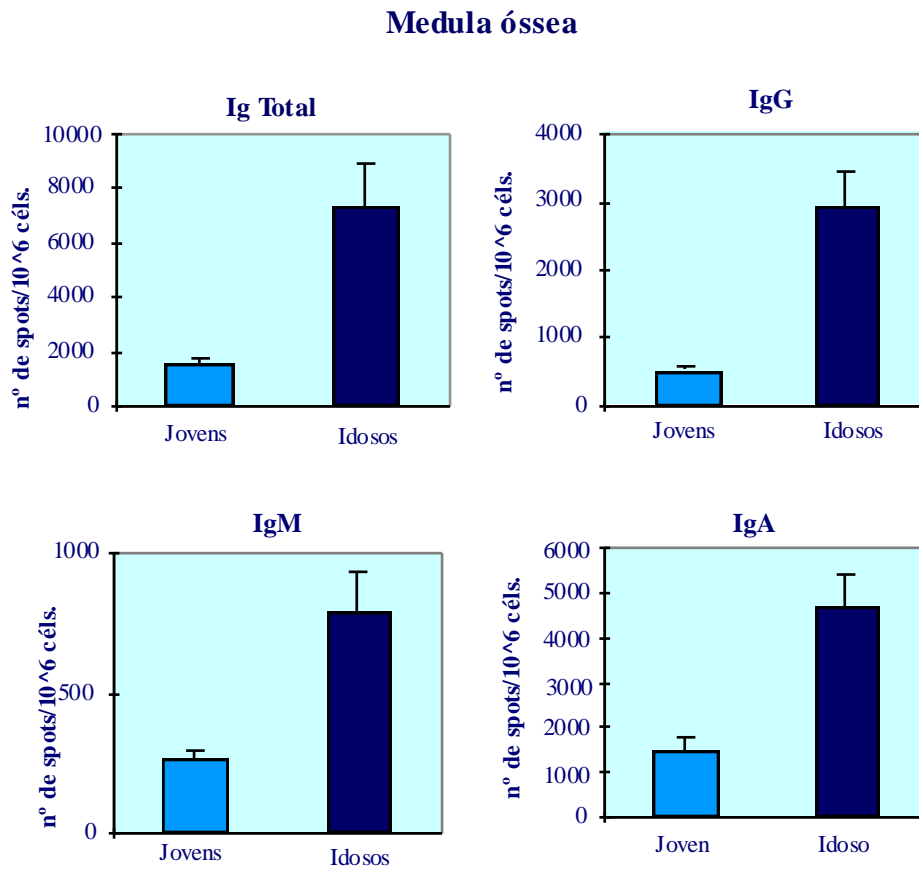


Figura 13B: Quantificação das células produtoras de imunoglobulinas totais e dos isotipos IgM, IgG e IgA na medula óssea. Camundongos B6D2F1 normais jovens e idosos foram sacrificados para retirada do baço e posterior contagem das células produtoras de Ig neste órgão através da técnica ELISPOT. As barras representam a média por grupo do n° de células produtoras de anticorpos neste órgão, que foi dado pelo n° SPOTS/células x 10⁶.

4.9 Atividade proliferativa de células linfocitárias presentes no baço de camundongos jovens e idosos

Como pode ser observado na **figura 14**, a capacidade de proliferação das células dos animais jovens foi muito menor que a dos idosos quando estas foram estimuladas com uma baixa concentração do mitógeno ($2\mu\text{g/ml}$). Com o aumento do estímulo, houve um aumento na atividade proliferativa das células dos animais jovens. A capacidade de proliferação das células dos camundongos idosos permaneceu inalterada conservando-se alta independente da dose do estímulo.

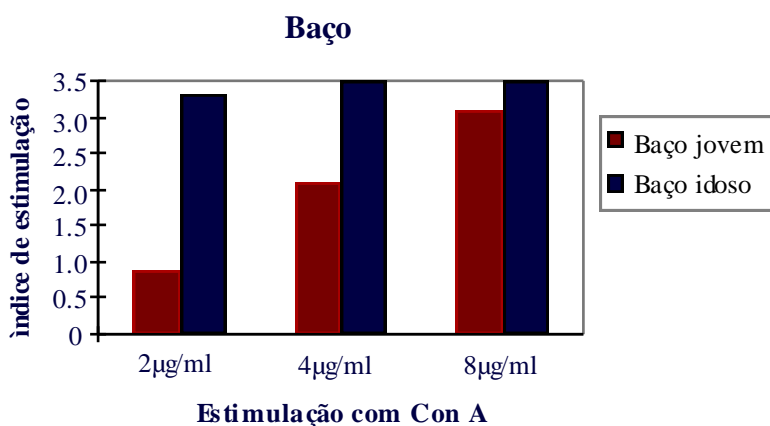


Figura 14: Capacidade proliferativa de células do baço. Camundongos B6D2F1 normais jovens e idosos foram sacrificados e o baço retirados para que a atividade proliferativa das células presentes neste órgão fosse medida. As barras representam o índice de estimulação (aumento de CPM em relação às células estimuladas com o meio).

5. Discussão

Persistência dos fenômenos da tolerância oral e imunidade na senescência

Estudo da produção de anticorpos

O envelhecimento é um processo biológico natural e está associado à modificações imunológicas marcantes. Tais modificações podem ser observadas na imunidade humoral que se encontra seriamente afetada, uma vez que a magnitude desta resposta para antígenos externos em animais experimentais e humanos senis é muito menor quando comparado com indivíduos jovens (Weksler, Russo & Siskind, 1989). O declínio da imunidade humoral no envelhecimento foi inicialmente relatado por volta de cinquenta anos atrás. Foi observado, nesta época, que a concentração de anticorpos naturais séricos reativos com hemácias heterólogas está diminuída em relação inversa com a idade do doador. Posteriormente, mostrou-se que a vacinação de indivíduos idosos produzia níveis mais baixos de anticorpos no soro quando comparados com indivíduos jovens que recebiam as mesmas vacinas. Este defeito na resposta imune humoral foi relacionado com a maior susceptibilidade gravidade das doenças infecciosas em velhos. Camundongos idosos também apresentam alterações imunológicas na produção de anticorpos específicos. Essas alterações na resposta imune a antígenos novos tanto em humanos como em modelos experimentais animais levou ao conceito, entre os gerontologistas, de que a senescência resultaria em um estado de imunodeficiência. Várias evidências, no entanto, são inconsistentes com esta hipótese. Em primeiro lugar, nem o nível de imunoglobulinas séricas nem o número de linfócitos B diminui com a idade. Em segundo lugar, a concentração de auto-anticorpos séricos assim como o número de linfócitos B secretando imunoglobulinas na verdade aumenta com a idade. Tais observações sugerem que a senescência imunológica não é um estado de imunodeficiência, mas antes um estado de desregulação imunológica. Nossos resultados estão coerentes com os achados destes autores, já que animais normais de 70 semanas de idade (não manipulados quando jovens) ao receberem um desafio intraperitoneal (i.p.) com o antígeno (ovalbumina no nosso caso) apresentaram títulos muito baixos de anticorpos anti-Ova (**figura 2**, gráfico b). Resolvemos desafiar novamente estes animais com a Ova, agora no contexto inflamatório do adjuvante alumínio [Al(OH)₃], com o intuito de

investigar se haveria alguma alteração no título de imunoglobulinas apresentado por estes animais, e o que nós observamos foi a permanência de títulos muito baixos de anticorpos (**figura 2**, gráfico c). Mesmo após um terceiro desafio intraperitoneal, somente com Ova, estes camundongos mantiveram um baixo título de anticorpos (**figura 2**, gráfico d) demonstrando, então, que esses animais apresentam uma refratariedade a imunizações com novos antígenos.

No entanto, o que nos chamou a atenção foi o fato de que animais idosos imunizados quando jovens (grupo imune) ainda apresentarem altos títulos de anticorpos anti-Ova um ano e meio após a indução da imunização sistêmica (**figura 2**, gráfico a). Este resultado nos indica que embora a susceptibilidade à indução da imunidade durante o processo de envelhecimento esteja diminuída, a imunização sistêmica induzida no animal jovem está mantida na senescência, uma vez que os camundongos imunizados quando jovens ainda permaneceram imunes. Além disso, podemos observar que os camundongos tornados tolerantes quando jovens (grupo tolerante) apresentaram um título de anticorpos anti-Ova significativamente mais baixo quando comparado com os animais imunes e ao mesmo tempo similares ao dos animais normais (**figura 2**, gráfico a). Como o fenômeno da imunidade foi mantido ao longo da vida do animal, todos os grupos foram desafiados intraperitonealmente com a Ova com o objetivo de investigar se haveria alguma alteração na produção de anticorpos nos animais normais, tolerantes e imunes. Após terem sido desafiados i.p. com a Ova, observamos que o perfil de imunoglobulinas nos três grupos não se modificou, pois o título de anticorpos dos animais imunes apresentou-se o mesmo (**figura 2**, gráfico b). Com relação aos animais tolerantes, estes continuaram a apresentar títulos de anticorpos anti-Ova significativamente mais baixos, mesmo após o desafio com a proteína, do que os animais imunes, indicando que não somente a imunidade, mas também o fenômeno da tolerância oral foram mantidos ao longo da vida do camundongo (**figura 2**, gráfico b). Já o desafio com a Ova na presença do adjuvante alumínio, foi capaz de modificar o título de anticorpos dos animais. Os animais imunes apresentaram títulos de anticorpos mais altos daquele observado após o primeiro desafio, demonstrando que os animais previamente imunizados continuaram susceptíveis à indução de imunizações sistêmicas, ao contrário dos animais normais desafiados somente quando idosos (**figura 2**, gráfico c). Podemos observar, também, que a diferença na produção de anticorpos entre os

grupos tolerantes e imunes foi mantida, demonstrando novamente a persistência da tolerância oral durante o envelhecimento (**figura 2**, gráfico c). Os animais receberam, então, um terceiro desafio intraperitoneal somente com a Ova solúvel. Observamos, então, que não houve alteração nesse título em nenhum dos grupos testados (**figura 2**, gráfico d). Estes dados mostram que, provavelmente, o efeito do adjuvante foi amplificar os níveis de uma reatividade já em curso. A produção de anticorpos dos animais de todos os grupos foi estimulada até um *plateau* que a imunização com o antígeno não foi capaz de alterar. Provavelmente, o uso do adjuvante novamente seria capaz de ainda aumentar essa produção mas essa capacidade certamente também atingiria um *plateau* de exaustão.

Nossos resultados com relação à manutenção da tolerância oral contrariam o trabalho apresentado por Strobel e Ferguson, no qual eles demonstraram a supressão da resposta humoral somente até 3 meses após a administração oral da Ova, quando os animais foram, então, desafiados com Ova e o adjuvante completo de *Freund* (CFA) para posterior análise dos anticorpos. Outros trabalhos em tolerância oral demonstraram que a supressão da resposta humoral dura aproximadamente 2 meses depois do tratamento oral com altas doses de ovalbumina ou hemácias de carneiro. Em nossos resultados, a supressão da resposta imune, medida através da produção de anticorpos, foi mantida por um ano e meio após o pré-tratamento oral. Essas discrepâncias nos resultados podem ser devidas a uma variação importante no protocolo experimental: nossos animais foram imunizados com Ova e adjuvante depois do tratamento oral, nos demais trabalhos citados, os camundongos foram simplesmente tratados por via oral. Melamed e Friedman mostram um efeito semelhante quando eles medem a supressão da resposta proliferativa de linfócitos de linfonodos poplíteos de camundongos tratados por via oral com uma gavagem de 20 mg de Ova e a imunização posterior com 100 µg de Ova em adjuvante completo de Freund. Nesses camundongos, ocorreu uma supressão efetiva da resposta proliferativa específica até o final do experimento (2 meses). No entanto, nos animais apenas tratados por via oral, a supressão desapareceu depois de 21 dias do tratamento. Os autores atribuem essa persistência aumentada à presença contínua do antígeno assegurada pelo efeito de depósito do adjuvante. No nosso caso, no entanto, essa explicação não seria razoável já que a tolerância persiste por um ano e meio e seria difícil que o adjuvante mantivesse a Ova no organismo do animal por tanto tempo. É mais provável que os circuitos de células ativadas durante o

processo de tolerização tenha sido expandido pela ação inflamatória do adjuvante auxiliando assim na manutenção da memória dessa ativação.

Como discutiremos a seguir, os adjuvantes são agentes com ação inflamatória já que eles prolongam o tempo de exposição do antígeno às células apresentadoras locais e, conseqüentemente, potenciam a ativação e proliferação dos linfócitos T reativos com o antígeno. O resultado da proliferação aumentada desses linfócitos é a amplificação da reatividade ao antígeno e a geração de mecanismos para a sua manutenção.

Devido a diferença nas respostas imunológicas entre os animais normais (desafiados somente quando idosos) e os imunes, foi do nosso interesse observar se o padrão de isotipos destes anticorpos também seriam diferentes. Pode-se notar que o grupo normal apresentou títulos muito baixos de anticorpos anti-Ova tanto antes quanto após os desafios com a Ova na presença ou não do adjuvante, mas com uma predominância da imunoglobulina da classe IgM ao longo das imunizações (**figura 3A**). Já os animais tolerizados quando jovens (grupo tolerante) antes do desafio com Ova apresentaram um padrão isotípico semelhante ao dos animais normais, com uma predominância de IgM. No entanto, após os desafios com a Ova este perfil alterou-se, houve um aumento nos níveis de IgG1 que foi acentuado após o desafio com Ova e alumínio. Este padrão é semelhante àquele observado nos animais imunes, no qual a classe de imunoglobulinas que também se mostrou predominante, antes e após as imunizações, foi IgG1 (**figura 3A**). O padrão isotípico desses animais manteve-se inalterado após o terceiro desafio com a Ova (**figura 3B**). Já foi demonstrado que o padrão isotípico de animais jovens tolerantes a altas doses de antígenos é semelhante ao do animal imune com o predomínio do isotipo IgG1, embora haja uma supressão no nível de anticorpos totais no primeiro grupo. Garside e colaboradores também demonstraram que tanto a produção de IFN- γ por células Th1 quanto a de IL-4 por células Th2, responsáveis pela indução da secreção de IgE e IgG1 por linfócitos B, estão suprimida pela administração de altas doses de antígeno. Essa supressão generalizada da resposta imune humoral resultaria, então, na manutenção, pelos animais tolerantes do mesmo padrão isotípico dos animais imunes. Apenas os níveis seriam mais baixos. Nossos resultados mostraram que o perfil isotípico apresentado pelos animais idosos previamente tratados quando jovens (grupos tolerante e imune) é semelhante ao dos animais jovens também com o predomínio do isotipo IgG1. Este resultado sugere que o fato dos animais terem sido imunizados

quando jovens fez com que eles mantivessem um padrão de resposta imunológica de um animal jovem, diferente daquele observado nos animais normais que foram desafiados somente quando idosos. Aparentemente, então, não apenas a capacidade de imunização e a tolerância persistem, mas o seu padrão se mantém ao longo da vida do animal. A súbita mudança de isotipo observada na resposta imune do grupo tolerante de IgM para IgG1 quando da administração i.p. da Ova solúvel mostra que, nesses animais, não somente os níveis de anticorpos são comparáveis aos do animal jovem mas a troca de isotipos pelas células B está preservada. Este dado nos sugere que as interações entre os linfócitos T e B reativos com Ova estão mantidas nesses animais já que a diferenciação e a troca de isotipos pelos linfócitos B é crucialmente dependente da ação de citocinas secretadas pelos linfócitos T. é difícil estabelecer até que ponto as alterações observadas na senescência na atividade das células B se deve a defeitos intrínsecos a estas células ou se elas simplesmente refletem alterações nos linfócitos T. Alguns autores acreditam que grande parte da queda na resposta humoral relacionada com a senescência pode ser um resultado de mudanças na atividade dos linfócitos T em promoverem a ativação e diferenciação dos linfócitos B. A expressão de algumas moléculas de superfície importantes na interação entre linfócitos T e B, tais como CD40L e CD28, está diminuída nos linfócitos T de animais velhos (Li, Verma & Miller, 1995). Além disto, ocorre uma profunda alteração na secreção de citocinas pelos linfócitos T desses animais: há uma diminuição drástica na produção de IL-2 e um aumento na produção de algumas citocinas tais como IL-10, IL-4, IL-6 e IFN- γ (Daynes, Araneo, Dowell, Huang & Dudley, 1990). Tais mudanças podem potencialmente impedir a ativação e diferenciação normal dos linfócitos B em plasmócitos. Por outro lado, as modificações nas interações entre linfócitos T e B, tais como a baixa expressão de moléculas como CD28 e CD40L, são importantes fatores na diminuição dos índices de hipermutação nas moléculas de anticorpos produzidos por linfócitos B de centros germinativos de animais velhos (Miller & Kelsoe, 1995). A diminuição dos índices de hipermutação altera o perfil de afinidade dos anticorpos formados pelos animais idosos quando estes são imunizados. Além desses defeitos nas interações linfocitárias, no entanto, os linfócitos B apresentam alterações marcantes no seu repertório provavelmente refletindo diferenças acumuladas na seleção do repertório dos linfócitos B que compreendem o *pool* de células disponível no animal. O aumento na concentração de auto-anticorpos em

camundongos e humanos senis está bem relatado na literatura (Weksler et al., 1989). Além disto, famílias gênicas de regiões V não utilizadas por animais jovens estão representadas em altas frequências em animais velhos (Nicoletti, Borghesi-Nicoletti, Yang & Schulze, 1991; Riley, 1989) e mudanças na extensão das regiões D incorporadas no RNAm codificando imunoglobulinas também estão presentes nesses animais (Bangs, Sanz & Teale, 1991). Difícil estabelecer o mecanismo pelo qual os animais uma vez em contato com a Ova quando jovens, mantêm a memória desse encontro na sua produção de anticorpos (seja ela refletida na imunização ou na tolerância), mas nossos dados indicam que esta manutenção envolve tanto os linfócitos B como também os linfócitos T reativos com a Ova. Vários trabalhos têm demonstrado que a administração do adjuvante hidróxido de alumínio com antígenos leva ao aumento da resposta humoral (Vogel, 1995) (Cox & Coulter, 1997). Glenny e colaboradores propuseram que o principal mecanismo de ação do alumínio é a formação de depósitos no local do desafio, permitindo a liberação lenta do antígeno e prolongando assim o tempo para a interação entre o antígeno, as células apresentadoras de antígenos (APC) e os linfócitos (Glenny, Buttle & Stevens, 1931). Uma das principais ações desse adjuvante em roedores é direcionar a resposta imune para um padrão Th2, que é caracterizado pelo predomínio de imunoglobulinas das classes IgG1 e IgE e pela ausência de IgG2a. O alumínio parece estar envolvido na indução da secreção preferencial de citocinas do tipo Th2, como por exemplo IL-4 e IL-5, mas não de citocinas associadas ao padrão Th1, como INF- γ pois, normalmente, ele não é eficiente em induzir uma resposta imune mediada por células. O uso do alumínio tem sido associado também à migração de eosinófilos para o local do desafio por um mecanismo dependente de células T onde provavelmente a secreção de IL-5 seria importante (Warren, Vogel & Chedid, 1986) (Bomford, 1998).

Dois experimentos recentemente relatados na literatura confirmam a ideia de que a liberação lenta de antígenos pode estimular preferencialmente um padrão de resposta de linfócitos T do tipo Th2. No modelo experimental de asma descrito por Russo e colaboradores, a implantação de um fragmento de clara de ovo solidificada no subcutâneo de camundongos é capaz de desencadear uma reação alérgica no pulmão dos animais quando estes são posteriormente desafiados com Ova por aerosol. Essa reação se caracterizou pela produção de anticorpos IgG1 e IgE anti-Ova e pela presença de um infiltrado inflamatório pulmonar e bronquiolar predominantemente eosinofílico. Os autores

acreditam que a clara de ovo solidificada deve seu efeito alérgico exatamente à liberação lenta do antígeno no subcutâneo, região rica em células dendríticas. Outro trabalho nessa mesma direção foi publicado por Guery e colaboradores (Guery, Galbiati, Smiroldo & Adorini, 1999). Estes autores mostraram que a administração contínua de proteínas solúveis por um período de 10 dias por uma bomba osmótica implantada no subcutâneo de camundongos BALB/c induz uma inibição duradoura da proliferação de linfócitos T de linfonodos estimulados in vitro com o antígeno. Essa inibição da proliferação é paralela à supressão da produção de IFN- γ e IL-2 e a um aumento na secreção de IL-4 e IL-5 pelos linfócitos T CD4⁺. Os camundongos BALB/c tem uma resposta Th2 amplificada devido a fatores genéticos provavelmente envolvendo a expressão de genes do MHC. Esses dados indicam que a liberação lenta de antígeno é capaz de estimular uma reatividade ligada a secreção de citocinas do padrão Th2 em animais susceptíveis.

O adjuvante completo de *Freund* (CFA) também tem sido utilizado em protocolos experimentais para imunizações. Seu mecanismo de ação parece ser semelhante ao do alumínio, pois ele também promove a liberação lenta do antígeno, protegendo, desta maneira, a degradação rápida do antígeno. Isso permite uma maior interação entre o antígeno e as APC (Claassen, Leeuw, Greeve, Hendriksen & Boersma, 1992). Adicionalmente, apesar da emulsão óleo e água por si só ser suficiente como adjuvante, a presença do extrato de *Mycobacterium Calmette-GuÈrin* (BCG) na sua composição aumenta em muito a sua capacidade de estimular a resposta imune. O CFA é um dos adjuvantes mais potentes para a estimulação de uma resposta imune mediada por células T, como a reação de DTH (reação de hipersensibilidade tardia). Essa reação envolve a participação de citocinas do padrão Th1, como por exemplo, INF- γ (Vogel, 1995).

A presença do extrato de *Mycobacterium* aparentemente é importante para a estimulação de macrófagos locais. Como os macrófagos são células inflamatórias que, quando ativadas, secretam várias citocinas incluindo TNF- α , é possível que sua estimulação preferencial pelo adjuvante direcione a apresentação do antígeno e a ativação dos linfócitos T que migram para a área do desafio.

O mecanismo de ação detalhado desses adjuvantes ainda não está claro, mas aparentemente a diferença entre os dois, alumínio e CFA, parece ser a presença do *Mycobacterium tuberculosis* no último. Enquanto que a liberação lenta do antígeno

promovida pelo alumínio pode explicar a predominância da produção de anticorpos da classe IgG1, a ativação preferencial de uma imunidade do tipo celular, mediada então por linfócitos T do tipo Th1, pelo CFA pode estar ligada fundamentalmente a características presentes nesse bacilo já que este é o tipo de resposta observada na infecção com o *Mycobacterium tuberculosis*.

O primeiro desafio antigênico aos nossos animais foi feito pela administração intraperitoneal de Ova solúvel. Já foi demonstrado que administrações intraperitoneais ou intravenosas de proteínas com ou sem adjuvante podem induzir um estado de tolerância sistêmica. Proteínas solúveis são particularmente capazes de induzir tolerância quando administradas parenteralmente. A tolerância induzida pela administração parenteral de antígenos já foi demonstrada inclusive para autoantígenos como MBP e insulina. Os mecanismos envolvidos nesse tipo de tolerância também não estão claros já que alguns autores sugerem o papel de linfócitos T regulatórios e citocinas anti-inflamatórias e outros sugerem a operação de mecanismos passivos de indução tais como a deleção clonal. Nossos resultados nos deixaram uma questão: será que a Ova solúvel injetada intraperitonealmente como desafio teve o mesmo efeito, ou seja, ela induziu um estado de tolerância nos animais do grupo normal impedindo sua imunização posterior com a Ova e adjuvante? Para responder a esta pergunta um novo experimento foi programado onde os animais dos mesmos três grupos (normal, tolerante e imune) tratados por via oral com Ova e imunizados com Ova e alumínio quando jovens foram, depois de 62 semanas, desafiados com Ova na presença do adjuvante completo de *Freund* (CFA). Nossos dados indicam que, mesmo após a imunização com um potente adjuvante, os animais do grupo normal continuaram a produzir baixos títulos de anticorpos anti-Ova, sugerindo que a refratariedade observada na produção de anticorpos específicos se deve ao processo de envelhecimento e não a uma possível supressão induzida pelo desafio i.p. com a Ova solúvel. Já os animais tolerantes e imunes apresentaram títulos de anticorpos anti-Ova mais altos (**figura 4**). Estes resultados sugerem, novamente, que a diferença no padrão de resposta imunológico entre os grupos normais, tolerantes e imunes pode ser devido ao pré-tratamento dado aos dois últimos grupos com a Ova e o alumínio.

Estudo da proliferação celular *in vitro*

A atividade dos linfócitos T tende a declinar com a idade e isto pode ser observado tanto na proliferação celular, na atividade citotóxica quanto no auxílio aos linfócitos B (Gottesman, Kristie & Walford, 1981; Konen, Smith & Walford, 1973). Um fator fundamental em todas essas atividades, a produção de IL-2 também está diminuída na senescência em camundongos e humanos. A suplementação de IL-2 na maioria dos casos restaura apenas parcialmente a atividade dos linfócitos T provavelmente porque a expressão de receptores de alta afinidade para IL-2 também está muito diminuída em linfócitos de animais idosos (Miller, 1996). Esses defeitos na produção de IL-2 e do seu receptor, na verdade, refletem outras alterações importantes observadas durante o envelhecimento nos linfócitos T: a) diferentemente dos animais jovens que apresentam predominantemente células virgens, os linfócitos T de animais idosos apresentam um fenótipo de células ativadas; b) várias alterações na transmissão de sinais ocorrem nessas células durante o envelhecimento; c) ocorrem mudanças nas interações com as células apresentadoras. Está vastamente demonstrado que a maioria das células T de animais idosos apresenta um fenótipo típico de células ativadas: CD45R^{lo}, CD62L^{lo}, CD44^{hi}, Pgp-1^{hi} (Lerner, Yamada & Miller, 1989) (Pilarski, Yacyshyn, Jensen, Pruski & Palst, 1991) (Weksler et al., 1989). Além da presença desses marcadores, essas células também secretam um padrão de citocinas de células ativadas. Ocorre com a senescência um aumento na produção de IFN- γ , IL-4, IL-6 e IL-10 (Daynes et al., 1990) (Hobbs et al., 1994; Hobbs et al., 1993) (Ernst et al., 1990). O predomínio de linfócitos T efetores nos idosos pode explicar pelo menos parcialmente o declínio na sua capacidade de responder a novos antígenos. Também as alterações na transmissão de sinais nessas células podem ser responsáveis pela baixa na reatividade imunológica. Células T de animais idosos mostram defeitos na mobilização de cálcio (Grossman, Ledbetter & Rabinovitch, 1990; Miller, 1987) e na fosforilação de proteínas (Patel & Miller, 1992) nos primeiros 5 minutos depois do contato com as células apresentadoras. O envelhecimento leva ao declínio na fosforilação promovida tanto por tirosina-quinases quanto por serina-treonina-quinases (Patel & Miller, 1992; Whisler, Newhouse & Hackshaw, 1995) e a própria distribuição dessas kinases dentro da célula parece estar também bastante alterada (Grosh & Miller, 1995). Assim, os próprios

mecanismos moleculares de ativação dos linfócitos T, tanto por meio de seu receptor clonal quanto através da molécula de CD4, apresentam alterações marcantes no envelhecimento (Shi & Miller, 1992).

Não somente a transmissão de sinais está alterada, mas aparentemente a interação com as células dendríticas nos animais velhos não tem a mesma eficiência que nos jovens. Tanto fatores ligados aos linfócitos T interferem, como por exemplo, a perda de expressão de CD28, como fatores ligados às células apresentadoras. Foi observado que as células dendríticas de idosos têm menor capacidade de apresentação antígenos do vírus influenza, elas apresentam uma redução na expressão dos produtos de classe II do MHC e uma resposta diminuída aos fatores de crescimento (FSC) quando comparadas as células de animais jovens. (Pawelec & Solana, 1997).

Nossos resultados estão de acordo com esta ideia e demonstram que as células linfoides do baço e linfonodo inguinal de animais normais (desafiados somente quando idosos) apresentaram uma baixa capacidade proliferativa ao serem estimuladas com Ova, indicando que animais idosos são refratários à indução de novos estímulos. No entanto, os animais idosos previamente tratados (tolerantes e imunes) apresentaram uma maior capacidade proliferativa, embora as células linfoides do grupo tolerante tenham proliferado menos que as células linfoides dos camundongos imunes, demonstrando, então, que a tolerância oral também está mantida para uma reação celular *in vitro*, (**figura 5**). Estes resultados nos mostram, novamente, que o padrão de resposta imunológica apresentado pelos animais normais desafiados somente quando idosos é diferente daquele apresentado pelos animais idosos previamente tratados (grupos tolerante e imune). Estes últimos grupos apresentam um padrão de ativação semelhante ao do animal jovem para o antígeno apresentado a eles na juventude.

Nossos resultados com relação à produção de IL-2 também conferem com os dados descritos na literatura, mais uma vez confirmando o papel dessa citocina na proliferação celular de linfócitos T. Os linfócitos dos animais normais desafiados apenas quando idosos (grupo normal) secretaram baixas quantidades desta citocina, ao contrário das células dos animais idosos previamente tratados (tolerantes e imunes) que foram capazes de secretar quantidades bem maiores (**figura 6**) quando estimuladas *in vitro* com ovalbumina. Também nesses dois parâmetros, pudemos verificar que o contato com o ovalbumina em adjuvante na juventude foi capaz de manter a memória dessa reatividade durante o envelhecimento.

Estudo da reação celular *in vivo*

Como a tolerância oral, induzida nos animais ainda jovens foi mantida para a produção de anticorpos, ou seja, pela atividade dos linfócitos B (Elisa*) e para uma reação celular *in vitro* (atividade proliferativa das células linfoides), foi do nosso interesse pesquisar se este fenômeno também estaria mantido para uma reação celular *in vivo* mediada, agora, por linfócitos T. E para observarmos este efeito nós induzimos uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia (tipo IV) nos animais tratados ou não quando jovens, que é sabidamente uma reação mediada por este tipo celular. A justificativa para induzirmos este modelo de hipersensibilidade é de que dados já citados na literatura mostram que a tolerância oral é mais facilmente induzida e mais duradoura para a resposta celular do que para a resposta humoral (Kay & Ferguson, 1989) (Ke & Kapp, 1996; Mowat, 1986) (Mowat et al., 1982), (Heppel & Kilshaw, 1982; Strobel & Ferguson, 1987). Strobel, por exemplo, demonstrou que a supressão da resposta imune celular poderia ser mantida por até 17 meses após uma única administração oral (gavagem) de 100 mg/ml de Ova (Strobel & Ferguson, 1987). As reações de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) podem ser induzidas após a imunização com uma determinada proteína (ovalbumina, no nosso caso) na presença de um potente adjuvante como o adjuvante completo de *Freund* (CFA) na base da cauda do animal. Essa reação pode ser transferida adotivamente para receptores singênicos normais, através de injeções venosas de células dos linfonodos inguinais de animais já sensibilizados sugerindo o envolvimento de linfócitos T no fenômeno (Titus & Chiller, 1981). Algumas horas após desafio com a proteína desnaturada é possível observar um inchaço no coxim plantar da pata do animal. O nome hipersensibilidade do tipo tardia é devido à ocorrência de uma intensa reação celular no local do desafio que persiste por até 72 horas. Inicialmente, 4 horas após a injeção com a proteína desnaturada na pata, ocorre uma reação imediata caracterizada pela presença de células. Esse infiltrado é gradualmente, substituído por uma reação do tipo retardada com a presença, agora, de linfócitos e macrófagos. Uma vez sensibilizados pela proteína desnaturada, esses linfócitos que promovem a DTH passam a secretar citocinas com um padrão tipicamente Th1 como IL-2 e principalmente INF- γ , um potente ativador de macrófagos. Além dessas citocinas há

também a síntese de TNF- α por estas células. A secreção de citocinas por linfócitos e macrófagos desempenha um papel fundamental na reação de DTH, pois elas promovem a migração de mais células mononucleares para o local do desafio (Abbas, Lichtman & Pober, 1996). Diante das características descritas acima, nossos resultados indicam que os animais normais desafiados somente quando idosos foram capazes de desenvolver uma reação típica de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), uma vez que a reação celular apresentada por estes animais permaneceu alta até 72 horas após o desafio (**figura 7**). Além disso, esta reação foi também maior do que aquela observada nos animais idosos tolerantes e imunes. Diferentemente do observado para a produção de anticorpos anti-Ova nestes animais, que se mostrou muito baixa tanto antes quanto após as imunizações com a Ova, bem como a atividade proliferativa dos linfócitos T presentes no baço e linfonodos inguinais que também se apresentou bastante reduzida com relação aos animais idosos tolerantes e imunes. Aparentemente, então, os animais normais desafiados somente na senescência são apenas relativamente refratários a novos estímulos externos, uma vez que estes foram capazes de responder ativamente às imunizações com a Ova desenvolvendo uma reação típica de DTH.

Porém, para a nossa surpresa, a reação celular apresentada pelos camundongos tornados tolerantes e imunes quando jovens foi menor do que aquela observada nos animais normais nas primeiras 24 horas após o desafio e, esta ainda mostrou-se ainda mais reduzida 48 e 72 horas depois do desafio. A espessura das patas medida em 48 e 72 horas pode ser considerada normal (**Figura 7**). Estes resultados sugerem, então, que estes animais estariam desenvolvendo uma reação imunológica diferente daquela desenvolvida nos animais normais, possivelmente, uma reação de hipersensibilidade do tipo I.

Este modelo de hipersensibilidade (tipo I) é característico das reações alérgicas, ocorrendo imediatamente após o desafio com o antígeno na presença, por exemplo, do adjuvante alumínio [Al(OH)₃]. É caracterizada pela presença de uma pápula de cor avermelhada (dilatação dos vasos sanguíneos presentes no local da sensibilização), na qual pode ser evidenciado um infiltrado celular com a presença de mastócitos e basófilos. Estes são, então, ativados através da ligação das imunoglobulinas da classe IgE secretada por linfócitos B previamente ativados pela exposição ao antígeno, com seus receptores de alta afinidade para IgE (Fc ϵ). Esta ligação induz a desgranulação dos mastócitos levando à

liberação de mediadores pré-formados presentes no seu citoplasma, tais como histamina, proteases e outros, que promovem a dilatação dos vasos sanguíneos, bem como a constrição bronquiolar. Algumas horas após este evento tem início, então, uma segunda reação, denominada “reação tardia” (ou *late fase reaction*) que pode ocorrer até 24 horas depois do desafio com o antígeno. Neste intervalo de tempo, o edema se apresenta mais brando, mas há um acúmulo de células polimorfonucleares como neutrófilos e eosinófilos. Essas reações tardias assemelham-se com as reações de DTH, pois envolvem o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares nas primeiras horas mas apresentar um grau máximo de inflamação por volta de 24 horas e, a partir de então, a reação cede gradualmente. A *late fase reaction* faz parte da hipersensibilidade imediata (tipo I), uma vez que esta reação pode ser transferida adotivamente através das imunoglobulinas IgE.

Frente a este panorama, nossos dados indicam que os animais idosos tolerantes e imunes, na verdade, desenvolveram uma reação tardia da hipersensibilidade imediata (tipo I), uma vez que a reação celular ocorreu até 24 horas após o desafio.

Devido a uma diferença no tempo de ocorrência das reações desenvolvidas nos animais normais, tolerantes e imunes e também para melhor caracterizá-las, foi feito um corte histológico do coxim plantar da pata esquerda destes camundongos. A análise histológica desse tecido dos animais normais desafiados somente quando idosos mostrou a presença de um infiltrado de células mononucleares com a presença de linfócitos T e macrófagos sugerindo fortemente que a reação celular desenvolvida nestes animais foi uma reação de DTH (**Figura 8**). Os animais imunes, por sua vez, apresentaram um infiltrado celular diferente daquele apresentado pelos animais normais com predomínio de células polimorfonucleares principalmente eosinófilos (**Figura 8**). Este infiltrado celular não é um padrão característico das reações de hipersensibilidade do tipo IV. Nossa hipótese é de que estes camundongos não desenvolveram uma reação de DTH, mas sim uma reação tardia da hipersensibilidade imediata (*late fase reaction*). Os animais tolerantes apresentaram um infiltrado de células semelhantes ao observado nos camundongos imunes com um predomínio de eosinófilos, mas apresentaram uma menor proporção destas células. Esta redução no infiltrado celular do grupo tolerante em relação aos animais imunes confirma a manutenção do fenômeno da tolerância oral nesses animais.

Diante das diferenças nos padrões de respostas imunológicas desenvolvidas nos animais idosos normais, tolerantes e imunes, nossa próxima iniciativa foi analisar a produção de anticorpos no soro, destes animais.

Com relação à produção de anticorpos anti-Ova, foi possível observar que os animais normais desafiados somente quando idosos apresentaram títulos de anticorpos muito menores quando comparado com os animais imunes, apesar da reação celular desenvolvida nesses animais ter se apresentado maior (**figura 9**). Este dado nos indicou que o tipo de reação imunológica induzida nos animais normais não foi uma reação dependente de anticorpos, e sim uma reação mediada por células T, diferente dos animais idosos tolerantes e imunes que obtiveram títulos de anticorpos mais altos, demonstrando que a reação celular desenvolvida nestes animais, provavelmente, seria dependente de anticorpos. Para saber se estas reações seriam mais especificamente dependente de IgE, e também como houve uma presença marcante de eosinófilos no infiltrado de células dos animais idosos tolerantes e imunes, realizamos, então, a medida de IgE total no soro dos animais. A análise do título de anticorpos da classe IgE mostrou que os animais idosos imunes foram capazes de produzir maiores quantidades de IgE quando comparado com os animais normais (**Figura 10**) sugerindo novamente que a reação celular ocorrida nestes animais seria uma reação dependente de anticorpos, mais especificamente IgE.

Como o padrão de resposta imunológica desenvolvido em animais idosos tratados somente na senescência foi diferente daquele observado em animais idosos tratados quando jovens, nosso próximo objetivo foi analisar o perfil de citocinas apresentados por estes animais. Foi possível notar que os camundongos normais desafiados apenas na senescência apresentaram um padrão de citocinas tipicamente tipicamente Th1, uma vez que as células linfoides esplênicas estimuladas *in vitro* com Ova foram capazes de secretar grandes quantidades de INF- γ , mas não de IL-4, que é característico de reações de DTH (**figura 11**). Por outro lado, os animais idosos tolerantes e imunes mostraram um perfil de citocinas bem diferente, no qual houve uma maior secreção de IL-4 e ao mesmo tempo uma baixa secreção de INF- γ demonstrando ser um padrão tipicamente Th2, característico de reações de hipersensibilidade do tipo I (**Figura 11**) já que a IL-4 é a citocina envolvida na troca de isotipo para IgE (Abbas et al., 1996). Esse dado confirma, novamente, que as reações imunológicas desenvolvidas nestes três grupos de animais foram diferentes.

Todos estes resultados confirmam a hipótese de que os animais normais tratados somente na senescência desenvolveram uma reação típica de DTH, uma vez que a reação induzida nestes animais persistiu até 72 horas após o desafio, foi independente de anticorpos e acompanhada de um grande infiltrado de células mononucleares com a presença de linfócitos e macrófagos. Já os camundongos idosos tolerantes e imunes desenvolveram reações tardias de hipersensibilidade do tipo I, pois a reação celular desenvolvida nestes animais persistiu até 24 horas após o desafio, foi uma reação dependente de anticorpos e acompanhada de um infiltrado de células polimorfonucleares com uma predominância de eosinófilos.

Já está bem descrito na literatura que o envelhecimento está associado a várias alterações imunológicas, sendo uma delas a mudança no perfil de citocinas secretado pelos linfócitos T ativados. Há uma maior produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e INF- γ em animais idosos quando comparados com os jovens (Hoobs, et al., 1993, Hoobs, et al., 1994). Nossos resultados foram, em parte, compatíveis com os achados destes autores, uma vez que os linfócitos T dos animais normais desafiados somente quando idosos secretaram INF- γ , mas ao contrário do que mostra a literatura, as células destes animais não secretaram IL-4. Estes resultados contrastantes poderiam ser explicados por diferenças técnicas, como por exemplo, o tempo de cultura das células, a purificação ou não das subpopulações das células T, bem como diferenças nas raças de camundongos (Engwerda, et al., 1996).

Alguns autores mostram que assim como a proliferação celular, a indução da reação de DTH também está diminuída com o envelhecimento. No nosso caso, observamos uma reação de DTH nos animais velhos de dimensão razoável quando os desafiados com Ova e CFA. Como não temos um grupo de animais jovens desafiados em paralelo, é difícil afirmar que não houve nenhuma alteração na reação de DTH com o envelhecimento. Uma explicação plausível para a ocorrência dessa reação, no entanto, é o fato de que utilizamos animais híbridos B6D2F1 onde um dos parentais é o C57Bl/6. Essa última raça é geneticamente mais susceptível a reações de DTH já que os linfócitos T desses animais tendem a secretar altos níveis de IFN- γ (Krishnan, Guilbert, Russel & Wegmann, 1996; Milon, Giudice & Louis, 1995). A secreção de citocinas por células do baço desses animais confirmam esses dados e nos mostram, então, que os animais idosos quando desafiados com Ova e CFA produzem uma reação típica de DTH e secretam altos níveis de IFN- γ .

Como está descrito que animais senis tendem a apresentar um declínio na secreção de IL-2 e IL-3, com aumento paralelo na secreção de citocinas típicas de células efetoras tais como IL-4, IFN γ e IL-6, pode ser que os animais dessa raça, C57Bl/6 e seus híbridos apresentem a secreção de IFN- γ particularmente alta na velhice e, sejam capazes ainda de desempenhar bem atividades imunológicas nas quais esta citocina tem papel preponderante.

Os nossos resultados de proliferação celular *in vitro*, medida de hipersensibilidade e produção de citocinas por animais tratados ou não quando jovens também confirmaram nossa observação anterior de que o tratamento de animais jovens com ovalbumina no contexto inflamatório do adjuvante é capaz estabelecer uma memória duradoura do padrão de ativação do sistema imune desses animais.

A discussão sobre os mecanismos de manutenção da memória imunológica é uma das mais importantes e polêmicas na Imunologia. A ideia mais antiga sobre a geração da memória imunológica remonta à Teoria da Seleção Clonal (Burnet, 1959) e ao conceito originário dela de que os clones linfocitários específicos, uma vez estimulados, se expandiriam e dariam origem aos linfócitos ativos na resposta primária e a linfócitos quiescentes que conservariam a memória desta interação. A resposta primária a antígenos T dependentes envolve a proliferação de linfócitos T e B. Essas células se diferenciam em células efetoras, migram através do corpo e se localizam nos tecidos onde medeiam as suas ações efetoras. A maioria das células participando dessa reação primária é rapidamente eliminada. Como as resposta imunes a vários antígenos encontrados na vida jovem, antígenos virais por exemplo, geralmente levam a uma imunidade permanente, tem sido suposto por muitos anos que a memória desse encontro é preservada por células de vida longa que revertem ao estado de repouso. No entanto, na série de marcadores até hoje atribuídos às células de memória, a maioria pertence ao fenótipo de células ativadas. Para os linfócitos T, os principais marcadores de memória seriam: CD45R^{lo}, CD62L^{lo}, CD44^{hi}; para os linfócitos B, as células de memória seriam HSA^{lo}, CD44^{hi} e expressariam isotipos outros que IgM (Sprent, 1994). Recentemente, novos marcadores têm sido propostos diferencialmente para linfócitos T CD8⁺, tais como Ly6 e CD122^{hi} (Dutton, Swain & Bradley, 1999). Também recentemente foi proposto que a memória imunológica pode ser mantida por duas subpopulações de linfócitos T CD4⁺: uma expressando os marcadores de ativação e outra com fenótipo de células virgens. A primeira subpopulação seria composta

de células recentemente ativadas ($CD45R^{lo}$) que uma vez exposta ao antígeno continuamente continuaria com seu fenótipo de célula ativada e pronta a efetuar suas atividades (Bell, Sparshott & Bunce, 1998). Outra subpopulação seria composta de células quiescentes que reverteram seu fenótipo ($CD45^{hi}$). Como estas células foram ativadas anteriormente, elas sofreram proliferação e estão representadas em maior frequência no repertório de linfócitos T do animal. Para estes autores então, a memória imunológica poderia ser mantida por células T $CD4^{+}$ diferentes qualitativamente das células T em repouso e por outra subpopulação semelhante às células em repouso, mas diferente destas em número. A primeira subpopulação necessita a presença constante do antígeno para sua persistência, a segunda persiste por um tempo muito mais longo sem a presença do antígeno.

Outros autores propõem que células B de memória também podem persistir por longo tempo (seferian, Rodkey & Adler, 1987). Estas células de longa vida foram descritas, por exemplo, 20 meses depois do transplante de medula óssea de animais previamente imunizados para receptores singênicos.

No entanto, vários trabalhos na literatura mostram que, contrariamente a esta visão de memória imunológica composta por clones específicos de linfócitos T e B de longa vida, tanto a resposta imune primária como a manutenção da memória imunológica dependem de linfócitos emergentes do timo e da medula óssea. Segundo Freitas e colaboradores (Freitas et al, 1986) 90% de toda a população de células B em camundongos pode ser renovada em 4 dias. Experimentos com transferência de células de camundongos C56Bl/6 reativas a LPS para camundongos histocompatíveis C57Bl/10 sc.Cr não reativos a LPS mostram que as células B transferidas decaem rapidamente: 80-90% destas células morrem em 18-24 horas e 10-20% em 10-20 dias (Freitas, Rocha & Coutinho, 1986). A dinâmica de renovação dos linfócitos T parece variar mais e de acordo com as subpopulações, sendo que as células T $CD8^{+}$ podem persistir por períodos mais longos que as células $CD4^{+}$. Rocha e colaboradores (Rocha, Freitas & Coutinho, 1983) demonstraram que o timo contribui diariamente com 5×10^6 células T $CD4^{+}$ para o baço. Diferentemente das células B, as células T se dividem com frequência na periferia e animais timectomizados são capazes de manter aproximadamente 60% da população de células T apesar de não contarem mais com

o aporte de células jovens do timo. No entanto, o tratamento de camundongos com hidroxiuréia, uma droga citotóxica para células em ciclo, é capaz de eliminar 30-40% dos linfócitos T CD4+ do baço desses animais. Nos camundongos timectomizados, este efeito não ocorre sugerindo que as células eliminadas e ativadas no animal normal são recém-formadas no timo (aroeira, 1991)). Esses dados sugerem que mesmo entre os linfócitos T, as células emergentes, embora não sejam as únicas, são fundamentais na atividade fisiológica do animal. A persistência da memória imunológica, para esses pesquisadores, dependeria, então, não de clones específicos de longa vida, mas da persistência de circuitos de células interligadas por interações idiotípicas capazes de selecionar novas células linfoides emergentes.

Com relação a este debate, nossos resultados nos colocam duas questões importantes:

- 1) como a memória imunológica do primeiro encontro com a ovalbumina e o padrão de reatividade aí desencadeado pôde se manter por toda a vida dos camundongos?
- 2) Porque os camundongos idosos são incapazes de criar uma nova reatividade (e conseqüentemente, sua memória) à ovalbumina embora eles sejam capazes de manter a memória de uma reatividade anteriormente estabelecida?

Alguns autores, em acordo com a proposta de uma memória imunológica estabelecida sistemicamente pelas interações entre clones e pela seleção de repertórios, mostraram que a senescência é caracterizada por uma alteração radical na relação entre o nível de anticorpos reativos com proteínas externas versus o nível de auto-anticorpos. Ocorre, com a idade, uma diminuição da capacidade de produção de anticorpos reativos com antígenos novos. A vacinação com a toxina tetânica, com os vírus influenza e da encefalite é muito menos efetiva em indivíduos idosos (Makinodan & Kay, 1980). Paralelamente, ocorre o aumento dos níveis dos chamados anticorpos naturais reativos com autocomponentes (como anticorpos anti-DNA, anti-tireoglobulina, anti-idiotípicos) (Roberts-Thomson et al., 1968). Esse aumento nos níveis de auto-anticorpos, no entanto, não está relacionado a reações patológicas, mas aparentemente a um aumento concomitante da reatividade das imunoglobulinas consigo mesmas num processo de entrelaçamento progressivo do sistema imune (Goild, Michelis, Siskind & Weksler, 1981) (Weksler et al.,

1989). Aparentemente, esta mudança no repertório expresso de imunoglobulinas está associado à seleção de células B por linfócitos T ativados na periferia, indicando que o entrelaçamento envolve também a população de linfócitos T (Weksler et al., 1989). Este fechamento ou entrelaçamento do sistema imune do animal idoso estaria diretamente relacionado com o aumento, já descrito por outros (Miller, 1996) da atividade imunológica basal do sistema imune – na frequência de células T ativadas. Todas estas características do sistema imune do velho implicariam numa diminuição na sua plasticidade, na sua capacidade em incorporar novas reatividades e uma tendência a simplesmente manter, como memória imunológica, as interações já anteriormente estabelecidas.

Estudo comparativo da atividade fisiológica de linfócitos B e T em camundongos jovens e idosos

Para tentar responder as questões acima colocadas, nós decidimos estudar a atividade imunológica basal de camundongos jovens e idosos. Para isto, comparamos a produção total de imunoglobulinas séricas, ou seja, anticorpos não específicos no soro de camundongos jovens e idosos normais. Foi possível observar que os animais idosos produziram níveis mais altos de anticorpos totais quando comparado com os jovens. Na análise dos diversos isotipos, observamos que houve um aumento na produção de imunoglobulinas das classes IgG e IgA, mas não da classe IgM (**figura 12**). Como houve uma elevação na produção de anticorpos no soro dos animais idosos, a nossa próxima iniciativa foi pesquisar como estariam estas células produtoras de imunoglobulinas nos órgãos desses animais, e o que nós observamos foi um aumento das células produtoras de imunoglobulinas totais tanto no baço quanto na medula óssea. Diferentemente das imunoglobulinas séricas, observamos um aumento das células produtoras de imunoglobulinas das classes IgM, IgG e IgA (**Figuras 13A e 13B**).

A literatura referente às modificações na produção de anticorpos durante o envelhecimento geralmente se refere a uma mudança drástica no repertório, na classe e na origem das imunoglobulinas produzidas. A concentração de anticorpos totais, no entanto, é descrita como constante. Vários autores já mostraram que ocorre um aumento

da produção de autoanticorpos (incluindo anticorpos anti-idiotípicos com a idade) e que este aumento é paralelo a uma diminuição na produção de anticorpos reativos com antígenos externos. Interessantemente, essa mudança de repertório está associada à expansão de poucos clones de linfócitos B, a maioria pertencente à população de células B-1 ou CD5⁺. Essa população de linfócitos não deriva da medula óssea do animal adulto mas do fígado fetal. Após o nascimento, estas células colonizam a cavidade peritoneal e a mucosa intestinal onde se autorrenovam. Elas são responsáveis pela produção da maioria dos anticorpos naturais em camundongos e humanos (Stall et al, 1996). Como a maioria desses anticorpos naturais apresenta um grau alto de polireatividade e auto-reatividade associada, aparentemente a expansão preferencial dessa subpopulação de linfócitos B nos animais velhos pode explicar o aumento concomitante dos níveis de auto-anticorpos na sua circulação (Casali et al, 1988). Uma grande parte desses autoanticorpos reage com IgG autóloga e pode atuar em interações idiotípicas (Bovbjerg, 1991). Alguns autores também mostraram que, com a idade, ocorre uma tendência à produção de anticorpos de baixa afinidade preferencialmente da classe IgM (Goidl, 1976). Também este dado combina com a expansão preferencial das células B-1, já que estas produzem predominantemente IgM.

Nos nossos experimentos, observamos um aumento global na produção de imunoglobulinas séricas e no número das células produtoras de Ig, tanto no baço quanto na medula óssea. A literatura não é muito clara no assunto. Alguns autores relatam que o número total de células produtoras de imunoglobulinas se mantém ao longo da vida (Miller, 1996), outros que este número aumenta (Benner, 1981). No entanto, nossos dados são compatíveis com a ideia de que existe um aumento da atividade global do sistema imune na senescência. Não examinamos o repertório desses anticorpos, mas nossos resultados indicam que ocorre um acúmulo de imunoglobulinas das classes IgG e IgA em relação a IgM. Em geral, quando os autores comentam o aumento na produção de IgM com a idade, eles se referem à produção de anticorpos específicos frente a um desafio antigênico (LeMaoult et al., 1999; Makinodan & Kay, 1980; Miller, 1996). Esse padrão é coerente com o declínio da resposta humoral relacionado ao envelhecimento. Por outro lado, se ocorre uma diminuição na capacidade do animal velho em produzir novos anticorpos das classes IgG e IgA quando desafiado com um antígeno, é

perfeitamente compatível que dentre o pool dos anticorpos totais já presentes nesse animal, a maioria seja das classes IgG e IgA pois são estes os anticorpos produzidos durante os reencontros com antígenos (respostas secundárias). É plausível que eles estejam aumentados como reflexo dos inúmeros encontros e reencontros antigênicos vividos pelo sistema imune desses animais. Eles representariam, assim, a memória ou as cicatrizes imunológicas do seu passado de encontros antigênicos.

Por outro lado, nossos resultados mostram uma discrepância com relação ao número de células produtoras de anticorpos da classe IgM: enquanto que o nível de anticorpos IgM no soro está diminuído, o número de células produtoras desse isotipo está aumentado. Uma explicação que nos parece possível seria a presença de clones de células B expandidos nos animais velhos com menor capacidade de secreção. Segundo LeMaoult e colaboradores (LeMaoult et al., 1999), a diminuição da variabilidade do repertório de Igs dos animais velhos se deve a expansão de alguns poucos clones de linfócitos B. Dois tipos de clones B estão expandidos em camundongos senis: um tipo é composto por células B tipicamente $CD5^+CD45R^+B220^+$ com grande capacidade de secreção de imunoglobulinas e outro tipo composto por células $CD45R^-, B220^-$ com baixa capacidade de secreção de imunoglobulinas. A população do primeiro tipo é maior, mas o tamanho reduzido da segunda pode ser ainda responsável pela discrepância observada nos nossos resultados.

Como o número de células produtoras de imunoglobulinas, bem como a produção de anticorpos não específicos estavam aumentadas nos animais idosos, resolvemos também analisar a atividade proliferativa das células linfóides presentes nestes animais. Nós observamos que a capacidade proliferativa das células linfóides dos animais idosos foi mais alta frente ao estímulo com o mitógeno quando comparado com os jovens. Além disso, nós observamos que mesmo com o aumento do estímulo a atividade proliferativa destes animais foi a mesma, nos sugerindo que a maioria das células linfóides nos animais idosos já estão ativadas e, então, mesmo o aumento da concentração do mitógeno as células não é capaz de induzir um aumento na sua atividade proliferativa (**Figura 14**). Já os linfócitos T dos animais jovens apresentaram uma menor capacidade proliferativa quando comparado com os animais idosos, mesmo com o aumento da concentração do estímulo (**Figura 14**). Por isto mesmo, observamos

um aumento na resposta proliferativa paralelo ao aumento da concentração do mitógeno numa típica curva dose-resposta.

Nossos resultados confirmam novamente os dados da literatura de que ocorre um aumento do estado geral de ativação do sistema imune na senescência. Este aumento global está refletido numa elevação nos títulos de imunoglobulinas séricas, do número total de células produzindo anticorpos e também da atividade proliferativa dos linfócitos T quando comparados com os mesmos parâmetros do animal jovem. Essa hiperatividade imunológica provavelmente representa a memória de interações com antígenos internos e externos acumulados ao longo da vida do animal. Segundo o modelo explicativo proposto por nós na **figura 15**, o aumento dessas interações torna o sistema imune do velho menos flexível e, portanto, relativamente refratário à incorporação de novas reatividades à sua dinâmica de funcionamento. O sistema imune do jovem, ao contrário, reflete a precariedade das suas experiências prévias e, ao mesmo tempo, sua enorme plasticidade para mudanças, para novas interações. No caso dos animais normais desafiados somente quando idosos, a Ova representa uma novidade para o seu sistema imune, para qual ele é menos susceptível, justamente por seu sistema imune já se encontrar ativado e envolvido em outras interações das quais a Ova não faz parte. No entanto, os animais imunes e tolerantes, por terem interagido com a Ova quando jovens, são capazes de evocar uma reatividade a este antígeno. Nesses animais, a reatividade à Ova não representa a incorporação de uma novidade, mas apenas a reativação de interações já presentes, a recuperação da memória de circuitos que agora são parte da atividade normal do sistema imune do velho. Essa memória imunológica se refere não somente à quantidade de anticorpos e atividade proliferativa, mas também ao padrão da resposta que pode evocada. O padrão de uma reatividade adquirida na juventude aparentemente é mantido por circuitos de memória imunológica que podem ser recuperados na velhice. Interessantemente, mesmo estímulos fortes como outros adjuvantes são incapazes de modificar esse padrão indicando que a memória de ativações anteriores é fortemente entrelaçada em circuitos provavelmente muito estáveis.

Os mecanismos pelos quais esta memória é mantida ainda são desconhecidos e este é um tema para investigações futuras.

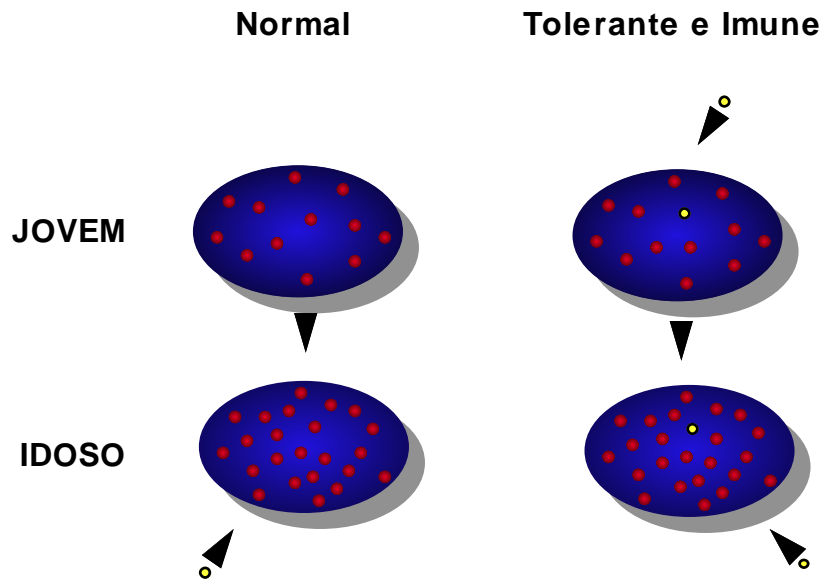


Figura 15 - Modelo proposto para explicar o aumento das interações do sistema imune do animal velho o que o torna menos flexível e relativamente refratário à incorporação de novas reatividades à sua dinâmica de funcionamento.

6. Conclusões

- A tolerância oral à Ova e a imunização induzidas no camundongo jovem estão mantida para a produção de anticorpos durante um ano e meio.

- o pré-tratamento dos camundongos quando jovens com Ova no contexto inflamatório desencadeado pelo adjuvante alumínio $\{Al(OH)_3\}$ produziu um padrão de anticorpos anti-Ova predominantemente do tipo IgG1 que persiste ao longo da vida do camundongo.

- camundongos normais imunizados com Ova com ou sem adjuvante apresentam uma produção de anticorpos muito baixa, inferior inclusive àquele desencadeado nos animais tolerantes.

- A tolerância oral também esta mantida para proliferação celular *in vitro* assim como para a reação de hipersensibilidade do tipo I.

- A medida das reações de hipersensibilidade, produção de citocinas e proliferação celular *in vitro* confirmam nossas observações iniciais de que o tratamento dos camundongos jovens com ovalbumina no contexto inflamatório do adjuvante foi capaz de desencadear um padrão permanente de ativação do sistema imune desses animais frente ao mesmo antígeno.

-Camundongos idosos normais apresentam um aumento na atividade imunológica global, podendo ser um resultado do encontro com diversos estímulos (externos e internos) ao longo da vida do camundongo.

7. Trabalhos publicados com parte dos resultados da presente dissertação:

Faria, A. M., Ficker, S. M., Speziali, E. Menezes, I.S., Stransky, B., Verdolin, B. A., Lahamann, W. M., Rodrigues, V. S., & Vaz, N. M. (1998a). Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, 31 (1), 35-48.

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

8. Perspectivas

Pretendemos dar sequencia a este estudo e investigar:

- os mecanismos envolvidos na manutenção da memória imunológica dos padrões de ativação;
- o papel dos diversos adjuvantes na manutenção dessa memória;
- a significância da manutenção desse padrão de ativação em situações patológicas.

9. Bibliografia

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pober, J. (1996). *Celular and Molecular Immunology*. (second ed.).

Abraham, C., Tal, Y., & Gershon, H. (1977). Reduced in vitro response to concanavalin A and lipopolysaccharide in senescent mice. *Eur. J. Immunology*, 7, 301-304.

Adkins, B., & Riley, R. L. (1998). Autoantibodies to T-lineage cells in aged mice. *Mech. of ageing and development*, 103, 147-164.

André, C., Heremans, J. F., Vaerman, J. P., & Cambiaso, C. L. (1975). A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen-antibody complexes. *J.Exp.Med.*, 142, 1509-1519.

Araneo, B. A., Woods II, M. L., & Daynes, R. A. (1993). Reversal of the immunosenescent phenotype by dehydroepiandrosterone: hormone treatment provides an adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Infect. Dis.*, 167, 830-840.

Aroeira, L. (1991). *Memória e tolerância imunológicas: propriedades do sistema.* , UFMG.

Aspinall, R. (1997). Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. *J. Immunology*, 158, 3037-3045.

Averill, L. E., & Wolf, N. S. (1985). The decline in murine splenic PHA and LPS responsiveness with age is primarily due to an intrinsic mechanism. *J. Immunology*, 134, 3859-3863.

Bangs, L. A., Sanz, I. E., & Teale, J. M. (1991). *ibid*, 146, 1996.

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, 19-29.

Barrat, F., Haegel, H., Louise, A., Naulleau, V. S., Boulouis, H. J., Neway, T., Ceredig, R., & Pilet, C. (1995). Quantitative and qualitative changes in CD44 and MEL-14 expression by T cells in C57BL/6 mice during aging. *Res. Immunology*, 146, 23-34.

Bell, E. B., Sparshott, S. M., & Bunce, C. (1998). CD4⁺ T cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen a unifying concep. *Immunol. Today*, 19, 60-64.

Besredka, A. (1909). De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphykaxie lactique. *Ann.Inst. Pasteur*, 33, 166-174.

Besredka, A. (1919). De la vaccination contre les états typhoides par la voie buccale. *Ann.Inst. Pasteur*, 33, 882-903.

Bomford, R. (1998). Will adjuvants be needed for vaccines of the future? *Dev. Biol. Stand.*, 92, 13-17.

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

Burnet, M. F. (1959). *The Clonal Selection Theory of Immunity*. (1st. edition ed.). Nashville/London: The Vanderbilt and Cambridge University Presses.

Challacombe, S. J., & Tomasi, T. B. (1980). Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J.Exp.Med.*, 152, 1459-1472.

Chase, M. (1946). Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agents. *Proc.Soc.Exp.Biol.&Med.*, 61, 257-262.

Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., & Kuchroo, V. K. (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, 376, 177-180.

Chen, Y., Kuchroo, V., Inobe, J., Hafler, D. A., & Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelites. *Science*, 265, 1237-1240.

Claassen, E., Leeuw, W., Greeve, P., Hendriksen, C., & Boersma, W. (1992). Freund's complete adjuvant: an affective but disagreeable formula. *Res. Immunol.*, 143, 478-483.

Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants- a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15, 248-256.

Daynes, R. A., Araneo, B. A., Dowell, T. D., Huang, K., & Dudley, D. (1990). regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J. Exp. Med.*, 171, 979-983.

Dighiero, G., Lim, A., Poncet, P., Daushik, A., Ge, X. R., & Maxié, J.-C. (1987). Age-related natural antibody specificities among hybridoma clones originating from NZB spleen. *Immunology*, 62, 341-347.

Dutton, R. W., Swain, S. L., & Bradley, L. M. (1999). The generation and maintenance of memory T and B cells. *Immunology Today*, 20(7), 291-293.

Engwerda, C. R., Fox, B. S., & Handwerger, B. S. (1996). Cytokine production by lymphocytes from young and aged Mice. *J. Immunology*, 156, 3621-3630.

Eren, R., Zharhary, D., Abel, L., & Globerson, A. (1988). Age-Related changes in the capacity of Bone Marrow cells to Differentiate in thymic organ cultures. *Cell Immunology*, 112, 449-455.

Ernst, D. N., Hobbs, M. V., L, G. A., Rehse, M. A., Bottomly, K., Hayakawa, K., Hardy, R. R., & Weigle, W. O. (1990). Differences in the expression profiles of CD45RB, Pgp-1 and 3G11 membrane antigens and in the patterns of lymphokine secretion by splenic CD4+ T cells from young and aged mice. *J.Immunol*, 145, 1295-1302.

Ernst, D. N., Weigle, W. O., Noonan, D. J., McQuitty, D. N., & Hoobs, M. V. (1993). The Age-Associated increase in INF-gama synthesis by Mouse CD8+ T cells correlates with shifts in the frequencies of cell subsets defined by membrane CD44, CD45RB, 3G11, and MEL-14 Expression. *J. Immunology*, 151, 575-587.

Faria, A. M. C., Ficker, S. M., Rodrigues, V. S., Lahman, W. M., & Vaz, N. M. (1995). Antigen feeding induces oral tolerance in young mice and changes the isotype of immune response in old mice. *Clin.Immunol.Immunopath.*, 76, S110.

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

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

Faria, A. M. C., Garcia, G., Rios, M. J. C., 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, 147-151.

Faria, A. M. C., & Weiner, H. L. (1999). Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv. Immunol.*, 73, 153-264.

Fishman-Lobell, J., Friedman, A., & Weiner, H. L. (1994). Different kinetic patterns of cytokine gene expression *in vivo* in orally tolerant mice. *Eur.J.Immunol.*, 24, 2720-2724.

Fló, J., & Massouh, E. (1997). Age-related changes of naive and memory CD4 rat lymphocyte subsets in mucosal and systemic lymphoid organs. *Developmental & Comparative Immunology*, 21, 443-453.

Franco, L., Benedetti, R., Ferek, G. A., & Massouch, E. F., J. (1998). Priming or tolerization of the B- and Th2- dependent immune response by the oral administration of Ova- DNP is determined by the antigen dosage. *Cell. Immunology*, 190, 1-11.

Freitas, A. A., Rocha, B., & Coutinho, A. A. (1986). Lymphocyte population Kinetics in the mouse. *Immunol.Rev.*, 91, 5-16.

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., Liew, F. Y., & Mowat, A. M. (1995b). CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. *Internat.Immunol.*, 7(3), 501-504.

Garside, P., Steel, M., Worthey, E. A., Kewin, P. J., Howie, S. E. M., Harrison, D. J., Bishop, D., & Mowat, A. M. (1996). Lymphocytes from orally tolerized mice display enhanced susceptibility to death by apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 149, 1971-1979.

Garside, P., Steel, M., Worthey, E. A., Satoskar, A., Alexander, J., Bluethmann, H., Liew, F. Y., & Mowat, A. M. (1995c). T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J.Immunol.*, 154, 5649-5655.

Glenny, A. T., Buttle, G. A. H., & Stevens, M. F. (1931). Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea pigs:Toxoid precipitated with alum. *J. Pathol. Bacteriol.*, 34, 267-275.

Goild, E. A., Michelis, M. A., Siskind, G. W., & Weksler, M. E. (1981). Effect of age on the induction of autoantibodies. *Cli. Exp. Immunol.*, 44, 24-31.

Goldman-Brezinski, S., Brezinski, K., Zhang, X. M., Gienapp, I., Cox, K., Heber-Katz, E., & Whitacre, C. (1998). Effects of oral tolerance induction by myelin basic protein on Vbeta8+ Lewis rat T-cells. *J. Neurosc.*, 51, 67-75.

Gonnella, P. A., Chen, Y., Inobe, J.-I., Komagata, Y., Quartulli, M., & Weiner, H. L. (1998). In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *J. Immunol.*, 160, 4708-4718.

Gottesmam, S. R. S., Kristie, J. A., & Walford, R. L. (1981). Proliferative and cytotoxic immune functions in ageing. I. Sequence of decline of reactivities measured under optimal and suboptimal sensitization conditions. *Immunology*, 44, 607.

Grosh, I., & Miller, R. A. (1995). Rapid Tyrosine phosphorylation of Grb2 and Shc in T cells exposed to anti-CD3, anti-CD4 and anti- CD45 stimuli: differncial effects of aging. *Mech. aging and Develop.*, 80, 171-187.

Grossmam, A., Ledbetter, J. A., & Rabinovitch, P. S. (1990). Aging-related deficeency in intracelular calcium response to anti-CD3 or concanavalin A in murine T cell subsets. *J.Gerontology*, 45, B81-86.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389, 737-742.

Gütgemann, I., Fahrner, A. M., Altman, J. D., Davis, M. M., & Chien, Y. (1998). Induction of rapid T-cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity*, 8, 667-673.

gyery, J. C., Galbiati, F., Smiroldo, S., & Adorini, L. (1999). selective development of T helper (Th)₂ cells induced by continuous administration of low dose soluble proteins to normal and beta (2) - microglobulin-deficient BALB/c mice. *J. Exp. Med.*, 183, 485-497.

Hanson, D. G., Vaz, N. M., Maia, L. C., Hornobrook, M. M., Lynch, J. M., & Roy, C. A. (1977). Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 55, 526-532.

Heppel, J. M. L., & Kilshaw, J. P. (1982). Immune responses of guinea pigs to dietary protein. I.Induction of tolerance by feeding with ovalbumin. *Internat.Arch. Allergy Appl.Immunol.*, 68, 54-59.

Higgins, P. J., & Weiner, H. L. (1988). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. *J.Immunol.*, 140, 440-445.

Hobbs, M. V., Weigle, W. O., & Ernst, D. N. (1994). Interleukin-10 production by splenic CD4⁺ cells and cell subsets from young and old mice. *Cell. Immunology*, 154, 264-272.

Hobbs, M. V., Weigle, W. O., Noonan, D. J., Torbett, B. E., McEvelly, R. J., Koch, R. J., Cardenas, G. J., & Ernst, D. N. (1993). Patterns of cytokine Gene

Expression by CD44+ T cells from Young and Old mice. *J. Immunology*, 150, 3602-3614.

Houten, V. N., & Blake, S. F. (1996). Direct Measurement of anergy antigen-specific T cells following oral tolerance induction. *J. Immunology*, 157, 1337-1341.

Jewell, S., Gienap, I. E., Cox, K. L., & Whitacre, C. C. (1998). Oral tolerance as therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis: Demonstration of T cell anergy. *Immunol. and Cell. Biology*, 76, 74-82.

Kay, R. A., & Ferguson, A. (1989). The immunological consequences of feeding cholera toxin. I. Feeding cholera toxin suppresses the induction of systemic delayed-type hypersensitivity but not humoral immunity. *Immunol.*, 66, 410-415.

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, 3610-3618.

Ke, Y., Pearce, K., Lake, J. P., Ziegler, H. K., & Kapp, J. A. (1997). gd T lymphocytes regulate the induction of oral tolerance. *J. Immunol.*, in press.

Khoury, S. J., Hancock, W. W., & Weiner, H. L. (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with down-regulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor b, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J. Exp. Med.*, 176, 1355-1364.

Konen, T. G., Smith, G. S., & Walford, R. L. (1973). Decline in mixed lymphocyte reactivity of cells from aged mice of a long-lived strain. *J. Immunol.*, 110, 1216.

Krishnan, L., Guilbert, L. J., Russel, A. S., & Wegmann, T. G. (1996). Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and

causes decreased antigen-specific INF-gamma responses and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.*, 156, 644-652.

Kuchroo, V. K., Byrne, M. C., Atsumi, Y., Greenfield, E., Connolly, J. B., Whitters, M. J., O'Hara, R. J., Collins, M., & Dorf, M. E. (1991). T-cell receptor alpha chain plays a critical role in antigen-specific suppressor cell function. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 88, 8700-8704.

Kurashima, C., & Utsuyama, M. (1997). Age-related changes of cytokine production by murine helper T cell subpopulations. *Pathobiology*, 65, 155-162.

Lahmann, W., 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, 813-821.

Leishman, J. A., Garside, P., & Mowat, A. M. (1998). Immunological consequences of intervention in established immune responses by feeding protein antigens. *Cell. Immunology*, 183, 137-148.

LeMaoult, J., Delassus, S., Dyal, R., Nikolic, Z. J., Kourilsky, P., & Weksler, M. E. (1997a). Clonal Expansions of B lymphocytes in old Mice. *J. Immunology*, 159, 3866-3874.

LeMaoult, J., Manavalan, J. S., Dyal, R., Szabo, P., Nikolic, Z. J., & Weksler, M. E. (1999). Cellular Basis of B cell Clonal populations in old Mice. *J. Immunology*, 162, 6384-6391.

LeMaoult, J., Szabo, P., & Weksler, M. E. (1997b). Effect of age on humoral Immunity, selection of the B-Cell repertoire and B-cell development. *Immunol. Reviews*, 160, 115-126.

Lerner, A., Yamada, T., & Miller, R. A. (1989). Pg-hi T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A. *Eurp. J. Immunol.*, 19, 977-982.

Li, S. P., Verma, S., & Miller, A. R. (1995). *Aging Immunol. Infect. Dis*, 6, 79.

Lider, O., Santos, L. M. B., Lee, C. S. Y., Higgins, P. W., & Weiner, H. L. (1989). Suppression of autoimmune encephalomyelites by oral administration of myelin basic protein. *J.Immunol.*, 142, 748-752.

Makinodan, T., & Kay, M. M. (1980). Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.*, 29, 287-330.

May, R. M. (1995). The rise and fall and rise of tuberculosis. *Nature Medicine*, 1(8), 752.

Melamed, D., Fishmann-Lobell, J., Uni, Z., Weiner, H. L., & Friedman, A. (1996). Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. *Int.Immunol.*, 8, 717-724.

Melamed, D., & Friedman, A. (1993a). Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur.J.Immunol.*, 23, 935-942.

Melamed, D., & Friedman, A. (1993b). Modification of the immune response by oral tolerance: antigen requirements and interaction with immunogenic stimuli. *Cell.Immunol.*, 146, 412-420.

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, 1974-1981.

Mengel, J., Cardillo, F., Aroeira, L. S., Williams, O., Albuquerque, D. A., & Vaz, N. M. (1995). Anti-gd blocks the induction and breaks the maintenance of orally-induced tolerance to ovalbumin. *Immunology Letters*, 48, 97-102.

Miller, A., al-Sabbagh, A., Santos, L., Das, M. P., & Weiner, H. L. (1993). Epitopes of myelin basic protein that trigger TGF- β release following oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope driven bystander suppression. *J. Immunol.*, 151, 7307-7315.

Miller, A., Lider, O., Roberts, A. B., Sporn, M. B., & Weiner, H. L. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vivo* and *in vitro* immune response by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89, 421-425.

Miller, C., & Kelsoe, G. (1995). , 155, 3377.

Miller, R. A. (1987). Calcium and the aging system. *Neurobiology of aging*, 8, 368-370.

Miller, R. A. (1996). The aging immune system: primer and prospectus. *Science*, 273, 70-79.

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 responses to ovalbumin. *J.Immunol.*, 123, 2344-2350.

Milon, G., Giudice, G. D., & Louis, J. A. (1995). Immunobiology of Experimental cutaneous Leishmaniasis. *Parasitology Today*, 11, 244-247.

Moog, F. (1981). The lining of the small intestine. *Scientific American*, 245, 116-125.

Moreau, M.-C., & Gaboriau-Routhiau, V. (1996). The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res.Immunol.*, 147, 49-59.

Mortimer, E. A. J. (1978). Immunization against infectious disease. *Science*, 200, 902-907.

Mowat, A. M. (1986). Depletion of suppressor T cells by 2'-deoxyguanosine abrogates tolerance in mice fed ovalbumin and permits the induction of intestinal delayed-type-hypersensitivity. *Immunology*, 58, 179-184.

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 response to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology*, 45, 105-113.

Mu, X. Y., & Thoman, M. L. (1999). The age-dependent cytokine production by murine CD8+ T cells as determined by four-color flow cytometry. *J. Gerontol. Biol. Sci Med Sci*, 54, 116-123.

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, 861-865.

Nicoletti, C., Borghesi-Nicoletti, C., Yang, X., & Schulze, D. H. (1991). *J. Cerny ibid.*

Patel, H. R., & Miller, R. A. (1992). Age-associated changes in phosphorylation in murine T lymphocyte. *Eur. J. Immunol*, 22, 253-260.

Paul, J. R., & Bunnell, W. W. (1932). The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. Med Sci*, 183-190.

Pawelec, G., & Solana, R. (1997). Immunosenescence. *Immunology today*, 18, 514-516.

Pilarski, L. M., Yacyszyn, B. R., Jensen, G. S., Pruski, E., & Palst, H. F. (1991). Beta 1 integrin (CD29) expression on human postnatal T cell subsets defined by selective CD45 isoform expression. *J. Immunol.*, 147, 830-837.

Richman, L. K., Chiller, J. M., Brown, W. R., Hanson, D. G., & Vaz, N. M. (1978). Enterically-induced immunological tolerance. I. Induction of suppressor T cells by intragastric administration of soluble proteins. *J.Immunol.*, 212, 2429-2435.

Riley, S. C. (1989). *J. Immunol.*, 143, 3798.

Rios, M. J. C., Pereira, M. A. C., Lopes, L. M., Faria, A. M. C., 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, 825-831.

Roberts-Thomson, I. C., Whittingham, S., Youngchaiyud, U., & Mackay, I. R. (1968). Aging, immune response and mortality. *Lancet*, II, 24-28.

Rocha, B., Freitas, A., & Coutinho, A. (1983). Population dynamics of T lymphocytes. Renewal rate and expansion in the peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.*, 31, 21158-21164.

Santos, L. M. B., al-Sabbagh, A., Londono, A., & Weiner, H. L. (1994). Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF- β -secreting T-cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell. Immunol.*, 157, 439-447.

Seferian, P. G., Rodkey, L. S., & Adler, F. L. (1987). Selective survival and expression of B-lymphocyte memory cells during long-term serial transplantation. *Cell. Immunol.*, 110, 226-232.

Senda, S., Cheng, E., & Kawanishi, H. (1988). Aging-associated changes in murine intestinal immunoglobulin A and M secretions. *Scand.J.Immunol.*, 27, 157-164.

Sercarz, E., & Krzych, U. (1991). The distinctive specificity of antigen-specific suppressor T-cells. *Immunology Today*, 12, 111-118.

Shi, H. N., Grusby, J. M., & Nagler- Anderson, C. (1999). Orally induced peripheral nonresponsiveness is maintained in the absence of functional Th1 or Th2 cells. *J. Immunology*, 162, 5143-5148.

Shi, J., & Miller, R. A. (1992). Tyrosine-Specific protein phosphorylation in response to anti-CD3 antibody is diminished in old mice. *J. Gerontology*, 47, 147-153.

Souvannavong, V., Lemaire, C., Andreau, K., Brown, S., & Adam, A. (1998). Age-associated modulation of apoptosis and activation in murine B lymphocytes. *Mech. of ageing and development*, 103, 285-299.

Sprent, J., & Tough, D. F. (1994). Lymphocyte life-span and memory. *Science*, 265, 1395-1400.

Staples, P. J., & Talal, N. (1969). Relative inability to induce tolerance in adult NZB and (NZB X NZW)F1 mice. *J.Exp.Med.*, 130, 123-130.

Strobel, S., & Ferguson, A. (1984). Immune response to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Ped.Res.*, 18, 588-593.

Strobel, S., & Ferguson, A. (1987). Persistence of oral tolerance in mice fed ovalbumin is different for humoral and cell-mediated immunity. *Immunology*, 60, 317-322.

Takeoka, Y., S-Y, C., Yago, H., Boyd, R. L., Suehiro, S., Shultz, L. D., Ansari, A. A., & Gershwin, M. E. (1996). The murine thymic microenvironment: changes with age. *Int. Arch. of Allergy and Immunology*, 111, 5-12.

Thomas, H. C., & Parrot, D. V. (1974). The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology*, 27, 631-639.

Timm, J., & Thoman, M. L. (1999). Maturation of CD4+ Lymphocytes in the Aged Microenvironment Results in a Memory-Enriched population. *J. Immunology*, 168, 711-716.

Titus, R. G., & Chiller, J. M. (1981). Orally-induced tolerance. Definition at the cellular level. *Internat.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 65, 323-338.

Vaz, N. M., & Faria, A. M. C. (1993). *Guia incompleto de imunobiologia. Imunologia como se o organismo importasse.* (1ª ed.). Belo Horizonte: COPMED.

Vaz, N. M., Faria, A. M. C., Verdolin, B. A., & Carvalho, C. R. (1997). Immaturity, Ageing and Oral Tolerance. *Scand.J.Immunol.*, 46, 225-229.

Vaz, N. M., Maia, L. C. S., Hanson, D. G., & Lynch, J. M. (1977). Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult mice by previous feeding with the specific antigen. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 60, 110-115.

Vogel, F. R. (1995). Immunologic adjuvants for modern vaccine formulations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 754, 153-160.

Warren, H. S., Vogel, F. R., & Chedid, L. A. (1986). Current status of immunological adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.*, 4, 369-388.

Weiner, H. L. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunology Today*, 19(7), 335-343.

Weksler, M. E., Russo, C., & Siskind, G. W. (1989). Peripheral T cells select the B-cell repertoire in old mice. *Immunol.Rev.*, 110, 173-185.

Wells, H. G. (1911). Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg. *J.Infect.Dis.*, 9, 147-156.

Whisler, R. L., Newhouse, Y. G., & Hackshaw, K. V. (1995). Differential expression of the alpha- and beta isoforms of protein Kinase C in peripheral blood T and B cells from elderly adults. *Mech. Aging and Develop.*, 77, 197-211.

Wu, S.-M., Nakashima, M., & Watanabe, T. (1998). Selective suppression of antigen-specific Th2 cells by continuous micro-dose oral tolerance. *Eur.J. Immunol.*, 28, 134-142.