

ANDREZZA FERNANDA SANTIAGO

***Papel dos eventos  
inflamatórios induzidos pela  
imunização na manutenção  
de tolerância oral***

Belo Horizonte  
2008

ANDREZZA FERNANDA SANTIAGO

***Papel dos eventos  
inflamatórios induzidos pela  
imunização na manutenção  
de tolerância oral***

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Dra. Cláudia R. Carvalho

Área de concentração: Imunologia

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de mestre.

Belo Horizonte  
2008

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

**Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço pela maneira sábia, generosa, gentil, paciente e principalmente pelo respeito ao ensinar e orientar. Minha eterna gratidão por abrir as portas e me dar a oportunidade de descobrir o fascínio da Ciência.**

**À Ana Maria Caetano de Faria**

**Obrigada pela compreensão pelos momentos em que não pude estar com vocês. Obrigada pela força nos momentos difíceis e principalmente por acreditarem em mim.**

**Às Lourdes, mãe e avó, irmãos Andréa, Décinho e Amanda e meu amado sobrinho João Felipe.**

**Obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando e me ajudando em todos os momentos. Obrigada por ser esta pessoa tão maravilhosa que nenhuma palavra consegue descrever e pelo amor. Agradeço ao namorado, amigo, companheiro e responsável por eu ter chegado até aqui.**

**Ao Rafael Abreu Fraga**

**Obrigada por ser esta pessoa tão iluminada, bem humorada e amiga. Agradeço pelos conselhos sábios, por me ensinar tudo que sei e por sempre fazer isto com alegria.**

**À Frankcinéia**

Agradeço a Deus que além da vida me deu fé e força em todos os momentos iluminando sempre o meu caminho.

À querida Claudinha pela co-orientação, pelas idéias e por me ajudar a ver e pensar em tudo por outro ângulo. Obrigada por tudo.

Ao professor Nelson por enriquecer meu aprendizado com sua sabedoria e questionamentos.

À querida Ildinha por ser uma grande “mãe”, cuidando sempre de tudo e se preocupando sempre com todos.

À Celise pelo auxílio, pela disposição e boa vontade em ajudar sempre.

Às amigas Elaine, Rafa e Dani pela grande amizade, por sempre estarem dispostas a me ouvir e pelo carinho.

Aos amigos André, Fabiano, Rafael, Tati, Samara, e Joana por sempre me ajudarem de alguma forma e pela amizade.

Aos amigos Bruna, Archimedes e Bernardo por estarem sempre prontos para ajudar. Muito obrigada pela força e principalmente pela paciência de trabalhar comigo.

Aos queridos amigos de Bases I Richard, Leody, Nataly, Taty, Érica, Paty, Luidy e Bruno pela amizade, força e bons momentos! Em especial Taty (pela ajuda no FACS) e Érica por me ajudar de várias formas neste projeto.

Às amigas Sil, Thaís, Ellen e Dadá, companheiras de Ouro Preto, que de uma forma ou de outra me incentivaram para estar aqui.

Aos queridos amigos de Mococa Rô, Dan, Késia, Dani, Lala, Bi, Vi, Márcia, André e Jef.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1 - Tolerância Oral.....	20
1.2 - Mecanismos Explicativos.....	22
1.3 - Imuno-senescência .....	27
1.4 - Imuno-senescência e Tolerância Oral .....	30
1.5 - Adjuvantes.....	32
1.6 - Adjuvantes e Tolerância Oral.....	36
<b>2 – OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
2.1 – Objetivo Geral .....	38
2.2 – Objetivos Específicos .....	38
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 - Animais .....	41
3.2 - Antígenos .....	41
3.3 – Adjuvantes.....	41
3.4 - Tratamento oral para indução de Tolerância Oral.....	41
3.5 - Protocolos Experimentais.....	42
3.6 – Obtenção do soro .....	44
3.7 - Ensaio Imunoenzimático para medida de anticorpos totais anti-OVA .....	44
3.8 - Ensaio Imunoenzimático para medida de IgG1 e IgG2a anti-OVA.....	45
3.9 - Ensaio Imunoenzimático para medida da concentração de citocinas .....	45
3.10 - Cultura de células.....	46

3.10.1 – Meio de cultura.....	46
3.10.2 – Preparação de suspensão celular .....	46
3.10.3 – Contagem de células viáveis.....	47
3.10.4 – Cultura de células e coleta do sobrenadante da cultura.....	47
3.10.5 - Análise fenotípica de células através de citometria de fluxo.....	47
3.12 – Soluções Utilizadas .....	50
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
4.1 - Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + CFA em tempos distintos após indução da tolerância oral. ....	53
4.2 - Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH) <sub>3</sub> em tempos distintos após a indução da tolerância oral. ....	59
4.3 - Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH) <sub>3</sub> 7 dias após indução da tolerância oral. ....	65
4.4 - Avaliação da persistência da tolerância oral em animais tolerantes re-imunizados com OVA + CFA.....	71
4.5 - Avaliação da manutenção da tolerância oral pela ação de células reguladoras .	73
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS .....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo I .....	42
Figura 2 - Protocolo II .....	42
Figura 3 - Protocolo III.....	43
Figura 4 - Protocolo IV - Os animais foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem e ingestão voluntária) ou salina (grupo controle imune).....	43
Figura 5 - Análise de leucócitos do baço por citometria de fluxo.....	49
Figura 6 - Produção de anticorpos séricos anti-OVA.....	55
Figura 7 - Produção de INF- $\gamma$ por células dos linfonodos inguinais e do baço.....	56
Figura 8 - Análise da produção de IL-4 por células dos linfonodos inguinais e do baço. .....	57
Figura 9 - Análise da produção de IL-10 por células dos linfonodos inguinais e do baço .....	58
Figura 10 - Produção de anticorpos séricos anti-OVA.....	61
Figura 11 - Produção de IL-4 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço. ....	62
Figura 12 - Produção de INF- $\gamma$ por células do baço.....	63
Figura 13 - Produção de IL-10 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço. ....	64
Figura 14 - Produção de anticorpos séricos anti-OVA.....	67
Figura 15 - Produção de IL-4 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço. ....	68
Figura 16 - Produção de INF- $\gamma$ por células do baço.....	69
Figura 17 - Produção de IL-10 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço. ....	70
Figura 18 - Produção de anticorpos séricos anti-OVA.....	72
Figura 19 – Percentual de células CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> dos linfonodos inguinais e baço.....	74
Figura 20 – Percentual de células CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> dos linfonodos mesentéricos e baço. ....	75

Figura 21 – Percentual de células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup> dos linfonodos mesentéricos e baço.....	76
Figura 22 – Percentual de células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup> dos linfonodos mesentéricos e baço.....	77

## LISTA DE ABREVIACOES

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrmetros
mL	mililitros
mg	miligramas
AL(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de Alumínio
APCs	Células apresentadora de antígeno
BCR	Receptor de células B
CD	Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFA	Adjuvante Completo de Freund
Con A	Concanavalina A
DCs	Célula dendrítica
DNA	Acido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
FITC	Isocianato de fluoresceína
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
LnM	Linfonodo Mesentrico
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NK	Células matadoras naturais ( <i>natural killer</i> )
nm	Nanmetros
°C	Grau centígrado
OPD	Ortofenileno-diamino
PBS	Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
RPM	Rotações por minuto

TGF	Fator de transformação e crescimento
TCR	Receptor de células T
Th	Linfócito auxiliar ( <i>T helper</i> )
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T reguladoras específicas

## RESUMO

A tolerância oral é um fenômeno complexo definido pela supressão da resposta imune após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral. Vários fatores interferem na indução da tolerância oral, alguns relacionados ao antígeno, outros ao animal. Dois dos fatores mais importantes são a forma de administração de oral do antígeno e a idade do animal. Animais neonatos não são susceptíveis à indução de tolerância oral enquanto animais com 8 semanas de idade susceptíveis à tolerância oral se tornam menos susceptíveis com 24 semanas e totalmente refratários com 70 semanas. Alguns trabalhos sugerem que o envelhecimento não interfere na indução da tolerância oral, mas sim na sua manutenção. Segundo alguns autores, a tolerância oral é mantida por um prazo curto de vinte dias a 3 meses. Um estudo prévio do nosso laboratório mostrou que é possível manter o estado de tolerância oral por um período de um ano e meio após o tratamento oral. Essa controvérsia sobre a manutenção da tolerância oral pode ser explicada pelos diferentes protocolos experimentais utilizados. A grande diferença entre os protocolos é a questão da imunização com antígeno + adjuvante, necessária para avaliar a indução ou manutenção da tolerância oral. Assim, nosso objetivo foi estudar se os eventos inflamatórios induzidos pela imunização têm um papel importante para sua indução e manutenção. Camundongos BALB/c fêmea com idade de 8-12 semanas foram tratados com 20mg de OVA por gavagem (administração intragástrica) ou por ingestão voluntária e imunizados i.p. com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> ou alternativamente s.c. com OVA+CFA. A imunização primária (OVA+CFA ou OVA+Al(OH)<sub>3</sub>) variou de 7 a 180 dias após tratamento enquanto que o desafio com OVA variou de 14 a 360 dias após imunização primária com OVA+Al(OH)<sub>3</sub>. De acordo com nossos resultados, animais imunizados até 30 dias após o tratamento oral por gavagem ou ingestão voluntária, independente do tipo de adjuvante utilizado, mantiveram-se tolerantes. No entanto, animais imunizados com OVA+CFA 90 dias após o tratamento oral já não estavam mais tolerantes, enquanto aqueles imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> estavam, o que sugere que o tipo de adjuvante utilizado na imunização interfere no tempo de manutenção da tolerância oral. Além disto, observamos que os animais imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> 180 dias após o

tratamento oral por gavagem se tornaram reativos enquanto que aqueles tratados oralmente por ingestão voluntária se mantiveram tolerantes. Esse resultado sugere que o tipo de regime utilizado no tratamento oral também interfere no tempo de manutenção da tolerância oral. Por outro lado, animais imunizados logo após o tratamento oral (7 dias), seja por gavagem ou ingestão voluntária, mantêm a tolerância oral por até 1 ano após o tratamento oral. Esse dado indica que a imunização logo após o tratamento oral seria um reforço para a manutenção da tolerância oral. De um modo geral, podemos concluir que a imunização com antígeno+adjuvante é importante para a manutenção da tolerância e que o tipo de adjuvante utilizado, o intervalo entre tratamento oral e imunização primária, assim como o tipo de regime utilizado no tratamento oral (gavagem ou ingestão voluntária) interferem na manutenção da tolerância oral.

## ABSTRACT

Oral tolerance is a complex phenomenon defined as a state of systemic hyporesponsiveness to an antigen that has been previously administered by the oral route. Many factors affect oral tolerance induction, some of them related to antigen, some related to the animal. Feeding regimen as well as the age of the animal are two of the most important factors that affect oral tolerance induction. Neonatal mice are not susceptible to oral tolerance while 8-week-old mice are fully susceptible. Mice become less susceptible with 24 weeks of age and totally refractory with 70 weeks of age. Some reports suggest that aging does not affect oral tolerance induction but its maintenance. According to some authors, oral tolerance is kept for a short period of 21 days to 3 months. Previous studies by our laboratory showed that oral tolerance can be maintained for a period of one and a half year after oral treatment. These contradictory reports can be explained by different experimental protocols that were used. The main difference in those protocols is related to immunization with antigen + adjuvant that is essential to reveal oral tolerance induction or maintenance. Thus, our goal was to study the role of inflammatory events triggered by immunization in the oral tolerance induction and maintenance. BALB/c mice at age of 8-12 weeks were treated orally with 20mg of OVA, either by gavage or continuous feeding and immunized with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> i.p or alternatively with OVA+CFA s.c. Primary immunization varied from 7 to 180 days after oral treatment in mice immunized with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> or OVA+CFA and booster with OVA varied from 14-360 days after primary immunization (with OVA+Al(OH)<sub>3</sub>). According to our results, animals immunized up to 30 days after oral treatment either by gavage or continuous feeding, independent of the kind of adjuvant used, were able to sustain oral tolerance. However, mice immunized 90 days after oral treatment with OVA+CFA did not maintain the tolerance status, while those immunized with Al(OH)<sub>3</sub> did. This result suggests that the type of adjuvant used affects oral tolerance maintenance. On the other hand, mice immunized 180 days with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> after oral treatment by gavage become responsive to antigen while those treated by continuous feeding kept tolerant. Our data indicate that the feeding regimen is also able to affect oral tolerance maintenance. Moreover, mice immunized 7 days after

oral treatment either by gavage or continuous feeding are able to keep oral tolerance up to one year after oral treatment. This result suggests that immunization with antigen + adjuvant can work strengthening oral tolerance maintenance. We can conclude that immunization with antigen + adjuvant is important for oral tolerance maintenance and that the type of adjuvant used, the interval between oral treatment and primary immunization, as well as the regimen feeding (gavage or continuous feeding) all affect oral tolerance maintenance.

## **1 - INTRODUÇÃO**

## **1.1 - Tolerância Oral**

A mucosa intestinal é considerada um dos maiores sítios de exposição antigênica do corpo humano. Isso se deve a grande quantidade de proteínas da alimentação que chegam ao intestino diariamente e ao o número de bactérias que colonizam o intestino grosso em humanos, podendo chegar a  $10^{12}$  microorganismos/g de fezes. Essa exposição antigênica na mucosa intestinal é importante para a maturação do sistema imune (Menezes e cols., 2003).

Quando um antígeno protéico é ingerido o mesmo é tratado por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado, mas alguns antígenos escapam dessa digestão ou são parcialmente degradados e podem ser absorvidos intactos (Wakabayashi e cols., 2006). A administração oral de antígeno pode levar a conseqüências como a) resposta local, não-inflamatória de IgA secretória, na mucosa; b) resposta sistêmica com geração de imunoglobulinas séricas e imunidade mediada por célula; c)um estado de tolerância imunológica sistêmica e/ou local denominado Tolerância Oral (Faria e Weiner, 2005).

A tolerância oral tem sido classicamente definida como um estado de hiporesponsividade da reatividade humoral e/ou celular após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral. (Vaz, Maia, Hanson & Lynch, 1977). A tolerância oral também interfere na reatividade a outros antígenos não relacionados. Segundo estudos de nosso grupo, a injeção parenteral do antígeno tolerado no animal tolerante é capaz de inibir a iniciação concomitante de vários fenômenos imunológicos diferentes como, por exemplo, resposta de anticorpos a antígenos não relacionados. Este fenômeno foi denominado como “efeitos indiretos da tolerância oral” (Carvalho e cols., 1994, Carvalho & Vaz, 1996).

Devido a sua insuperável capacidade de capturar e apresentar antígenos, as células dendríticas (DCs) estão intimamente envolvidas na iniciação de ambas respostas imunogênica e tolerogênica (Steinman e Nussenzweig, 2002). Aparentemente a mucosa intestinal favorece a diferenciação ou acúmulo de DCs tolerogênicas . Isto porque o sistema imune de mucosa possui um “ambiente imunológico” único que é baseado em duas citocinas envolvidas na indução de tolerância oral – IL-10 e TGF- $\beta$  – e este “ambiente imunológico” atua, em parte, via DCs para induzir diferentes tipos de células reguladoras. No entanto, existem vários questionamentos sobre o mecanismo pelo qual o ambiente de mucosa intestinal condiciona essas DCs (Weiner, 2001). Em adição,

várias subpopulações de DCs com propriedades reguladoras (DCs CD103<sup>+</sup>) foram descritas com a capacidade de induzir secreção de IL-10 (uma citocina antiinflamatória) por células T ou induzir tolerância oral em condições fisiológicas. Essas DCs CD103<sup>+</sup> são capazes de produzir ou ativar TGF- $\beta$  e sintetizar ácido retinóico, ambos essenciais para geração de Tregs Foxp3<sup>+</sup> (Coombes, e cols., 2007, Sun cols., 2007).

Como os linfonodos mesentéricos (LnM) drenam o intestino delgado, é concebível que esses linfonodos em particular tenham um papel importante na indução da tolerância oral. Recentemente foi reportada, em camundongos, a necessidade de migração, dependente de CCR7, de DCs da lâmina própria para os LnM para indução de tolerância oral, além disso, a excisão dos LnM aboliu parcialmente a indução de tolerância oral nestes animais, embora estudos de Spahn e cols. tenham mostrado que a tolerância oral pode ser induzida na ausência deste órgão (Worbs e cols., 2006, Spahn e cols., 2001). Outros órgãos linfóides considerados importantes para a indução da tolerância oral são as placas de Peyer, onde, células T secretoras de IL-10 e TGF- $\beta$  são induzidas (Fujihashi e cols., 2001, Tsuji e cols., 2003). Entretanto estudos demonstraram que a tolerância oral pode ser induzida em camundongos na ausência de placas de Peyer's (Spahn e cols., 2001).

Uma vez que a tolerância oral tenha sido induzida, vários aspectos da resposta imune antígeno específica Th1 e Th2 são suprimidos como: produção de imunoglobulinas de várias classes como IgE, IgM, e Ig de diferentes isotipos (Vaz e cols., 1977; Ngan & Kind, 1978; Afuwape, Turner & Stroble, 2004); reação de hipersensibilidade tardia – DTH (Mowat, Strobel, Drummond & Ferguson, 1982) e produção de várias citocinas (Weiner e cols., 1994; Afuwape, Turner & Strobel, 2004).

Sendo assim, a tolerância oral parece ser um fenômeno complexo envolvendo vários mecanismos moleculares.

## 1.2 - Mecanismos Explicativos

Três mecanismos principais foram descritos para explicar o fenômeno da tolerância oral: anergia, deleção clonal e regulação ativa (células T reguladoras). Recentemente a lista de mecanismos foi expandida pela demonstração de que células T tolerizadas oralmente têm defeitos na atividade locomotora, a qual restringe sua habilidade de atravessar o endotélio vascular ou na sua interação com DCs e células B *in vivo* (Strobel e Mowat, 2006). Também já foi proposto que um dos fatores que determinam qual mecanismo de tolerância periférica será desenvolvido é dependente da dose de antígeno utilizada. Segundo Weiner e cols., dose única e alta de antígeno leva à anergia ou à deleção de células T, enquanto que múltiplas doses baixas de antígeno estão associadas à geração de células T reguladoras (Weiner e cols., 1994). Essa divisão entre dose e mecanismos, no entanto, é contestada por vários trabalhos mostrando mecanismos reguladores em animais tolerizados por via oral a doses altas de antígenos. Um exemplo é o trabalho de Carvalho & Vaz onde células de animais tolerantes tratados com alta dose de antígeno inibem resposta a antígeno não relacionado, mostrando assim que estas células não foram deletadas ou se tornaram anérgicas (Carvalho & Vaz, 1996).

Além disto, algumas evidências têm sido mostradas de que os mecanismos envolvidos na indução de tolerância oral não são mutuamente excludentes e podem se sobrepor. Entre alguns dados que podem ligar esses mecanismos aparentemente distintos está a secreção de TGF- $\beta$ , uma citocina reguladora, que pode ser induzida pelo tratamento de células T com anticorpo anti-CTLA-4, embora esta molécula tenha sido primeiramente descrita como envolvida na indução de anergia *in vivo*. Além disso, alguns estudos recentes sobre propriedades de células reguladoras as descrevem como anérgicas e os eventos de deleção que ocorrem na mucosa intestinal parecem criar condições para a secreção local de TGF- $\beta$ . Tanto as células T em processo de morte como os macrófagos que ingerem restos de células apoptóticas secretam TGF- $\beta$ . Assim, anergia ou deleção e regulação ativa talvez sejam diferentes aspectos do mesmo processo tolerogênico que é estimulado pelo contato antigênico no intestino (Faria e Weiner, 2006).

Inicialmente, a atividade reguladora de células T CD4<sup>+</sup> era ligada à produção de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, associada à supressão da produção de citocinas Th1, como IL-2 e INF- $\gamma$ . No entanto, vários estudos mostraram que a supressão mediada pela tolerância oral também é efetiva em respostas mediadas por células Th2, ou seja, tanto respostas Th1 como Th2 podem ser suprimidas na tolerância oral (Melamed e cols., 1996, Faria e Weiner, 2006). Segundo Rizzo e cols., IL-10 e IL-4 são essenciais para a indução da tolerância oral e ocorre um sinergismo na ação das duas citocinas durante o processo tolerogênico. Nesse processo, cada citocina atua em um estágio diferente, a IL-4 atua no estágio indutor, estimulando o crescimento das células reguladoras induzidas durante a tolerância, enquanto a IL-10 atua no estágio efetor, suprimindo os efeitos inflamatórios (Rizzo e cols., 1999). No entanto, o papel da IL-4 na tolerância oral é questionado uma vez que mesma pode ser induzida, tanto a altas como a baixas doses de antígeno, em camundongos deficientes de IL-4 ou tratados com anticorpos anti-IL-4 (Faria e Weiner, 2006). A participação de IL-10 na supressão induzida pela tolerância oral também é polêmica. Aroeira e cols. mostraram claramente que a ausência de IL-10, induzida pelo tratamento *in vivo* de camundongos com anticorpos anti-IL-10 durante o tratamento oral, não interfere na indução de tolerância oral (Aroeira e cols., 1995). Atualmente o papel das células T reguladoras na tolerância oral e seu mecanismo de ação tem sido foco de grande atenção.

As células T CD4<sup>+</sup> reguladoras de ocorrência natural (nTregs) são geradas no timo, constituem aproximadamente 10% das células T CD4<sup>+</sup> em indivíduos normais e expressam caracteristicamente CD25, o receptor  $\alpha$  da interleucina 2 (IL-2), e Foxp3 (fator de transcrição *forkhead box p3*) o qual é crucial para sua função reguladora, além de outros marcadores como CTLA-4 e GITR (*glucocorticoid inducible tumor necrosis factor receptor family molecule*) (Sakaguchi e Powrie, 2007). Essas células são anérgicas e, portanto, não proliferam bem e não secretam IL-2. Seu mecanismo de ação envolve o contato celular mais que a secreção de citocinas embora elas sejam dependentes, para sua sobrevivência e expansão, da IL-2 produzida por outros linfócitos T (Sakaguchi, 2004). Essa dependência de IL-2 exógena parece não ser somente um requisito importante para sua manutenção e funcionamento, mas também para o controle da frequência dessas células no corpo. Recentemente, Almeida e colaboradores descreveram que a expressão do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) por essas células confere a estas uma vantagem na utilização da IL-2 secretada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados durante uma resposta imune clássica. Assim, se as células T

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Tregs) regulam a atividade de linfócitos ativados, esses últimos são capazes de regular o “pool” de células Tregs pela secreção de IL-2. Desta maneira, o equilíbrio das subpopulações de linfócitos T pode ser mantido independentemente do número absoluto desses linfócitos (Almeida e cols., 2006).

Outros mecanismos são atribuídos à atividade das Tregs além de inibição contato-dependente da ativação e proliferação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T, tais como destruição de APCs, células T ou ambas, e supressão via secreção de citocinas como IL-10 e TGF-β (Vieira e cols., 2004; Sakaguchi e Powrie, 2007). Utilizando microscopia intravital de dois fótons, Tadokoro e cols. mostraram que o contato entre células T e DCs carregadas com antígeno tem duração mais curta na presença de Tregs do que em sua ausência (Tadokoro e cols., 2006).

Em adição às nTregs, em torno de 10-15% de células T virgem CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> são convertidas em Tregs funcionais, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, na periferia, durante proliferação homeostática (Curotto de Lafaille, 2004). Estudos recentes indicam que o intestino é um local importante de desenvolvimento de Tregs Foxp3<sup>+</sup> e que DCs intestinais especializadas promovem a expressão de Foxp3 através de um mecanismo que é dependente de TGF-β local e ácido retinóico, um metabólito da vitamina A (Mucida e cols., 2007; Coombes e cols., 2007; Sun e cols., 2007). O desenvolvimento periférico de Tregs Foxp3<sup>+</sup> pode representar um mecanismo de ajuda para aumentar o repertório de Tregs em locais anatomicamente especializados, como a mucosa intestinal, por exemplo.

Estudos recentes têm também mostrado uma reciprocidade entre o desenvolvimento de Tregs Foxp3<sup>+</sup> e células T efectoras, onde células T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em Tregs Foxp3<sup>+</sup> na presença de TGF-β ou em células Th17 as quais secretam IL-17, uma citocina pro - inflamatória potente, na presença de TGF-β e IL-6. Assim, TGF-β tem um efeito paradoxal de induzir distintas subpopulações de células T que parecem ter efeitos opostos na resposta imune (Bettelli e cols., 2006, Veldhoen e Stockinger, 2006).

Várias subpopulações de linfócitos T com fenótipo regulador já foram descritos como importantes na indução de imunossupressão via mucosa oral, tais como: Th3, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Faria e Weiner, 2005). Algumas subpopulações de células reguladoras como, por exemplo, Th3 e Tr1 podem ser induzidas pela administração oral ou nasal de antígenos. Essas células exercem seu papel supressivo pela secreção de citocinas antiinflamatórias como TGF-β e IL-10, respectivamente (Faria e Weiner,

2006). Várias evidências mostram que tanto IL-10 como TGF- $\beta$  têm importante papel na regulação de respostas inflamatórias contra bactérias no intestino grosso e os níveis de ambas as citocinas e de células T que as produzem estão aumentadas no GALT depois da indução de tolerância oral em camundongos (Chung e cols., 2005). TGF- $\beta$  é produzida tanto por células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> do GALT. Além disso, essa citocina é considerada o fator inicial na indução da troca de isotipo para IgA na mucosa intestinal (Weiner, 1994).

Utilizando modelo experimental de asma, Mucida e cols. mostraram que camundongos deficientes em Tregs de ocorrência natural (nTregs) são altamente suscetíveis à indução de tolerância oral. A exposição oral ao antígeno nesses animais leva à geração de Tregs periféricas antígeno-específicas que expressam Foxp3 e CTLA-4. Esse trabalho mostra que a indução da tolerância oral não requer nTregs derivadas do timo já que Tregs com características similares são induzidas pela administração oral de antígeno. Entretanto a tolerância é reduzida quando TGF- $\beta$  é bloqueado. Esse trabalho é consistente com a idéia de que a administração oral de antígeno induz Tregs antígeno-específicas num processo que requer TGF- $\beta$  para indução de Foxp3 e, portanto, de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> periféricas (Mucida e cols., 2005).

Vários estudos mostraram que existe uma expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nas placas de Peyer, LnM e tecidos periféricos linfóides de camundongos tratados oralmente com antígenos (Chung e cols., 2005). Essas células apresentam atividade reguladora *in vitro* e *in vivo* e expressam Foxp3 assim como outros marcadores associados às Tregs incluindo CTLA-4 e GITR. A função supressora de Tregs oralmente induzidas parece ser, pelo menos parcialmente, dependente de TGF- $\beta$ , com um pequeno papel para IL-10. Isto condiz com evidências de que Tregs que produzem TGF- $\beta$  ou expressam essa molécula em sua superfície são responsáveis pela prevenção de várias formas de doenças inflamatórias do intestino como, por exemplo, colite (Strobel e Mowat, 2006).

O papel das células T CD8<sup>+</sup> na tolerância oral tem sido objeto de discussões desde sua primeira descrição cerca de vinte anos atrás. Trabalhos clássicos sugeriam que as células T CD8<sup>+</sup> eram células supressoras envolvidas na indução da tolerância oral (Richman e cols., 1978, Miller e Hanson, 1979). Apesar de vários estudos mostrarem evidências de que essa subpopulação de células T possa ter um papel importante na tolerância oral, alguns aspectos da sua participação não são muito claros. Como tais células poderiam reconhecer antígenos exógenos oralmente administrados e como sua atividade supressiva é mediada são alguns destes aspectos incertos. Uma possibilidade

seria que pelo menos algumas dessas células TCD8<sup>+</sup> possam pertencer à subpopulação de células T que expressam TCR  $\gamma\delta$  (Faria e Weiner, 2006).

O envolvimento de linfócitos T $\gamma\delta$  na indução e manutenção da tolerância oral foi demonstrado por estudos de Mengel e cols. onde o tratamento de camundongos com anticorpos monoclonais anti-TCR $\gamma\delta$  bloqueou a indução da tolerância oral *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o tratamento de animais já tolerantes com o mesmo anticorpo reverteu o fenômeno da tolerância (Mengel e cols., 1995). Esses dados foram confirmados por Ke e colaboradores que, utilizando camundongos geneticamente deficientes para a cadeia  $\delta$  do TCR, mostraram que nesses animais não foi possível induzir tolerância oral (Ke e cols., 1997).

### **1.3 - Imuno-senescência**

Vários fatores influenciam a indução da tolerância oral. Alguns desses fatores estão relacionados ao antígeno, como dose e natureza, forma de administração bem como a frequência e o intervalo entre as administrações (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996, Faria e cols., 2002). Outros fatores estão relacionados ao animal como microbiota intestinal, fundo genético, estado imunológico e idade do animal no primeiro contato com o antígeno (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996, Vaz e cols., 1987, Chechade e Mayer., 2005, Lahmann e cols., 1992, Faria e cols., 1993).

A imuno-senescência é bem descrita em humanos e em várias espécies animais sendo caracterizada por alterações funcionais no sistema imune. Tais modificações podem ser encontradas tanto em órgãos linfóides quanto nos componentes celulares do sistema imune (Takeoka e cols., 1996).

A imuno-senescência tem sido extensivamente estudada em compartimentos sistêmicos e embora a disfunção do sistema imune ocorra em ambas células, T e B, as células T têm se mostrado mais susceptíveis aos efeitos do envelhecimento (Taub e Longo., 2005, Listi e cols., 2006). Essa maior susceptibilidade faz sentido uma vez que as células T são produzidas no timo. A involução tímica e a redução na produção de timócitos são indiscutivelmente as mudanças mais evidentes na imuno-senescência. Acreditava-se que a perda de timócitos e massa tímica estavam diretamente relacionadas ao declínio da função imune mediada por células T, assim como à resistência reduzida a infecções e à incidência aumentada de câncer e doenças autoimunes no idoso. Entretanto, estudos mais recentes mostraram que, apesar da atrofia significativa, o timo idoso ainda tem capacidade de promover diferenciação de células T e produzir “de novo” células T virgens, embora com atividade significativamente reduzida (Taub e Longo, 2005). O número total de células T e a razão de células T CD4/CD8 estão relativamente preservados durante o envelhecimento. No entanto, há uma redução considerável na resposta imune mediada por essas células (Linton & Dorshkind, 2004).

Na senescência, células T CD4 virgens secretam menos IL-2 levando a uma diminuição na expressão de CD25 (IL-2R) e mostram uma proliferação reduzida e diferenciação incompleta para células T efetoras Th1 ou Th2 (Linton & Dorshkind,

2004). Além disto, células T CD4<sup>+</sup> de memória derivadas de células T virgens de animais idosos proliferam e produzem citocinas pobremente (Haynes e cols., 2003).

Com relação à produção de citocinas, os padrões secretados por células T ativadas mudam na senescência. Há uma redução na produção de citocinas precoces como IL-2, IL-3, e GM-CSF e um aumento na produção de citocinas efetoras como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Segundo diferentes relatos, a produção de INF- $\gamma$  pode estar inalterada, diminuída ou aumentada (Faria e cols., 1998 b, Kang e cols., 2004).

A redução substancial na frequência de linfócitos T virgens com um concomitante aumento de linfócitos T de memória pode ser uma das razões pela qual a imunidade mediada por células está prejudicada no idoso. Essa diferença nas proporções entre as populações de linfócitos T parece ser uma consequência da proliferação homeostática compensatória em resposta ao número reduzido de linfócitos T virgens assim como à influência da exposição crônica a antígenos. O efeito dessa redução de células T virgens no conjunto de células periféricas é acompanhado de uma contração do repertório de células T o que levaria a uma baixa capacidade de reagir a novos antígenos. Uma outra possível razão para essa baixa reatividade seria a ativação alterada das células T de memória que se acumulam no envelhecimento (Linton & Dorshkind, 2004). Algumas evidências indicam que a frequência aumentada de doenças autoimunes na senescência pode estar relacionada a uma transdução de sinais alterada de células T e B. Em células T um dos eventos iniciais na ativação, a liberação de cálcio, está reduzida tanto em humanos como em camundongos idosos. Em células B, ocorrem alterações substanciais no mecanismo celular de transmissão de sinais do receptor de células B (BCR) e de outros receptores (Hasler e Zouali, 2005).

Concomitantemente com a produção tímica reduzida de células T efetoras, é concebível que também haja uma redução na produção de células T reguladoras (Tregs) na imuno-senescência. Sendo assim, caminhos alternativos, tais como a geração periférica de Tregs, podem compensar esse déficit de forma a manter a tolerância e prevenir o aparecimento de doenças autoimunes. Apesar de alguns estudos mostrarem que a função supressora das Tregs está reduzida em quase 90%, após 50 anos de idade em humanos, outros estudos não confirmam esse resultado mostrando que a função supressora das Tregs no idoso está tão preservada quanto no jovem (Dejaco e cols., 2006).

Outra alteração comum de células T na imuno-senescência é a expansão oligoclonal de células T CD8<sup>+</sup>, quando um único clone que possui um único TCR ocupa

uma proporção significativa do total no conjunto de células T CD8<sup>+</sup>. Embora também possa ocorrer expansão oligoclonal de células T CD4<sup>+</sup>, a expansão de células T CD8<sup>+</sup> é mais proeminente (Clambey, Kappler, Marrack, 2007). Ainda é questionado se Tregs mantêm seu repertório policlonal no envelhecimento. Um estímulo antigênico recorrente poderia reduzir também a diversidade dessas células (Dejaco e cols., 2006)

A imuno-senescência afeta tanto a resposta imune adaptativa quanto a inata. A ativação de macrófagos, migração de células dendríticas, função de células dendríticas foliculares, ativação mediada por receptores Toll assim como a apresentação de antígenos mostraram-se enfraquecidos ou descontrolados em algum grau (Nikolich-Zugich, 2005). A capacidade fagocítica, síntese de intermediários reativos de oxigênio e a eficiência de destruição intracelular por neutrófilos também se encontram comprometidas no envelhecimento. Um aumento no número de células NK e NKT foi observado em humanos e camundongos idosos, embora a citotoxicidade e a produção de citocinas e quimiocinas por essas células estejam reduzidas. Também foi observado um aumento no número de monócitos/macrófagos, mas somente em camundongos (Gomez e cols., 2005). Assim, existem diferenças tanto na função quanto no número de vários tipos celulares que poderiam ter um efeito global na imunidade inata.

A função de células B é alterada na imuno-senescência, a formação de centros germinativos está reduzida, a resposta de anticorpos está diminuída e retardada, e a afinidade dos anticorpos (e maturação de afinidade) também está reduzida (Nikolich-Zugich, 2005). Alguns estudos mostraram um declínio nos níveis de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA nos linfonodos periféricos e de IgA secretória no muco intestinal de animais idosos. Outros estudos mostram que há um aumento de IgM e IgG no plasma e soro e de IgA no soro e saliva de humanos idosos e no muco intestinal de camundongos idosos (Szewczuk, Campbell e Jung, 1981, Arranz e cols., 1992, Listi e cols., 2006, Fujihashi, McGhee, 2004).

Assim, podemos observar que, na imuno-senescência, ocorre uma alteração de vários mecanismos e células do sistema imune, dos quais grande parte está envolvida na indução da tolerância oral. Sendo assim, é concebível supor que o fenômeno da senescência influencie na indução da tolerância oral.

#### **1.4 - Imuno-senescência e Tolerância Oral**

Como já citado anteriormente, a idade do animal ao primeiro contato com o antígeno é considerado um fator importante para a indução da tolerância oral. Strobel e Ferguson mostraram que camundongos considerados susceptíveis à indução de tolerância oral, como B6D2F1, quando tratados com OVA nas primeiras 48 horas de vida não desenvolvem a supressão da resposta imune a esse antígeno e apresentam altos níveis de anticorpos específicos anti-OVA. Somente após a segunda semana de vida, o estado de tolerância é alcançado (Strobel & Ferguson, 1984).

Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que animais susceptíveis à indução da tolerância oral com 8 semanas de idade se tornam menos susceptíveis com 24 semanas e totalmente refratários com 70 semanas (Faria e cols., 1993, Faria e cols., 1998b). A transferência de células do baço de animais B6D2F1 jovens, tanto para animais neonatos como idosos, aumenta a susceptibilidade à indução da tolerância oral nesses animais. Em contraste, a transferência de células de animais idosos para camundongos jovens os torna menos susceptíveis (Lahmann, Menezes, Verdolin e Vaz, 1992).

Curiosamente, essa refratariedade é observada em animais tratados por gavagens, onde os animais entre 24 e 32 semanas mostram-se imunizados ao invés de tolerizados (Faria e cols., 1993). Já aqueles animais, de mesma idade, que recebem quantidade equivalente de OVA por ingestão voluntária (20mg) mostram-se tolerantes. O mesmo ocorreu em animais de 70 semanas de idade, o que mostra que uma administração contínua do antígeno pode reverter a refratariedade à indução da tolerância oral em animais idosos ou em fase de maturação (Faria e cols., 1998b, Faria e cols., 1993).

Estudos de Wakabayashi e cols. utilizando hemácias de carneiro (SRBC) como antígeno, também mostraram um decréscimo na susceptibilidade de indução da tolerância em animais de meia idade e idosos. Animais com 12 meses de idade que foram tratados por gavagens por 3 dias consecutivos mostraram um aumento significativo no nível de anticorpos IgM e IgG mesmo 6 meses após o tratamento oral (Wakabayashi e cols., 1999). Kato e cols. também mostraram uma refratariedade à indução da tolerância oral em animais de 6-8 meses, 12-14 meses e 24 meses tratados oralmente com OVA. Segundo esses autores, tal refratariedade se deve a uma perda de interação de células T nas placas de Peyer. Esse trabalho mostrou que ocorre uma diminuição no tamanho das placas de Peyer com o envelhecimento assim como um

redução no número de DCs e sugere que ocorra uma desregulação nas atividades de células T e B em animais idosos. Tal desregulação pode estar relacionada em parte com a senescência da função imune de ambas DCs e DCs foliculares nas placas de Peyer (Kato e cols., 2003).

Esses trabalhos contradizem Moreau e Gaboriau-Routhiau que relataram que a senescência não afeta a indução da tolerância oral, mas somente a sua persistência. Utilizando camundongos com 20 meses de idade tratados oralmente com gavagem única de 20mg de OVA, os autores observaram a indução de um estado de tolerância nesses animais, porém essa tolerância foi menos duradoura do que aquela observada em animais jovens (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996).

Um dos possíveis mecanismos que explicariam a diminuição da susceptibilidade à indução de tolerância oral no idoso seria uma menor captação de antígenos pelas placas de Peyer. No entanto, estudos avaliaram essa possibilidade quantificando as partículas captadas pelas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos depois da administração de microesferas em camundongos adultos e idosos ou ratos e mostraram que a captação através do epitélio foi aumentada ou não afetada em camundongos ou ratos idosos, indicando que a captação de antígenos não está diminuída com o envelhecimento (Simon, Shine e Dayan, 1994). Como a tolerância oral é um evento iniciado nas mucosas e tem 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.

O tempo de duração ou manutenção da tolerância oral é outra questão muito discutida e até mesmo contraditória. Enquanto alguns trabalhos mostram que a tolerância é perdida 21 dias após o tratamento oral (Melamed & Friedman, 1993), outros mostram que a mesma é mantida até mesmo um ano após o tratamento oral (Faria e cols., 1998a).

Estudos utilizando uma única administração oral de OVA por gavagem mostraram que a supressão da resposta imune sistêmica de IgG dura cerca de 3 meses e a supressão da imunidade celular (DTH) pode persistir por 17 meses (Strobel & Ferguson, 1987). De acordo com o trabalho de Moreau e Gaboriau-Routhiau, a tolerância é mantida até 2 meses após tratamento oral em animais convencionais porém essa tolerância é perdida em animais isentos de germes (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996). No entanto, esse trabalho não avaliou a manutenção da tolerância em animais que não eram isentos de germes após dois meses.

Melamed & Friedman levantaram a hipótese de que a exposição contínua ao antígeno, ou seja, a persistência do antígeno seria fundamental para a manutenção da tolerância. Eles demonstraram que a tolerância oral persistiu durante o período estudado em camundongos desafiados com o antígeno em adjuvante completo de Freund (CFA) após tratamento oral e foi perdida 21 dias após o tratamento oral em camundongos que somente receberam tratamento oral e foram desafiados em tempos posteriores. Esse trabalho é uma das primeiras evidências de que o adjuvante pode ter um papel importante na manutenção da tolerância oral (Melamed & Friedman, 1993).

Estudos em nosso laboratório mostram que camundongos tratados oralmente quando jovens são capazes de manter o estado de tolerância por até um ano após o tratamento oral. Assim como no trabalho de Melamed & Friedman, os animais foram tratados oralmente e imunizados com OVA em adjuvante 7 dias após. No entanto, foi utilizado, como adjuvante, hidróxido de alumínio no lugar de CFA. Esse trabalho confirma dados anteriores de que a senescência afeta a magnitude da resposta imune mostrando um decréscimo significativo nos níveis de anticorpos anti-OVA em animais idosos do grupo controle (Faria e cols., 1998a).

Adjuvantes como hidróxido de alumínio e adjuvante completo de Freund (CFA) são conhecidos por retardar a eliminação do antígeno. Na tolerância oral, a importância do adjuvante talvez não seja apenas por aumentar o tempo de exposição ao antígeno, mas por gerar um fenômeno inflamatório que pode ser importante para manter a memória imunológica na tolerância oral.

## 1.5 - Adjuvantes

Por mais de 70 anos, substâncias com atividade co-estimuladora têm sido misturadas com antígenos protéicos com a finalidade de aumentar a sua imunogenicidade. Tais substâncias são conhecidas como adjuvantes (Storni e cols., 2004).

Adjuvantes são usualmente definidos como compostos que podem aumentar e/ou modular a imunogenicidade intrínseca de um antígeno e, de acordo com o próprio significado da palavra, que se origina do latim *adjuvare*, tem como função ajudar. Esses compostos têm a habilidade não só de aumentar, mas de seletivamente direcionar a resposta imune de diferentes antígenos e essas propriedades têm sido consideradas em

várias estratégias de vacinação para alcançar uma resposta imune celular ou humoral efetiva (Guy, 2007, Faquim-Mauro, 1999, Faquim-Mauro, 2000).

Um mecanismo clássico de ação de adjuvantes é a formação de “depósitos”, no qual o adjuvante protege o antígeno de diluição e rápida degradação, assim como da eliminação pelo hospedeiro. Através da liberação prolongada e intacta do antígeno, o adjuvante permite uma exposição lenta e prolongada de um baixo nível de antígenos às células do sistema imune. Essa exposição prolongada resulta em uma estimulação contínua de células produtoras de anticorpos, resultando na produção de altos níveis de anticorpos pelo hospedeiro (Stills Jr, 2005).

Um segundo mecanismo de ação dos adjuvantes seria como veículo de ajuda para levar antígenos aos órgãos linfóides como baço e linfonodos, onde o antígeno é captado por DCs foliculares que rapidamente migram via sistema linfático para os linfonodos drenantes. A retenção do antígeno nesses órgãos é essencial para a produção de anticorpos e manutenção de células de memória (Stills Jr., 2005).

Um outro mecanismo envolvido na atividade dos adjuvantes seria a imunomodulação, na qual a função adjuvante é exercida através da estimulação direta de células do sistema imune inato como monócitos, macrófagos, células NK e NKT e DCs (Kensil, Mo e Truneh, 2004). O recrutamento e ativação de células como macrófagos e DCs leva a uma reação inflamatória. Macrófagos ativados secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-8 que recrutam neutrófilos, basófilos e linfócitos, aumentam a permeabilidade vascular, causam destruição tecidual e resultam em um efeito sistêmico que leva à produção de proteínas da fase aguda da inflamação por hepatócitos (Stills Jr., 2005).

Segundo Mitchel e cols., outro mecanismo de ação dos adjuvantes seria o aumento da sobrevivência de células T ativadas durante e após a fase proliferativa da expansão clonal. Segundo os autores, a injeção de um antígeno protéico purificado em animais causa uma rápida proliferação seguida por uma morte rápida de células T antígeno-específicas. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual os adjuvantes aumentam a expectativa de vida de células T ativadas. Um dos possíveis mecanismos seria pela indução de Bcl-3, um membro da família Bcl-2 que são proteínas anti-apoptóticas e estão envolvidas na sobrevivência ou morte de células (Mitchell e cols., 2001).

Estudos focados na indução de resposta humoral a antígenos solúveis mostraram que diferenças no padrão de isotipos de anticorpos produzidos dependem das

características bioquímicas do adjuvante. Mais especificamente, os adjuvantes hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) e adjuvante incompleto de Freund (IFA) promovem produção de anticorpos IgE e IgG1, através de IL-4 pela ativação de células Th2, enquanto que o adjuvante completo de Freund (CFA) promove a síntese de IgG1 e IgG2a, pela ativação de células Th1 com produção de  $\text{INF-}\gamma$  e IL-12. Embora ambos os adjuvantes induzam a produção de IgG1, vale destacar que IgG1 dependente de IL-4 é do tipo anafilática e tem a capacidade de induzir degranulação de mastócitos, enquanto que a IgG1 induzida por células Th1 não tem atividade anafilática (Faquim-Mauro, 2000). Assim, a IL-4 quando induzida por  $\text{Al}(\text{OH})_3$  é produzida em altos níveis e tem um perfil pró-inflamatório devido à promoção da produção de IgG1 anafilática e IgE. Em outras palavras, as propriedades imunomoduladoras dos adjuvantes podem depender da sua habilidade de estimular uma resposta Th1 ou Th2.

Compostos de alumínio como hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) são os adjuvantes mais comumente utilizados em vacinas tanto para uso veterinário como para humanos. O mecanismo de ação do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  é complexo e não totalmente entendido e inclui formação de “depósitos” por adsorção do antígeno, aumento da apresentação de antígenos a APCs e ativação não específica do sistema imune (Schijns, 2002).

A imunogenicidade do antígeno na presença de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  pode ser dependente do grau de adsorção do antígeno e da dose do adjuvante (Gupta, 1998). Segundo Vaz e cols., a dose do adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$  é tão importante quanto a dose do antígeno para a indução da resposta imune existindo uma linearidade entre a dose de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e a magnitude da formação de anticorpos. Esse estudo ainda sugere que o efeito do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  depende do desenvolvimento de células B (Vaz e cols., 1981).

Apesar de ser muito conhecido por sua capacidade de adsorção e por retardar a eliminação do antígeno, outros mecanismos de ação também são muito importantes para sua função adjuvante. O  $\text{Al}(\text{OH})_3$  pode induzir eosinofilia e ativação de complemento assim como uma intensa degranulação de mastócitos no local da injeção (quase não há mastócitos intactos na cavidade peritoneal de camundongos alguns minutos após a injeção de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ). A inflamação no local “estimula” a drenagem linfática da região e facilita o transporte do antígeno para os linfonodos. As células B podem ser o principal alvo do efeito do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Gupta, 1998, Vaz e cols., 1981).

A indução de resposta de anticorpos por  $\text{Al}(\text{OH})_3$  é comparável àquela observada por CFA. Uma das vantagens da utilização de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  como adjuvante é um desenvolvimento rápido de altos títulos de anticorpos de resposta de longa duração

depois da imunização primária e uma desvantagem é que esse adjuvante não é eficiente na indução de resposta imune mediada por células (Gupta, 1998).

Por mais de meio século os adjuvantes incompleto (IFA) e completo (CFA) de Freund têm sido os mais comumente usados em trabalhos experimentais. Todavia, o modo de ação dos mesmos é ainda incompletamente entendido. Além dos estudos realizados nos anos 50 e 60, pouca investigação foi feita sobre o modo de ação desses adjuvantes.

O CFA é uma emulsão oleosa que contém micobactérias mortas por calor (“heat-killed”) como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, e é o mais potente e mais adequado para alguns propósitos. A micobactéria morta misturada em excipiente oleoso persiste por semanas ou mesmo meses no local injetado e em órgãos ricos em fagócitos como fígado e pulmão. Além disso, o CFA contém um imunomodulador ativo (muramil-dipeptídeo) que se liga a PRR (receptores de reconhecimento de padrões associadas à patógenos) em células do sistema imune inato. A ligação desses receptores inicia a cascata de sinais que levam a uma resposta imune inata resultando na ativação de APCs e promovendo uma resposta imune otimizada (Kensil, Mo e Truneh, 2004, Guy, 2007).

Alguns mecanismos de ação do CFA envolvem a prolongação da presença do antígeno no local injetado e um transporte mais efetivo de antígenos para o sistema linfático e pulmões, promovendo um conjunto complexo de sinais para o compartimento inato do sistema imune, resultando em proliferação e diferenciação leucocitária alteradas. Além disto, uma rápida captação do adjuvante e do antígeno por DCs, a fagocitose aumentada, a secreção de citocinas por fagócitos mononucleares, e a ativação e proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> também seriam resultado da inoculação desse adjuvante (Billiau e Mathy, 2001).

O IFA é composto por óleo de parafina e surfactante e tais compostos não são de forma alguma inertes imunologicamente. Além de afetar o tráfego dos antígenos embebidos no mesmo, o próprio IFA exerce vários efeitos no sistema imune como estimular a resposta imune inata e induzir expressão de citocinas, predominantemente TNF- $\alpha$ , em linfonodos regionais. O IFA ainda pode induzir doenças que se assemelham às doenças autoimunes (Billiau e Mathy, 2001).

A ativação de células T é mais eficiente em camundongos imunizados com antígeno em CFA do que em IFA. A imunização com CFA favorece a produção de IL-12, a qual resulta numa polarização da resposta para Th1, caracterizada pela produção

de INF- $\gamma$  e IL-2 associada a uma proliferação de células T aumentada. Entretanto, alguns estudos mostraram que a atividade de apresentação de antígeno está mais aumentada em camundongos primados com antígeno emulsificados em IFA do que em CFA. Uma possível explicação seria que peptídeos do *Micobacterium tuberculosis*, presentes no CFA competiriam com peptídeos derivados do antígeno durante a apresentação. Alternativamente, componentes do CFA aumentam a secreção local de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , que podem reduzir a capacidade de captação e processamento de antígenos por DCs humanas *in vitro* (Guéry, Ria e Adorini, 1996). Por outro lado, segundo Tadokoro e cols., o adjuvante CFA produz sinais inflamatórios tão fortes que sobrepõem ou “quebram” a ação de células reguladoras e o mesmo não ocorre com IFA (Tadokoro e cols., 2006). Já outros estudos mostraram que, tanto na presença de CFA como IFA, a capacidade fagocítica/pinocítica de DCs está aumentada (Billiau e Matthys, 2001). Ambos adjuvantes, IFA e CFA, são bastante eficientes na produção de altos títulos de anticorpos de alta afinidade e alta avidéz. Em adição, por apresentar em seu composto uma micobactéria, o CFA produz uma hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) (Stills Jr., 2005). Assim, muito estudo ainda é necessário para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na ação desses adjuvantes.

### **1.6 - Adjuvantes e Tolerância Oral**

O protocolo padrão utilizado para demonstrar o desenvolvimento ou não de tolerância oral envolve a imunização com o antígeno - previamente administrado por via oral - com um adjuvante. No entanto, a contribuição desse co-estímulo para a indução mesma da tolerância foi, até hoje, muito pouco estudada.

Estudos de Tobagus, Thomas e Holt, avaliaram o papel modulador dos adjuvantes Al(OH)<sub>3</sub> e CFA no processo de tolerância oral. Segundo os autores, aspectos qualitativos do processo de tolerância oral são fortemente influenciados pelo tipo de adjuvante usado na imunização (Tobagus, Thomas e Holt, 2004). Resultados desse estudo mostraram que imunização com um antígeno, no caso OVA, em CFA após o tratamento oral com o mesmo antígeno, leva a uma inibição de IgG1 e IgG2a, assim como IL-2 e INF- $\gamma$  que são características de resposta Th1. Enquanto isto, o uso de Al(OH)<sub>3</sub> induz uma inibição de IgG1 e IL-5, que caracterizam a resposta Th2. Assim, quando se imuniza os animais com antígenos em adjuvante tipo Th1, como CFA, uma

supressão seletiva associada a Th1 é observada. Por outro lado, quando um adjuvante tipo Th2, como Al(OH)<sub>3</sub>, é utilizado, observa-se uma supressão seletiva associada a Th2 (Tobagus, Thomas e Holt, 2004).

Como já citado anteriormente, o envolvimento dos adjuvantes na tolerância oral pode ser muito maior do que se acredita. Um das grandes possibilidades é que os adjuvantes além de imunomodular a tolerância oral em direção a uma supressão Th1 ou Th2, ainda tenham um papel muito importante na manutenção da mesma. A inflamação gerada pelo adjuvante pode ser importante na indução e manutenção da tolerância oral.

Durante a imunização, ocorre a expansão das células reguladoras que limitam a expansão dos clones estimulados (Almeida e cols., 2006). Essa “indexação” das células Tregs à dinâmica de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> pode explicar porque a imunização utilizando adjuvantes pode ser um reforço de mecanismos tolerogênicos induzidos pela administração oral de antígenos como na tolerância oral.

Desta forma, o objetivo desta dissertação foi estudar o papel inflamatório dos adjuvantes CFA e Al(OH)<sub>3</sub> na manutenção da tolerância oral.



## **2 – OBJETIVOS**

## 2.1 – Objetivo Geral

Estudar o papel da imunização parenteral com o antígeno na presença de adjuvante na manutenção da tolerância oral a esse antígeno em camundongos.

## 2.2 – Objetivos Específicos

- 1) Avaliar por quanto tempo a tolerância oral, desencadeada por gavagem ou ingestão voluntária, é mantida na ausência de imunização parenteral com a mesma proteína dada por via oral;
- 2) Verificar se imunizações parenterais com diferentes adjuvantes alteram a manutenção da tolerância oral;
- 3) Co-relacionar a frequência de linfócitos T  $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$  e  $CD4^+LAP^+$  (presentes no baço e nos linfonodos mesentéricos e inguinais) com a indução e manutenção de tolerância oral.

A seguir são descritas algumas estratégias usadas para atingir os objetivos propostos:

- Tratar os animais por via oral com ovalbumina (OVA) e imunizar i.p. com Ova +  $Al(OH)_3$  (hidróxido de alumínio) ou Ova + CFA (adjuvante completo de Freund), 7, 30, 90 ou 180 dias após o tratamento oral;
- Tratar os animais por via oral com OVA, imunizar i.p. com Ova +  $Al(OH)_3$  7 dias após o tratamento oral e desafiar i.p. com OVA solúvel 14, 30, 90, 180 ou 360 dias após a imunização primária;
- Tratar os animais por via oral com OVA, imunizar i.p. com OVA +  $Al(OH)_3$  7 dias após o tratamento oral, desafiar i.p. com OVA solúvel após 180 dias, sangrar pelo plexo orbital 7 dias depois do desafio para avaliar a manutenção da tolerância e em seguida imunizar s.c. com OVA+ CFA.

Avaliar, como parâmetros imunológicos de indução de tolerância oral:

- A produção de anticorpos séricos anti-Ova (Ig total, IgG1 e IgG2a)
- A produção de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-4) e antiinflamatória (IL-10) no sobrenadante de cultura de células isoladas de baço e linfonodos mesentéricos e inguinais estimulados *in vitro* por OVA.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 - Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 8 e 12 semanas. Os animais procedentes do CEBIO (UFMG) foram mantidos no biotério do laboratório de Imunobiologia, ICB-UFMG.

### **3.2 - Antígenos**

Utilizou-se como antígeno Ovalbumina (OVA) 3 vezes cristalizada- Grade III (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

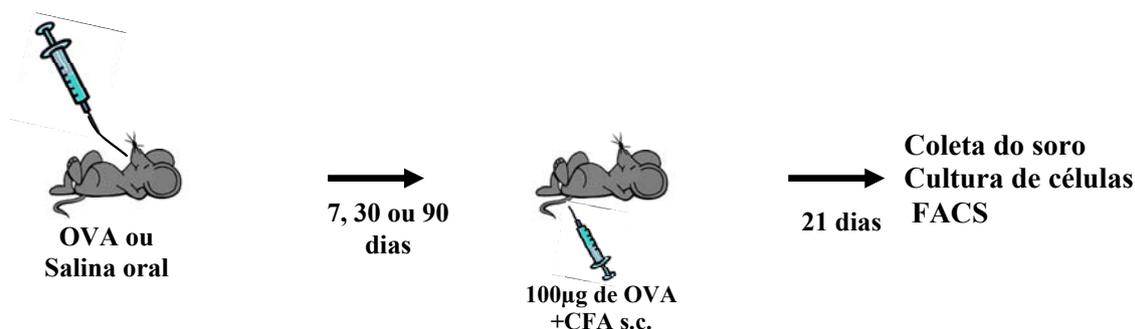
### **3.3 – Adjuvantes**

Foram utilizados: Adjuvante Completo de Freund (CFA) e Hidróxido de Alumínio ( $\text{Al(OH)}_3$ ).

### **3.4 - Tratamento oral para indução de Tolerância Oral**

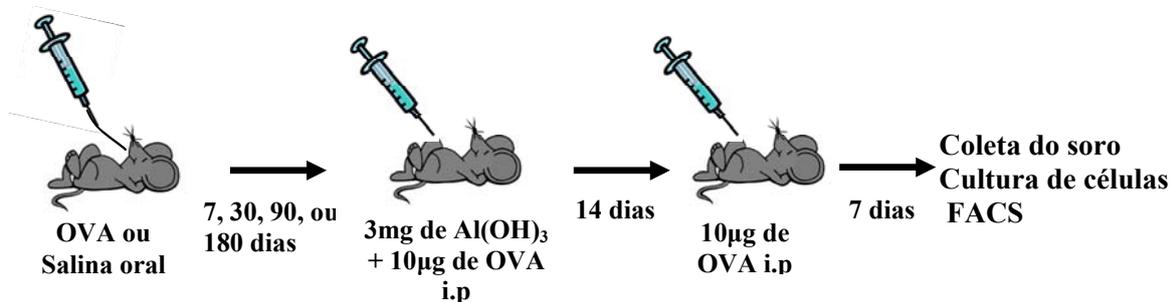
Doses de 20mg por camundongo foram administradas por gavagem (intubação gástrica) ou por ingestão voluntária. . Para a gavagem utilizou-se uma agulha com ponta em esfera e comprimento necessário para chegar ao estômago, que foi introduzida pela cavidade oral. A ingestão voluntária consistiu em oferecer para os camundongos, como única fonte de líquido durante 24 horas, uma solução de OVA na concentração correspondente à 4mg/ml, levando-se em conta que a ingestão média por camundongo é de 5ml em 24h (20mg/dia de OVA) conforme determinado anteriormente em trabalhos de nosso laboratório (Faria e cols., 1993).

### 3.5 - Protocolos Experimentais



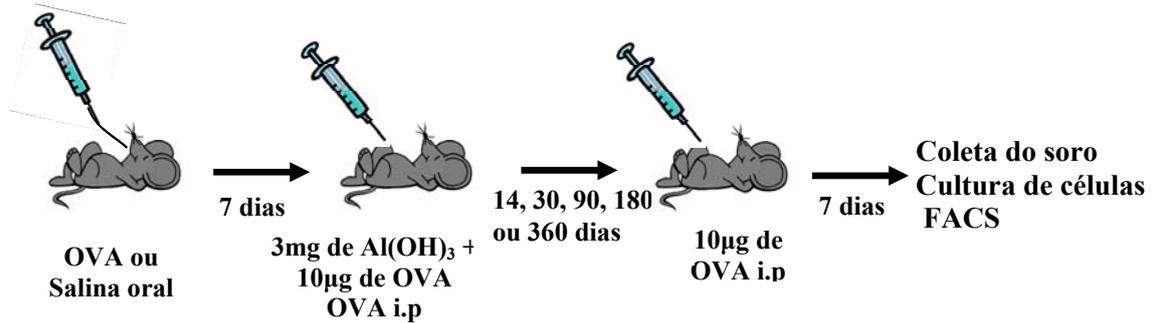
**Figura 1 - Protocolo I**

Os animais foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem e ingestão voluntária) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada em diferentes tempos: 7, 30 ou 90 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção subcutânea, na base da cauda, de 100 µg de OVA emulsificada em CFA na diluição de 1:1. Após 21 dias os animais foram sacrificados para obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5



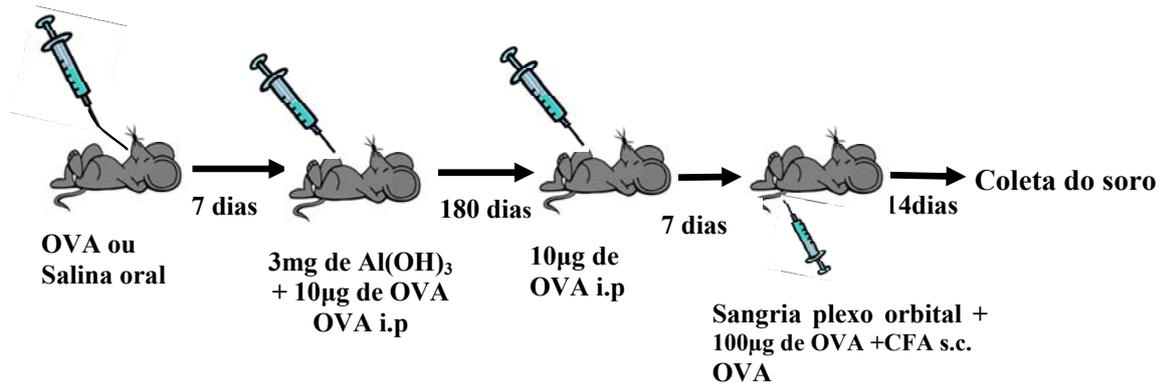
**Figura 2 - Protocolo II**

Os animais foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem e ingestão voluntária) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada em diferentes tempos: 7, 30, 90 ou 180 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção de 10 µg de OVA e 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M) na cavidade peritoneal. A imunização secundária foi realizada 14 dias após a primária e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Sete dias após o desafio os animais foram sacrificados para obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5



**Figura 3 - Protocolo III**

Os animais foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem e ingestão voluntária) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção, por via intraperitoneal de 10µg de OVA e 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M). A imunização secundária foi realizada em diferentes tempos: 14, 30, 90, 180 ou 360 dias após a primeira imunização, e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10 µg de OVA diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Sete dias após o desafio os animais foram sacrificados para obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo: 5



**Figura 4 - Protocolo IV** - Os animais foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem e ingestão voluntária) ou salina (grupo controle imune).

A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA e 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M). A imunização secundária foi realizada 180 dias após a primeira imunização, e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10 µg de OVA diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Após 7 dias os animais foram sangrados para obtenção do soro e receberam uma injeção subcutânea, na base da cauda, de 100 µg de OVA emulsificada em CFA na diluição de 1:1. Após 14 dias os animais foram sacrificados pra obtenção do soro. Número de animais/grupo : 5

### 3.6 – Obtenção do soro

Para obtenção do soro, os animais foram anestesiados utilizando 100 µl de solução de Cloridrato de Ketamina e Xilazina. Em seguida, o sangue foi coletado através de uma incisão na veia axilar e coletado em tubos de centrifugação de 500µl. Após a coagulação do sangue, o soro foi separado através de centrifugação durante dez minutos, a 300g. O soro foi então armazenado a -20°C para posteriores análises.

### 3.7 - Ensaio Imunoenzimático para medida de anticorpos totais anti-OVA

A avaliação dos anticorpos específicos anti-OVA presentes no soro dos camundongos foi realizada através do método ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*).

Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4 °C com uma solução de OVA (2 µg/ml) em tampão de cobertura ( tampão carbonato pH 9,6). No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200 µl PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente duas vezes em salina-Tween e incubadas com o soro dos camundongos em diluição seriada em PBS-caseína (1:100 a 1:12800) durante uma hora a 37 °C. Como controle positivo e negativo, foram utilizados um soro imune e um soro normal, respectivamente. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas com 100 µl de uma solução de anticorpo de cabra anti-Ig total de camundongo conjugado à peroxidase (Southern Biotechnology Ass, Inc.) na diluição de 1:15000 por uma hora à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween.

A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ( $\lambda = 490$  nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

### 3.8 - Ensaio Imunoenzimático para medida de IgG1 e IgG2a anti-OVA

Esse protocolo foi realizado como descrito no item 3.8 com algumas modificações. Resumidamente, placas foram incubadas com 100 µl/poço de uma solução de OVA (2µg/poço) diluída em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, após 3 lavagens, as placas foram bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-caseína, por no mínimo 1 hora à temperatura ambiente. Após essa etapa, foi adicionado o soro diluído a 1:10, realizadas diluições seriadas (1:100 a 1:12800) e as placas foram incubadas a 37°C durante uma hora. Após a lavagem, foram adicionados os anticorpos anti-isotipos marcados ou não com peroxidase (Goat anti-mouse IgG1 – HRP ou Goat anti-mouse IgG2a UNLB) nas diluições de 1:15000 e incubadas por 1 hora a 37°C. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Rabbit anti-goat IgG2a HRP) foi requerida para IgG2a, incubando-as com na diluição de 1:15000 por 45 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas e a reação imunoenzimática revelada como já descrito.

### 3.9 - Ensaio Imunoenzimático para medida da concentração de citocinas

As placas foram sensibilizadas com 100 µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra INF- $\gamma$ , IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ , 1 µg/ml (R&D SYSTEMS), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina tween e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-caseína, por, no mínimo, 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram novamente lavadas e foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente 100 µl/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para INF- $\gamma$ , IL-10, IL-4 (BD Pharmingen) e TGF- $\beta$  (R&D SYSTEMS) marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/ml. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (100 µl/poço) (Southern Biotechnology Associate Inc.) em uma diluição de 1:15000 foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em

tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância ( $\lambda = 490$  nm) de cada poço foi obtida pelo leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

### 3.10 - Cultura de células

#### 3.10.1 – Meio de cultura

Foi utilizado meio RPMI 1640 Gibco BRL como meio incompleto e, como meio completo foi utilizado RPMI 1640 enriquecido com 2nM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercapto-etanol, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de fungizona, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 5-10% de soro fetal bovino inativado.

#### 3.10.2 – Preparação de suspensão celular

Baço, linfonodos mesentéricos e inguinais de cada animal foram retirados e mantidos em meio de cultura incompleto (baços) e completo (linfonodos) em tubos FALCON de 15ml e mantidos em gelo e ambiente estéril até o plaqueamento das células.

Os baços foram macerados em um macerador de vidro estéril em 3ml de meio RPMI incompleto e os linfonodos foram macerados com lâminas estéries friccionando-as uma contra a outra em 2ml de meio RPMI completo em uma placa de Petri.

As suspensões foram então transferidas para os tubos FALCON de 15ml e centrifugadas durante dez minutos a 300g, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspendido em 250 µl e 500 µl de meio RPMI completo para os linfonodos inguinal e mesentérico consecutivamente.

Para o baço as hemáceas presentes no *pellet* foram lisadas acrescentando-se 9 ml de água estéril seguida de PBS concentrado 10x. As suspensões celulares foram centrifugadas durante 10 minutos a 300g, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 1 ml de meio RPMI completo.

### 3.10.3 – Contagem de células viáveis

O número de células viáveis nessa suspensão foi obtido contando-se alíquotas misturadas com uma solução de eritrocina em câmara de Neubauer. As concentrações das suspensões foram então todas padronizadas pela adição do volume necessário de meio RPMI completo para se obter  $5 \times 10^6$  células/ml para cultura de células.

### 3.10.4 – Cultura de células e coleta do sobrenadante da cultura

As células foram plaqueadas (180  $\mu$ l/poço) em placas de 96 poços (Falcon, Lincon Park) e incubadas por 72 horas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> com mais 20  $\mu$ l de RPMI completo (controle negativo), RPMI mais 20  $\mu$ l de OVA(10mg/ml) (testes) ou RPMI mais 20  $\mu$ l de solução do mitógeno Concanavalina A (2 $\mu$ g/ml) (controle positivo).

### 3.10.5 - Análise fenotípica de células através de citometria de fluxo

Baço, linfonodos mesentéricos e inguinais de cada animal foram retirados e mantidos em meio de cultura incompleto (baços) e completo (linfonodos) em tubos FALCON de 15ml e mantidos em gelo e ambiente estéril até o plaqueamento das células.

Os baços foram macerados em um macerador de vidro estéril em 3 ml de meio RPMI incompleto e os linfonodos foram macerados com lâminas estéreis friccionando-as uma contra a outra em 2ml de meio RPMI completo em uma placa de Petri.

As suspensões foram então transferidas para os tubos FALCON de 15ml e centrifugadas durante dez minutos a 300g, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspenso em 250  $\mu$ l e 500  $\mu$ l de meio RPMI completo para linfonodos inguinal, mesentérico consecutivamente.

Para o baço as hemácias presentes no *pellet* foram lisadas acrescentando-se 9 ml de água estéril e PBS concentrado 10x. As suspensões celulares foram centrifugadas durante 10 minutos a 300g, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1 ml de meio RPMI completo.

O número de células viáveis nessa suspensão foi obtido contando-se alíquotas misturadas com uma solução de eritrocina em câmara de Neubauer. As concentrações

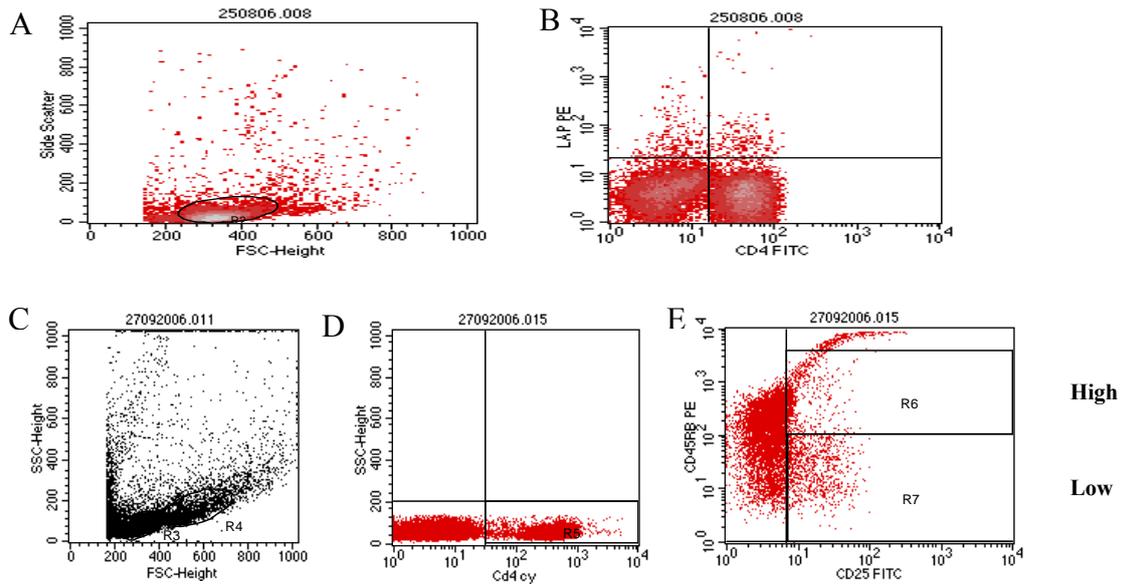
das suspensões foram então todas padronizadas pela adição do volume necessário de PBS-SFB ( PBS soro fetal bovino) para se obter  $2 \times 10^7$  células/ml.

Em uma placa de 96 poços de fundo em U foram colocados 25  $\mu$ l de suspensão celular e 10  $\mu$ l de anticorpos (na diluição padronizada) conjugados com fluorocromos – PE(ficoeritrina), FITC(fluoresceína) ou CyChrome (Cy) – que se ligam às moléculas de interesse, tais como CD4, CD25, LAP, CD45RB expressas nas células de camundongos.

As placas foram então encubadas a 4 °C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foi então acrescentados 200  $\mu$ l de PBS azida/poço para lavagem da placa que foram centrifugadas a 4 °C durante 10 minutos a 300g .Essa lavagem foi realizada por três vezes. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuscitado em 200  $\mu$ l de fixador Mac Facas Fix (MFF) e as suspensões armazenadas a 4 °C e protegidas de luz até aquisição em FACScalibur. No caso de anticorpos que não estavam marcados diretamente com fluorocromo (ex: conjugados a biotina), após a primeira lavagem as células foram incubadas com 10 $\mu$  de solução contendo estreptavidina conjugada ao fluorocromo durante mais 30 minutos e posteriormente foram realizadas mais duas lavagens e as células foram então fixadas em MFF para aquisição.

Em todos os órgãos foram utilizados os anticorpos IgG2a FITC e IgG2a PE para controle negativo.

A análise dos dados foi realizada utilizando um FACScan de três cores (Becton Dickison, Mountain View, Califórnia). A percentagem de células positivas foram analisadas através do software Cell Quest e Flow Jow.



**Figura 5** - Análise de leucócitos do baço por citometria de fluxo.

As figuras 5A e C representam um perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de linfócitos. A figura 5B representa FL1 (LAP-PE) versus FL2 (CD4-FITC). A figura 5D mostra a população de células CD4-CY positivas dentro da população de linfócitos totais. A figura 5E representa a população CD25-FITC versus CD45RB-PE dentro da população CD4<sup>+</sup>.

### 3.12 – Soluções Utilizadas

#### A. Soluções usadas no teste de ELISA

Tampão Carbonato pH 9,6

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,015M

$\text{NaHCO}_3$  0,035M

Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

$\text{NaCl}$  0,0015M

$\text{KCl}$  0,0081M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0,1369M

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0027M

PBS-caseína

Tampão fosfato pH 7,2

Caseína 25%

Salina fisiológica

$\text{NaCl}$  0,85%

Salina-Tween

Salina fisiológica 0,85%

Tween 20 0,05%

Tampão Citrato pH 5

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M

Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) 0,1M

Solução de ácido sulfúrico

$\text{H}_2\text{SO}_4$  2N

Solução do substrato (por placa)

OPD: 4 mg

$\text{H}_2\text{O}_2$ : 2  $\mu\text{l}$

Tampão citrato pH 5: 10 mL

**B. Soluções usadas na marcação fenotípica de linfócitos**

PBS-azida

Tampão fosfato pH 7,2

Azida sódica 0,01%

PBS-W

Tampão fosfato pH 7,2

BSA (albumina sérica bovina) 5%

Mac Facs Fix

NaCl: 0,15M

Cacodilato de sódio

Paraformaldeído 1%

## **4 - RESULTADOS**

#### **4.1 - Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + CFA em tempos distintos após indução da tolerância oral.**

A manutenção da tolerância oral, em animais tratados oralmente com OVA e imunizados com o mesmo antígeno na presença de adjuvante CFA em tempos distintos após o tratamento oral já foi discutida em alguns trabalhos. Resultados de Strobel e Ferguson mostram que a tolerância oral é mantida completamente até 3 meses após o tratamento oral (Strobel & Ferguson, 1986). Por outro lado, Melamed & Friedman relatam que essa manutenção dura somente até cerca de 20 dias após o tratamento oral (Melamed & Friedman, 1993).

Com base nesses estudos divergentes, resolvemos investigar vários aspectos envolvidos na manutenção da tolerância oral: a) o tempo de manutenção da tolerância oral a partir do tratamento oral com o antígeno em um protocolo básico de indução de tolerância oral e de imunização; b) o efeito de dois protocolos diferentes de administração oral de antígeno (gavagem e ingestão voluntária); c) o efeito do processo de imunização na manutenção da tolerância oral.

Para cumprir o primeiro objetivo, utilizamos animais tratados oralmente com OVA e imunizados com o adjuvante CFA em tempos distintos. Camundongos BALB/c fêmeas de 8 semanas de idade, foram tratados oralmente, por gavagem ou ingestão voluntária, com 20mg de OVA e o grupo controle recebeu salina por gavagem. Após 7, 30 ou 90 dias, esses animais foram imunizados com 100µg de OVA + CFA na diluição de 1:1 e sacrificados após 21 dias para a obtenção de soro e análise dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA assim como para a retirada do baço para medida de citocinas produzidas mediante a estimulação das células *in vitro* com OVA.

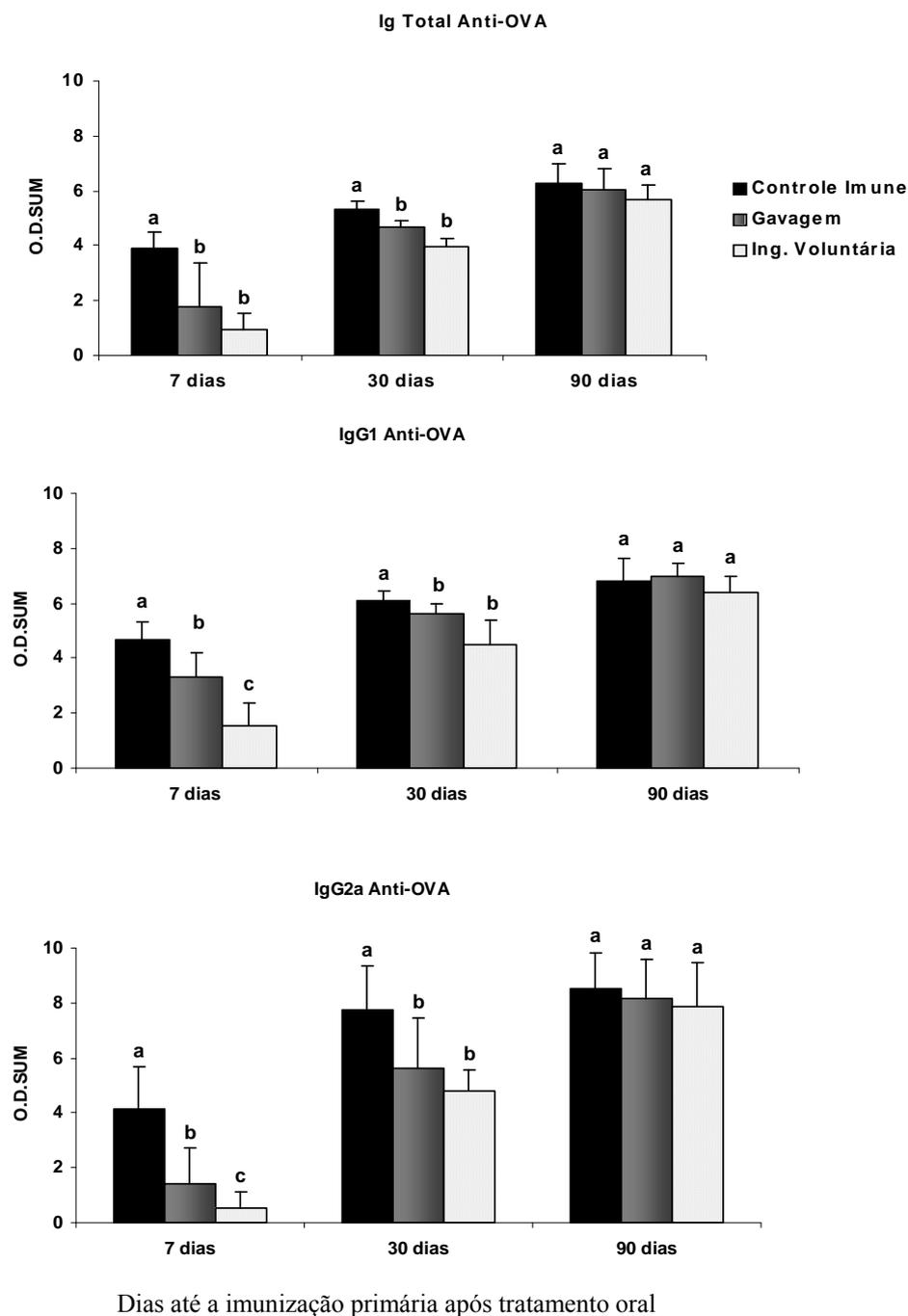
Como mostra a figura 6, na análise dos níveis de anticorpos Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA, parâmetros comumente utilizados para averiguar a indução de tolerância, animais tratados oralmente e imunizados, após 7 ou 30 dias, com OVA + CFA mantêm o estado de tolerância, havendo diferenças significativas entre os grupos gavagem e ingestão voluntária em relação ao controle imune ( $p < 0,05$ ). Entretanto, animais que foram tratados oralmente com OVA e imunizados após 90 dias não se mostraram tolerantes pela avaliação dos níveis de Ig total, IgG1 e IgG2a. Nos grupos imunizados 7 dias após o tratamento oral, a ingestão voluntária, quando comparada com a gavagem, se mostrou mais efetiva na supressão dos anticorpos séricos ( $p < 0,05$ ).

Uma observação interessante é que 30 dias após a gavagem ou a ingestão voluntária, observa-se um aumento nos níveis de anticorpos anti-OVA . Isto sugere uma perda gradual da tolerância oral.

Ao analisarmos os grupos nos diferentes intervalos de imunização, notamos uma diferença na produção de anticorpos Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA. Ainda de acordo com a figura 6, os títulos dessas imunoglobulinas aumentam ao longo dos tempos estudados não só nos grupos controle, mas também nos grupos gavagem e ingestão voluntária.

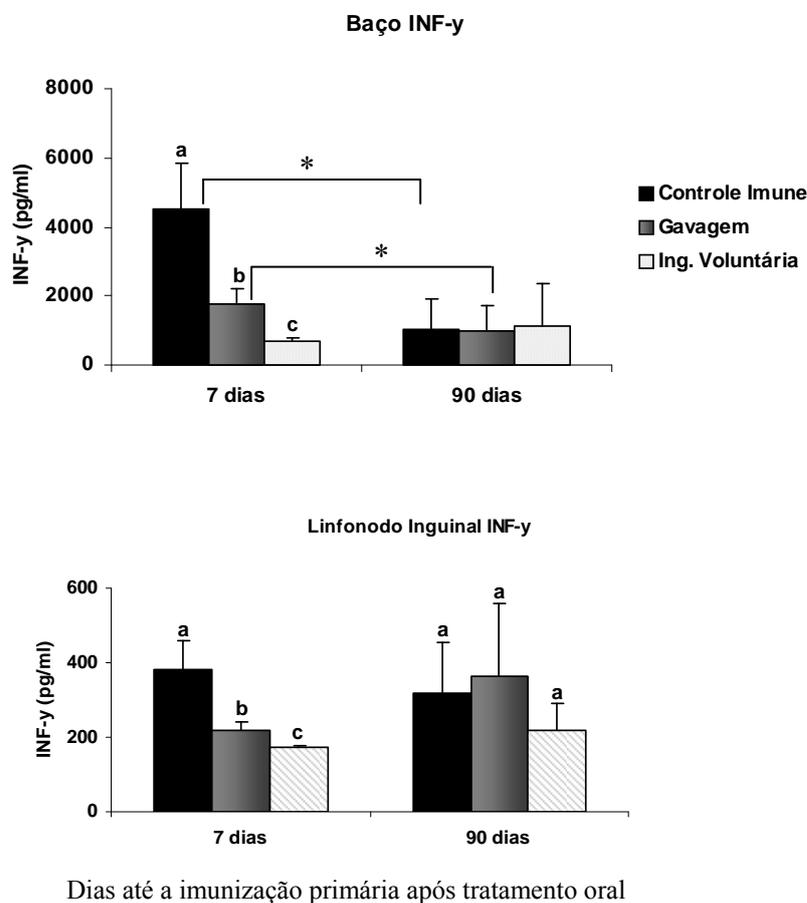
Outro fator avaliado para a averiguação da indução e manutenção de tolerância foi a produção de INF- $\gamma$ . Essa citocina pró-inflamatória do tipo Th1 é induzida por certos tipos de estímulos inflamatórios, como é o caso do adjuvante completo de Freund. Este adjuvante contém na sua composição extrato de *Micobacterium tuberculosis*, um agente infeccioso que desencadeia a ativação de macrófagos e células dendríticas, ativação esta que se encontra suprimida na tolerância oral. Avaliamos a produção de INF- $\gamma$  nos grupos em que a tolerância oral, avaliada pela produção de anticorpos, encontra-se presente ou ausente, quer sejam, os grupos imunizados 7 dias após o tratamento oral e os grupos imunizados 90 dias após o tratamento oral. Como podemos observar pelos resultados da figura 7, a produção de INF- $\gamma$  reflete o que ocorreu com a produção de anticorpos detectados no soro.

Algumas citocinas do tipo Th2 e outras com ação antiinflamatória são geralmente associadas à supressão ativa observada na tolerância oral segundo os relatos de vários pesquisadores (Faria & Weiner, 2005). Essas citocinas são IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , sendo IL-10 e TGF- $\beta$  citocinas antiinflamatórias. Assim, nosso próximo passo foi medir a produção de IL-4 e IL-10 no grupo imunizado 90 dias após o tratamento oral, uma vez que esse grupo não se mostrou tolerante para os parâmetros anteriormente avaliados nas figuras 6 e 7. Como mostram as figuras 8 e 9, houve uma baixa produção tanto de IL-4 como de IL-10, sendo a produção de IL-4 ainda mais baixa que de IL-10, pelos grupos gavagem, ingestão voluntária e controle imune. Não houve diferença na produção de IL-4 ou IL-10 entre os grupos gavagem e ingestão voluntária em relação ao controle imune, tanto pelas células do baço como dos linfonodos inguinais.



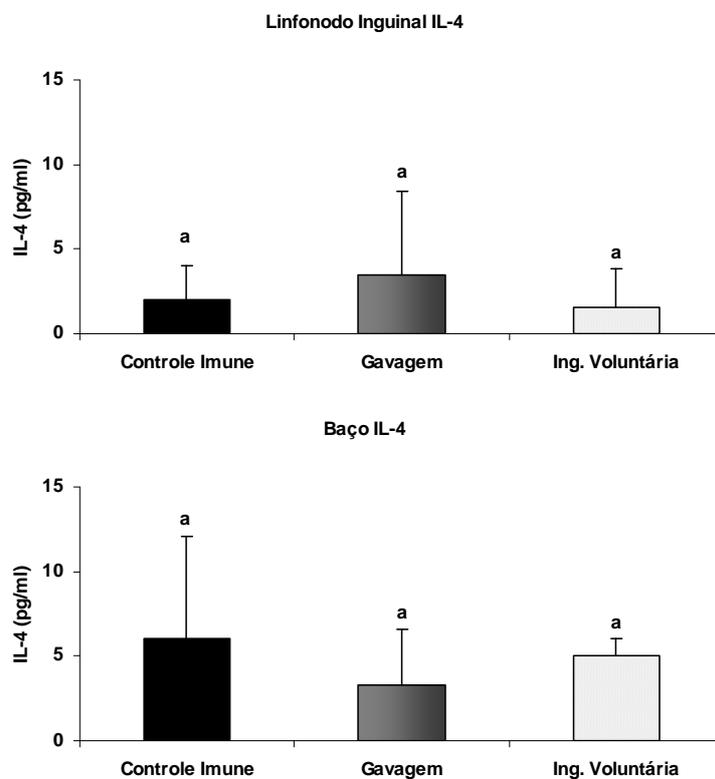
**Figura 6** - Produção de anticorpos séricos anti-OVA.

*Protocolo 1* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou ainda salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados s.c. 7, 30, ou 90 dias após com 100µg de OVA+ CFA na diluição de 1:1. Após 21 dias da imunização, os animais foram sangrados para verificação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio padrão da somatória (soma O.D.) das médias da absorbância obtidas com os soros de cada grupo diluídos a partir de 1:10. As letras a,b,c representam a diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N° de animais/grupo = 5

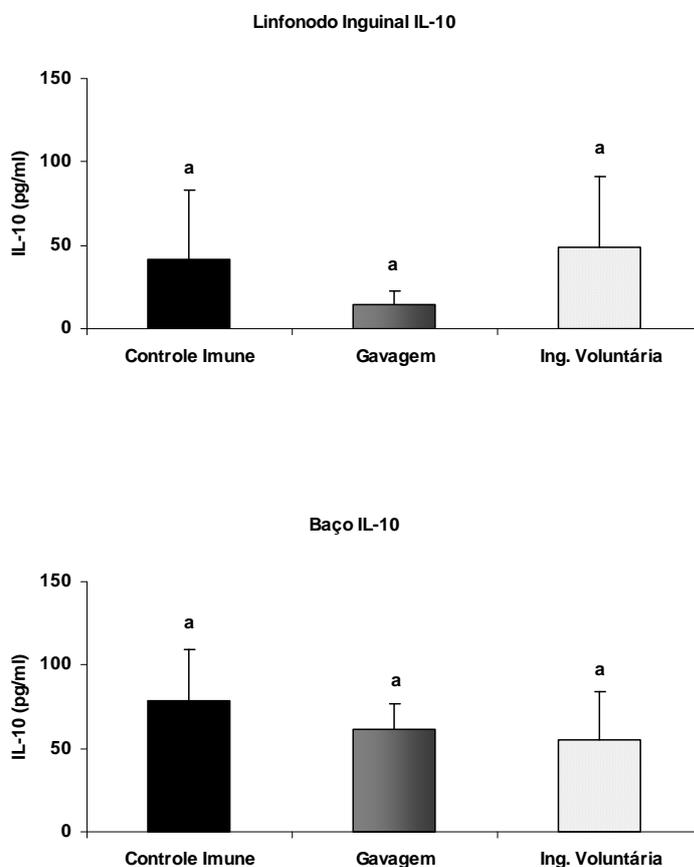


**Figura 7** - Produção de INF- $\gamma$  por células dos linfonodos inguiniais e do baço.

*Protocolo 1.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados s.c. 7 ou 90 dias após com 100 $\mu$ g de OVA+ CFA na diluição de 1:1. Após 21 dias, os animais foram sacrificados para a retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37 $^{\circ}$  C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de INF- $\gamma$  por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de INF- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraído o valor basal obtido de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a, b, c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). O \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em tempos diferentes de imunizações (Test t Student). N $^{\circ}$  de animais/grupo = 5



**Figura 8** - Análise da produção de IL-4 por células dos linfonodos inguinais e do baço. *Protocolo I.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados s.c. 90 dias após com 100µg de OVA+ CFA na diluição de 1:1. Após 21 dias os animais foram sacrificados para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de IL-4 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4 no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraído o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a, b, c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N° de animais/grupo = 5



**Figura 9** - Análise da produção de IL-10 por células dos linfonodos inguinais e do baço. *Protocolo I*. Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas (n=5), tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados s.c. 90 dias após com 100µg de OVA+ CFA na diluição de 1:1. Após 21 dias, os animais foram sacrificados para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de IL-10 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-10 no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraído o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a, b, c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). Nº de animais/grupo = 5

#### **4.2 - Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> em tempos distintos após a indução da tolerância oral.**

Segundo Moreau e Gaboriau-Routhiau, a tolerância oral é mantida em animais imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> até 42 dias após tratamento oral com o mesmo antígeno (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996).

Desta forma, nosso próximo objetivo foi avaliar a manutenção da tolerância oral em animais tratados oralmente com OVA e imunizados 7, 30, 90 ou 180 dias depois, utilizando, como adjuvante, o hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub> para verificar se haveria alguma diferença com relação aos dados obtidos com o CFA.

Camundongos BALB/c fêmeas de 8 semanas de idade foram tratados oralmente, por gavagem ou ingestão voluntária, com 20mg de OVA e o grupo controle recebeu salina por gavagem. Após 7, 30, 90 ou 180 dias, esses animais foram imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub>, desafiados com 10µg de OVA 14 dias após essa imunização primária e sangrados 7 após o desafio para análise dos títulos de anticorpos.

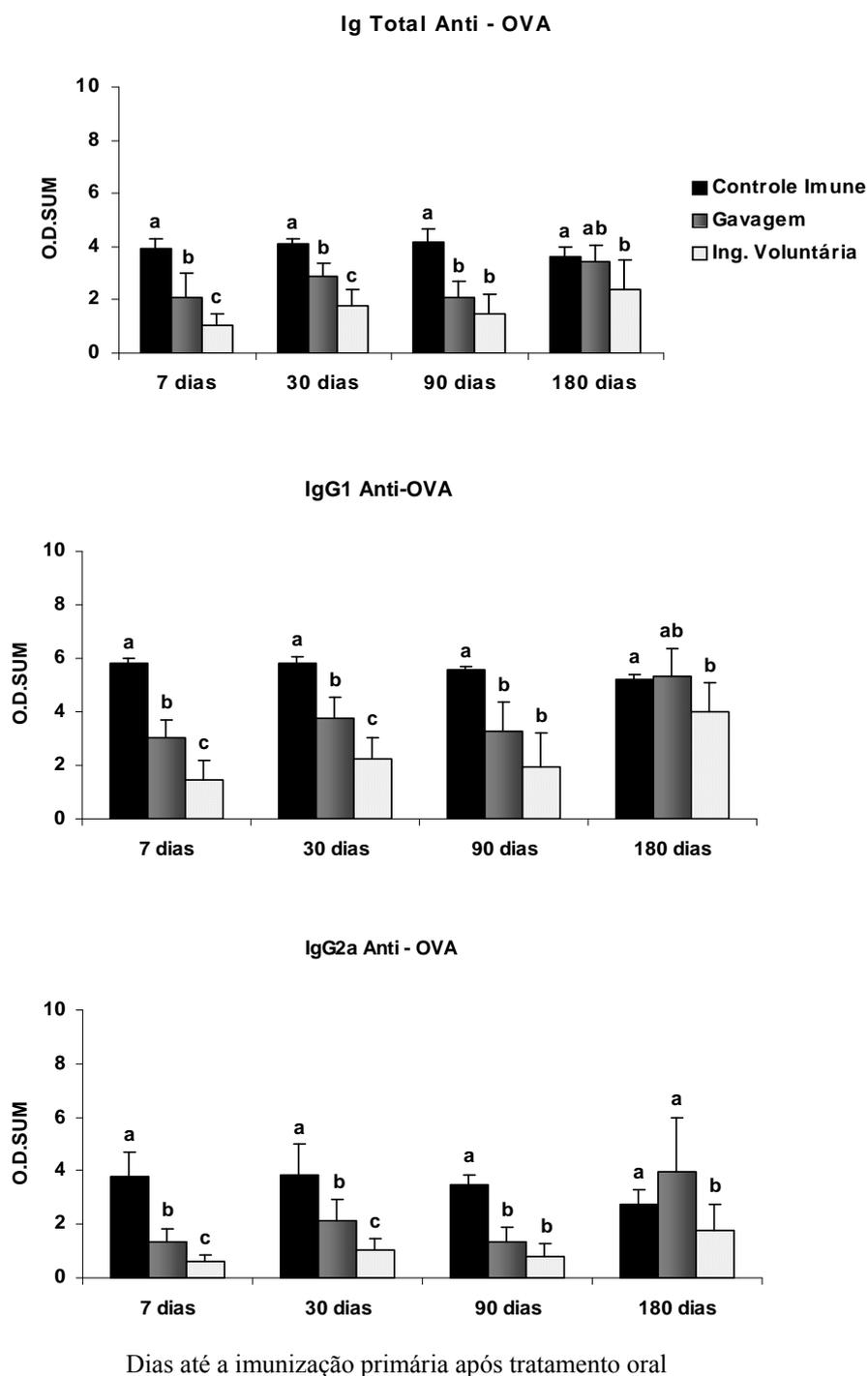
De acordo com a figura 10, os animais tratados oralmente com OVA mantêm a tolerância por até 90 dias após o tratamento oral seja por gavagem ou ingestão voluntária ( $p < 0,05$ ). No entanto, animais tratados por ingestão voluntária foram capazes de se manter tolerantes ( $p < 0,05$ ) por até 180 dias após o tratamento oral, enquanto que aqueles tratados por gavagem com a mesma quantidade de antígeno (20mg de OVA), se mostraram responsivos. Ainda de acordo com a figura 10 observamos uma redução dos níveis de IgG2a pelo grupo controle imune, em animais imunizados 180 comparados ao grupo imunizado 7 dias após tratamento oral, no entanto, não houve alterações significativas nos níveis de IgG1 e Ig total.

Nosso próximo passo foi medir a produção de IL-4, uma citocina Th2 que tem atividade pró-inflamatória quando induzida por Al(OH)<sub>3</sub>, no grupo imunizado 90 dias após o tratamento oral, o qual, de acordo com os parâmetros analisados, se manteve tolerante. De acordo com a figura 11 observamos a manutenção da tolerância oral esteve relacionada a esta citocina tanto para o grupo gavagem como para ingestão voluntária (Fig. 11).

Com relação à produção de INF- $\gamma$ , citocina pró-inflamatória que não é induzida em altos níveis por Al(OH)<sub>3</sub> e que poderia teoricamente atuar nos animais tolerantes como mecanismo de controle da resposta Th2, a supressão foi mantida pelos grupos

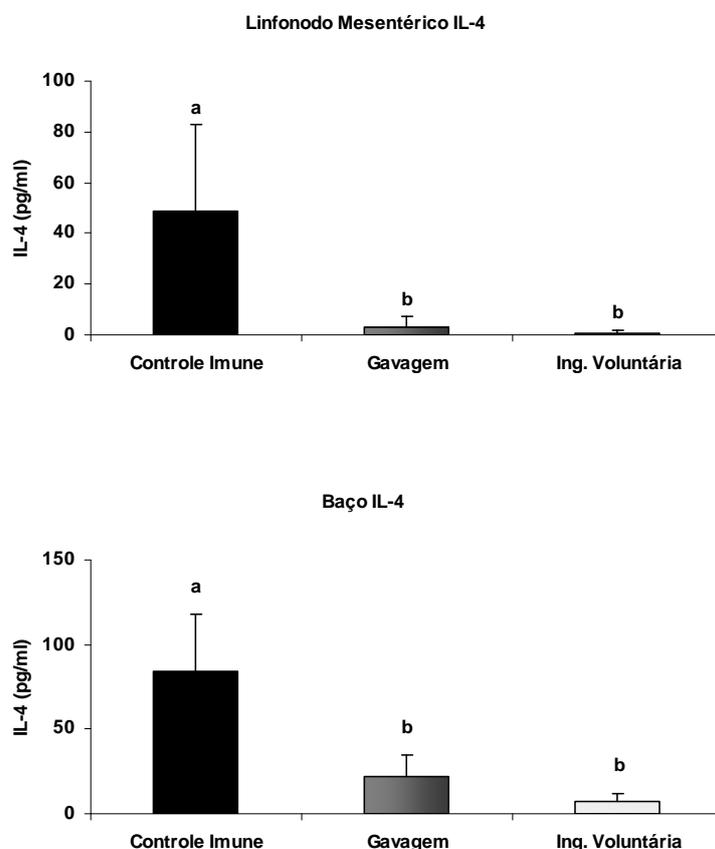
gavagem e ingestão voluntária, em relação ao grupo controle imune, até 90 dias após o tratamento (Fig.12). Há uma redução significativa na concentração de INF- $\gamma$  no grupo controle imune imunizado 90 dias após o tratamento oral em relação ao grupo controle imune imunizado 7 dias após o tratamento oral ( $p < 0,05$ ), sugerindo mais uma vez uma queda da produção dessa citocina durante o processo de envelhecimento. Nesse experimento, só foi possível avaliar a produção de INF- $\gamma$  pelas células do baço. A produção da mesma pelos linfonodos mesentéricos foi muito baixa.

Em seguida avaliamos a produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória, no grupo imunizado 90 dias após o tratamento oral. De acordo com a figura 13, observamos uma supressão de IL-10 pelos grupos gavagem e ingestão voluntária, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre esses dois grupos quando comparados ao controle imune. Esses resultados sugerem que a manutenção ou não da tolerância oral nesses grupos não é devida a IL-10, já que a mesma se mostrou suprimida nos grupos gavagem e ingestão voluntária em relação ao controle imune.



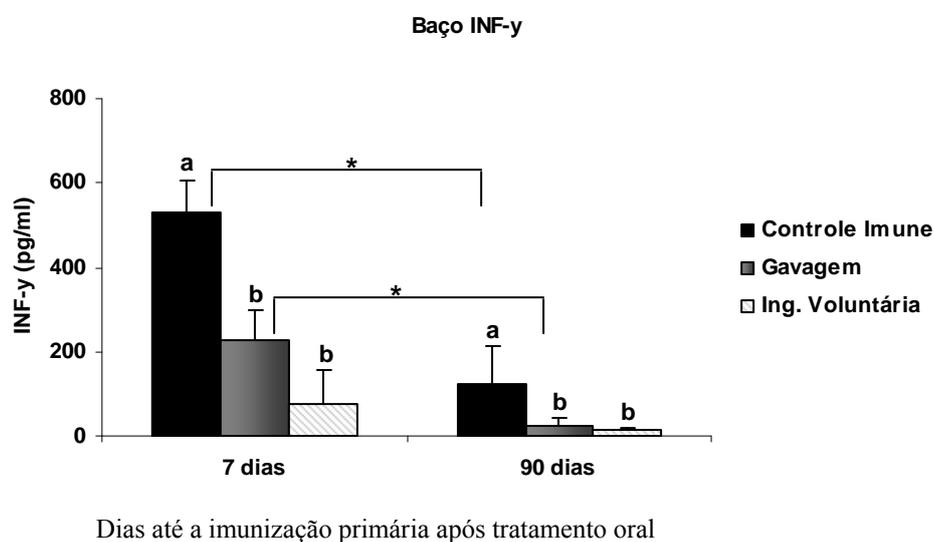
**Figura 10 -** Produção de anticorpos séricos anti-OVA.

*Protocolo II.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 7, 30, 90 ou 180 dias após com 10 $\mu$ g OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina. Os animais receberam um desafio com 10 $\mu$ g OVA 14 dias após a imunização primária e foram sangrados 7 dias após o desafio para verificação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros de cada grupo diluídos a partir de 1:10. As letras a,b,c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos) em um mesmo tempo (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5



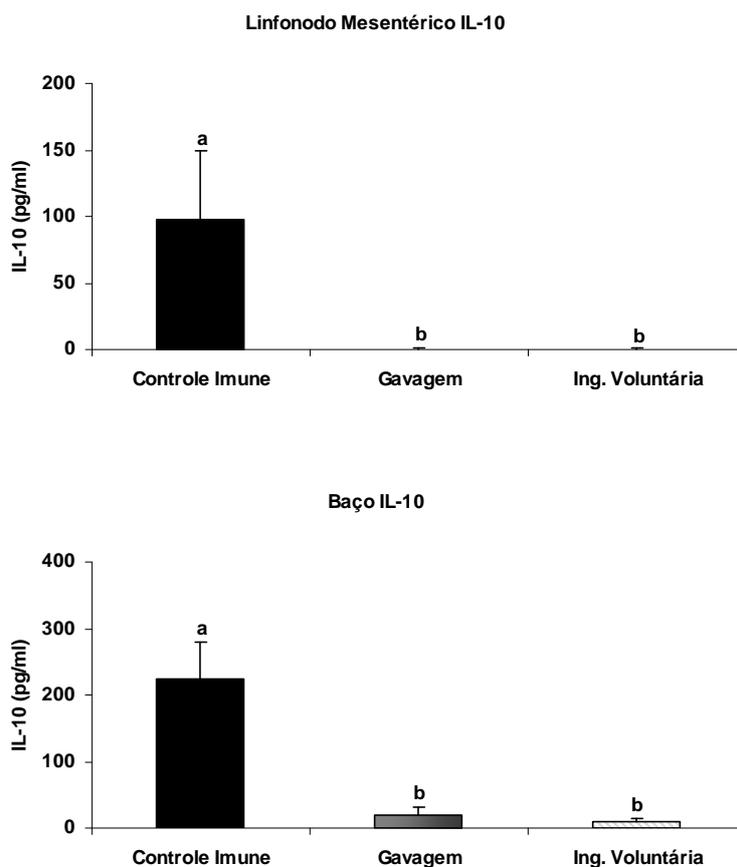
**Figura 11** - Produção de IL-4 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço.

*Protocolo II.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 90 dias após com 100µg de OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10µ de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de IL-4 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4 no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraído o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a, b, c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N° de animais/grupo = 5



**Figura 12** - Produção de INF- $\gamma$  por células do baço.

*Protocolo II.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 7 ou 90 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10 $\mu$  de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de INF- $\gamma$  por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de INF- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraído o valor basal obtido de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a,b,c representam a diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). O \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em tempos diferentes de imunizações (Test t Student). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5



**Figura 13** - Produção de IL-10 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço.

*Protocolo II.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 90 dias após com 100µg de OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10µ de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de IL-10 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-10 no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraída o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a,b,c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N° de animais/grupo = 5

### **4.3 - Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 3 7 dias após indução da tolerância oral.**

Trabalhos realizados pelo nosso grupo mostraram que a tolerância oral é mantida até um ano em animais imunizados 7 dias após o tratamento oral com o antígeno OVA e adjuvante [Al(OH)<sub>3</sub>]. No entanto, nesse trabalho, os animais eram tratados oralmente somente por gavagem (Speziali, E., 1999).

De acordo com os resultados que descrevemos acima, há uma diferença na capacidade de indução e manutenção de tolerância oral devida a três fatores: a) se os grupos são tratados por gavagem ou ingestão voluntária; b) o tipo de adjuvante utilizado na imunização; c) o intervalo entre o tratamento oral e a imunização primária com antígeno + adjuvante. Assim, nosso objetivo foi comparar por quanto tempo a tolerância oral após ingestão voluntária ou gavagem seguida de uma imunização primária (7 dias após tratamento oral) com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> seria mantida.

Camundongos fêmeas BALB/c de 8 semanas foram tratados oralmente, por gavagem ou ingestão voluntária, com 20 mg de OVA e imunizados i.p. com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após. Os animais controle imunes receberam apenas salina por gavagem e foram imunizados após 7 dias. Para a avaliação da manutenção da tolerância oral, os animais receberam um desafio i.p. com 10µg de OVA 14, 30, 90, 180 ou 360 dias após a imunização primária e foram sacrificados 7 dias após o desafio para obtenção do soro. A análise dos níveis de anticorpos Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA, mostram que, em animais tratados oralmente tanto por gavagem quanto por ingestão voluntária e imunizados 7 dias após na presença do adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>, a tolerância é mantida por um ano após o tratamento oral.

De acordo com a figura 14, em todas as medidas de Ig total, IgG1 e IgG2a, a diferença entre o grupo gavagem ou ingestão voluntária em relação ao grupo controle imune foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ). Mais uma vez os animais tratados por ingestão voluntária mostraram uma maior “fixação” da tolerância, quando comparados ao controle imune, do que aqueles tratados por gavagem.

Ao analisarmos os níveis de Ig total e IgG2a anti-OVA, podemos observar um aumento dos mesmos com o passar do tempo. O mesmo não é observado nos níveis de IgG1 que se mantêm constante. No entanto, esse aumento nos níveis de Ig total e IgG2a só é observado no grupo controle imune ( $p < 0,05$ ), nos grupos tolerantes (gavagem e ingestão voluntária) os níveis de anticorpos são mantidos sem diferenças significativas.

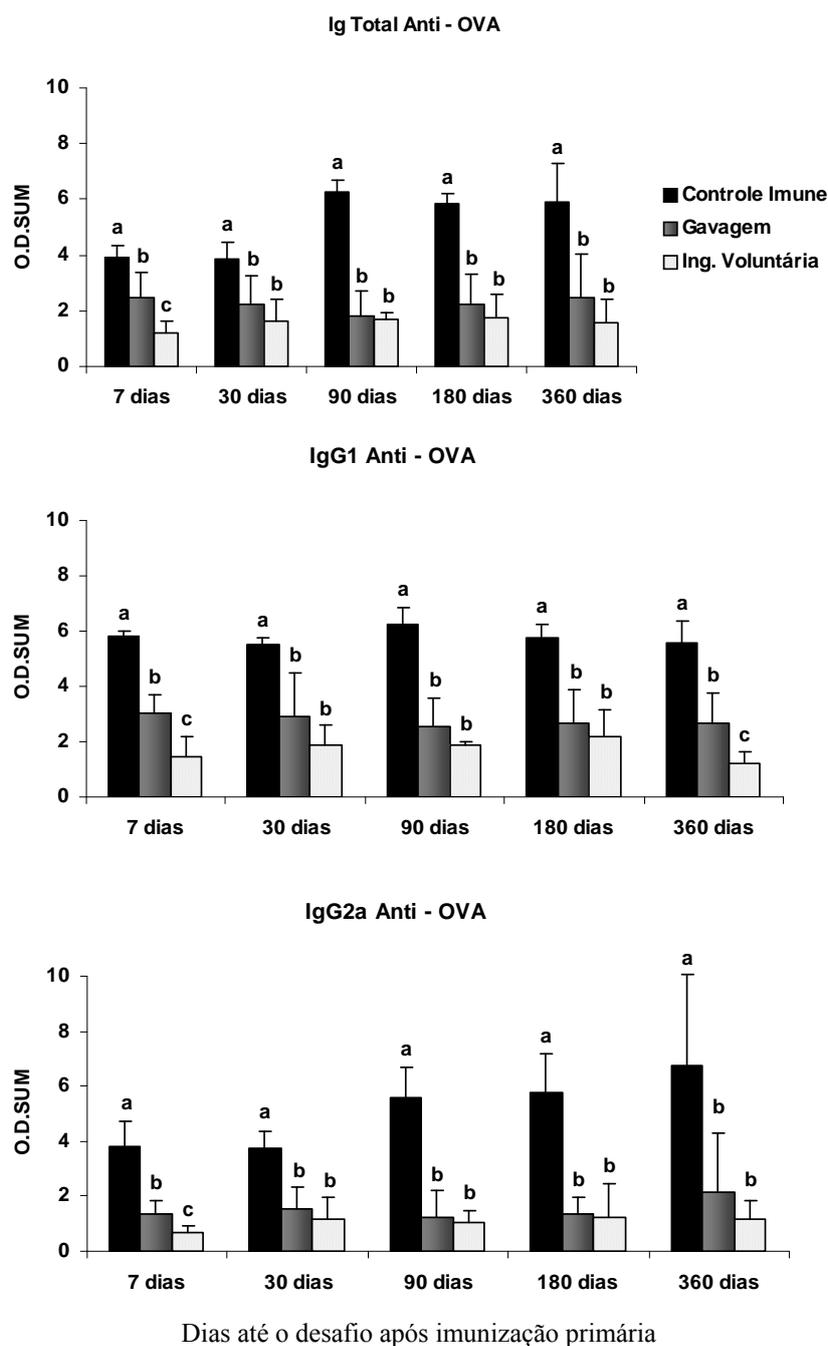
O mesmo é observado em relação à produção de IgG2a, com um aumento evidente do seu nível. Vale notar que, ao fim do estudo, os animais estavam com idade entre 58-60 semanas.

De acordo com esse resultado, fica claro que a supressão da resposta de anticorpos em animais tratados quando jovens e imunizados na presença de adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após é mantida até um ano após o tratamento oral, tanto em animais tratados por gavagem como por ingestão voluntária.

Ao avaliarmos a produção de IL-4, podemos observar uma manutenção da supressão na produção dessa citocina, sendo a diferença dos grupos gavagem e ingestão voluntária significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle imune nos diferentes intervalos de tempo avaliados (Fig.15). O mesmo resultado foi observado para IFN- $\gamma$ , os grupos gavagem e ingestão voluntária se mostram tolerantes quando comparados ao controle imune (Fig. 16).

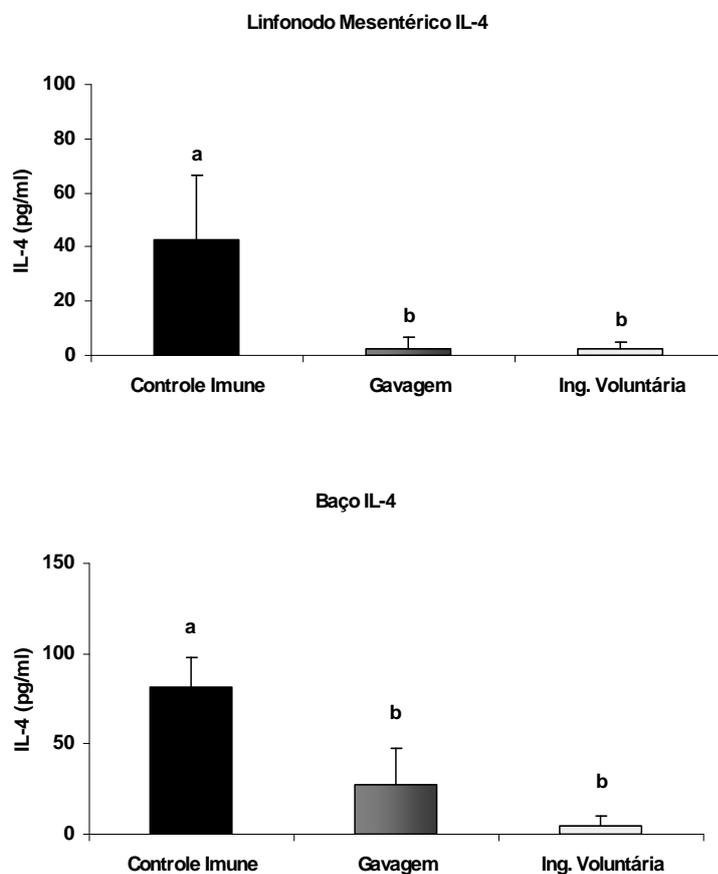
Nosso próximo passo foi medir a produção de e IL-10 para avaliar se a mesma estaria relacionada com a manutenção da tolerância pelo grupo imunizado 90 dias após o tratamento oral, que de acordo com os parâmetros analisados se manteve tolerante. (Fig. 17). Esses resultados sugerem que a manutenção ou não da tolerância oral nesses grupos não é devido à produção de IL-10, já que a mesma se mostrou suprimida nos grupos gavagem e ingestão voluntária em relação ao controle imune.

Portanto, a imunização com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após o tratamento oral prolonga o efeito do tratamento oral, possibilitando a visualização do fenômeno da tolerância oral tanto pela análise de anticorpos séricos quanto pela produção de citocinas como INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 por até um ano após o tratamento oral.



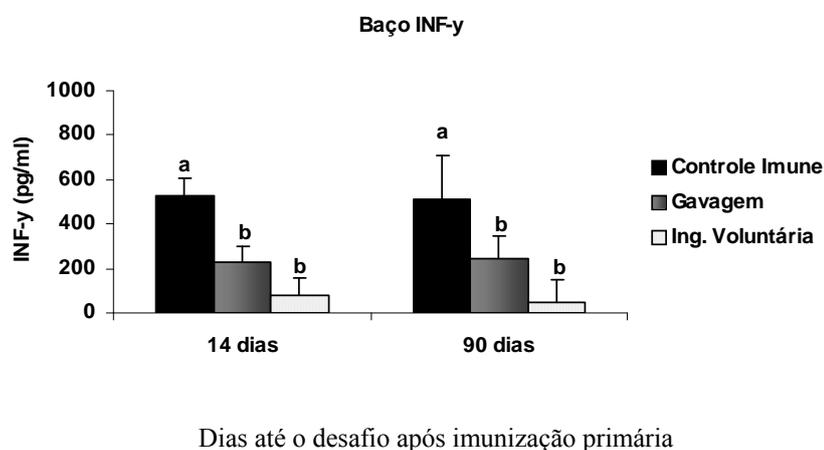
**Figura 14 - Produção de anticorpos séricos anti-OVA.**

*Protocolo III.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou ainda salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 7 dias após com após com 10 $\mu$ g OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina. Os animais receberam um desafio com 10 $\mu$ g OVA 14, 30, 90, 180 ou 360 dias após a imunização primária e foram sangrados 7 dias após o desafio para verificação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros de cada grupo diluídos a partir de 1:10 As letras a,b,c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5



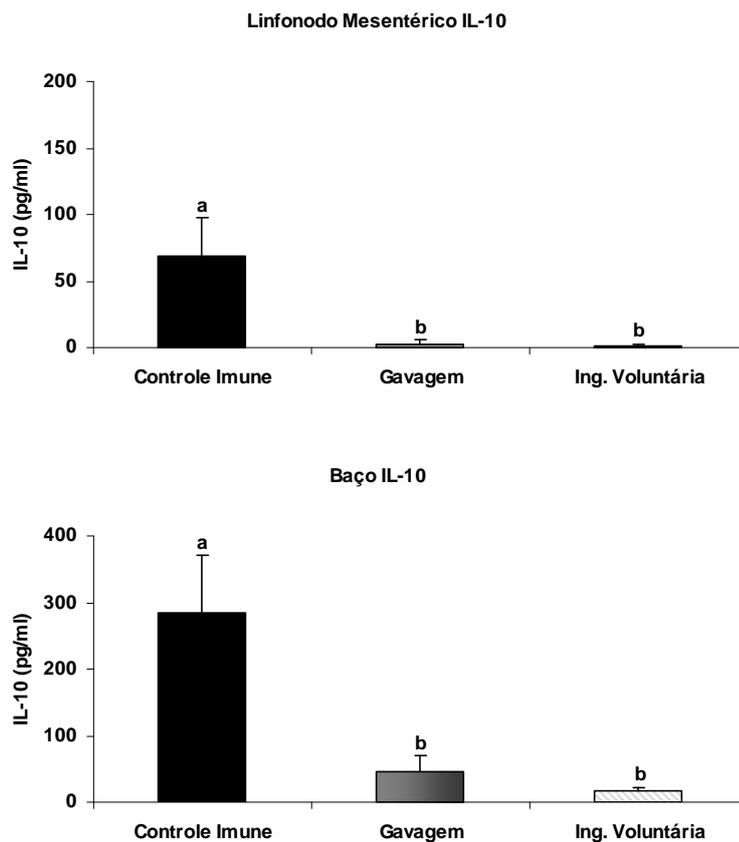
**Figura 15** - Produção de IL-4 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço.

*Protocolo III.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 7 dias após com 100µg de OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Após 90 dias, os animais foram desafiados com 10µ de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de IL-4 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4 no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraída o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a, b, c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N° de animais/grupo = 5



**Figura 16** - Produção de INF- $\gamma$  por células do baço.

*Protocolo III.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou ainda salina por gavagem (grupo controle imune) e após 7 dias imunizados i.p com 10 $\mu$ g de OVA + 3 mg de Al(OH)<sub>3</sub> e desafiados após 14 ou 90 dias com 10 $\mu$ g de OVA. Sete dias após o desafio, os animais foram sacrificados dias para a retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de INF- $\gamma$  por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de INF- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraído o valor basal obtido de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a, b, c representam a diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N° de animais/grupo = 5



**Figura 17** - Produção de IL-10 por células dos linfonodos mesentéricos e do baço.

*Protocolo III.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 7 dias após com 100 $\mu$ g de OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Após 90 dias, os animais foram desafiados com 10 $\mu$  de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida de IL-10 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-10 no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraída o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras a, b, c representam a diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). N° de animais/grupo = 5

#### 4.4 - Avaliação da persistência da tolerância oral em animais tolerantes re-imunizados com OVA + CFA

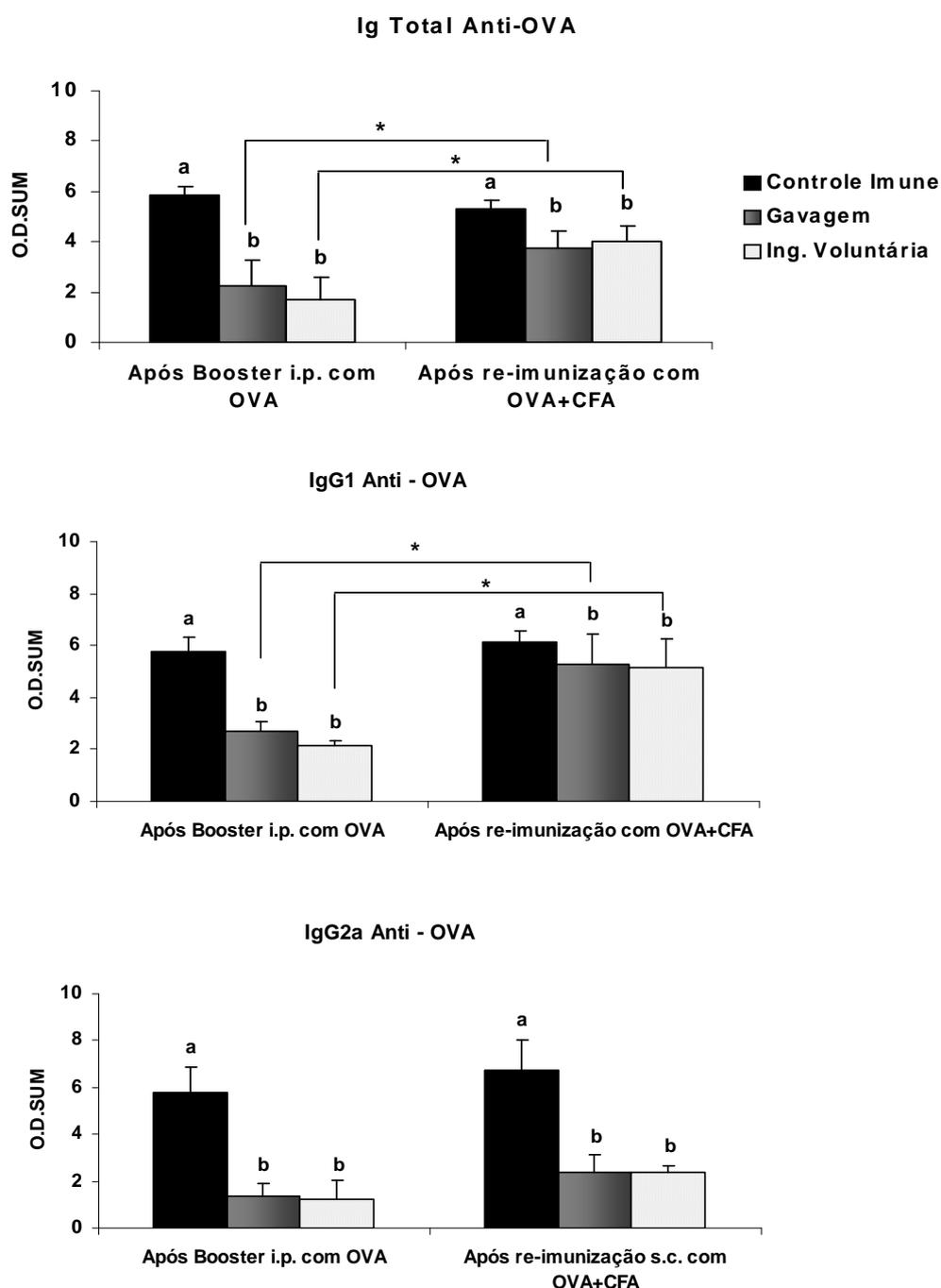
De acordo com nossos resultados mostrados no protocolo I (Fig.6), a tolerância oral só é mantida em animais imunizados com OVA + CFA até 30 dias após o tratamento oral. Por outro lado, quando utilizamos o adjuvante  $\text{Al(OH)}_3$  a tolerância é mantida, apesar de notarmos um aumento gradual nos títulos de anticorpos dos grupos gavagem e ingestão voluntária, até 90 dias após o tratamento oral. A tolerância também é mantida até 360 dias após o tratamento oral (Fig.14), quando os animais foram imunizados, 7 dias após o tratamento oral, com OVA +  $\text{Al(OH)}_3$ .

Assim, nosso próximo objetivo foi avaliar se uma imunização com OVA + CFA poderia “quebrar” a tolerância oral já estabelecida e mantida em animais 180 dias após o tratamento oral + imunização com  $\text{Al(OH)}_3$ .

Camundongos fêmeas BALB/c de 8 semanas foram tratados oralmente, por gavagem ou ingestão voluntária, com 20mg de OVA e imunizados i.p. com OVA +  $\text{Al(OH)}_3$  após 7 dias. Os animais controle imunes receberam apenas salina por gavagem e foram imunizados após 7 dias. Para a avaliação da manutenção da tolerância oral, os animais receberam um desafio i.p. com 10 $\mu\text{g}$  de OVA 180 dias após a imunização primária e foram sangrados 7 dias após o desafio para obtenção do soro pelo plexo orbital. Após a sangria, os animais receberam uma imunização com 100 $\mu\text{g}$  de OVA + CFA na diluição de 1:1 e foram sacrificados após 14 para obtenção do soro e análise dos títulos de anticorpos.

De acordo com os resultados mostrados na figura 18, podemos notar que, mesmo após uma re-imunização com OVA + adjuvante como CFA, os animais continuaram tolerantes mostrando diferenças significativas entre os grupos gavagem e ingestão voluntária em relação ao controle imune ( $p < 0,05$ ).

No entanto, quando comparamos os níveis de Ig total e IgG1 anti-OVA entre os grupos gavagem e ingestão voluntária antes e após a re-imunização com CFA, notamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nesses níveis após a re-imunização com CFA. Já o mesmo não foi observado para os títulos de IgG2a anti-OVA (Fig. 18).



**Figura 18** - Produção de anticorpos séricos anti-OVA.

*Protocolo IV.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 7 dias após com 10 $\mu$ g OVA+Al(OH)<sub>3</sub>, desafiados após 180 com 10  $\mu$ g de OVA e sangrados pelo plexo orbital 14 dias após o desafio para avaliação da manutenção da tolerância. Em seguida da sangria, os animais foram re-imunizados com 100 $\mu$ g de OVA+CFA na diluição de 1:1 e sangrados 14 dias após o desafio para avaliação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos Ig total, IgG1 e IgG2 anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros de cada grupo diluídos a partir de 1:10. As letras a, b, c representam a diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA). O \* representa a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de tempos diferentes de imunizações (Test t Student). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5

#### 4.5 - Avaliação da manutenção da tolerância oral pela ação de células reguladoras

Vários subgrupos de linfócitos T com fenótipo regulador já foram descritos como importantes na indução de imunossupressão via mucosa oral, tais como: Th3, Tr1,  $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$  e  $CD4^+LAP^+$  (Faria e Weiner, 2005). Desta forma, nosso próximo passo foi avaliar o possível papel das células reguladoras na indução e manutenção da tolerância oral. Mais especificamente, analisamos a porcentagem de células T  $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$  e  $CD4^+LAP^+$  no baço e linfonodos mesentéricos e inguinais em alguns dos experimentos, já citados anteriormente, nos quais os animais se mostraram tolerantes.

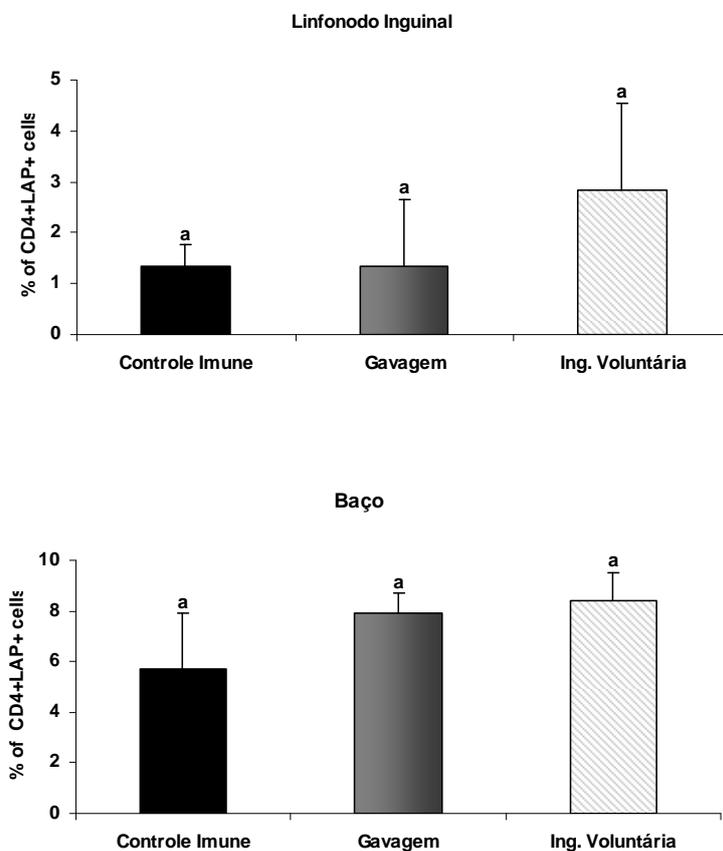
A figura 19 mostra a porcentagem de células  $CD4^+LAP^+$  no baço e linfonodos inguinais de animais imunizados com OVA + CFA 7 dias após o tratamento oral. Os resultados sugerem uma maior porcentagem dessas células no grupo ingestão voluntária, nos linfonodos mesentéricos, ou em ambos, ingestão voluntária e gavagem, no baço. No entanto, tais diferenças não são significativas.

Da mesma forma, a análise da porcentagem de células reguladoras  $CD4^+LAP^+$  em animais imunizados com OVA +  $Al(OH)_3$  7 dias após o tratamento oral sugerem uma maior porcentagem dessas células no baço dos animais do grupo ingestão voluntária. Porém, a diferença entre os grupos não é significativa (Fig. 20).

Em seguida, avaliamos outros subgrupos de células reguladoras, células T  $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$ , mas desta vez em animais que mantiveram o estado de tolerância por até 90 dias após o tratamento oral.

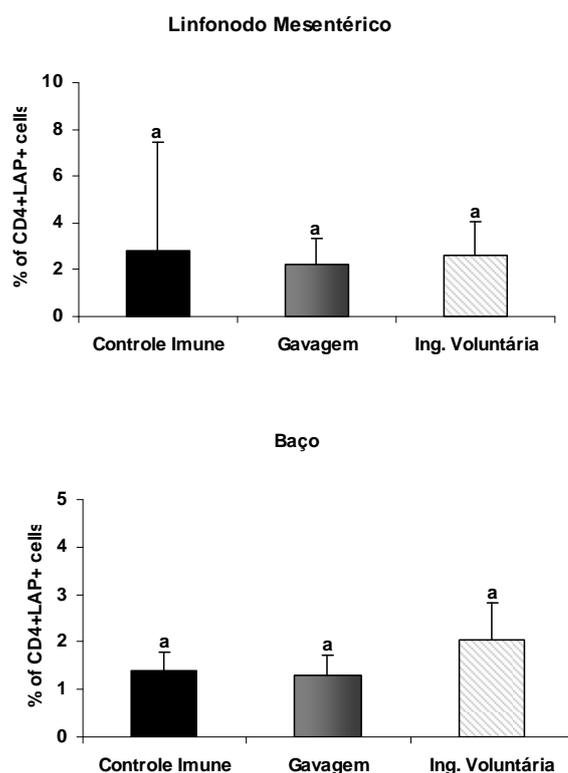
As figuras 21 e 22 mostram a porcentagem de células T  $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$  no baço e linfonodos mesentéricos de animais imunizados com OVA +  $Al(OH)_3$  90 dias após tratamento oral e após a imunização primária, respectivamente. Em ambos os resultados não houve diferença entre os grupos controle imune, gavagem ou ingestão voluntária.

No geral, os resultados sugerem que a manutenção da tolerância nos animais não se deve a presença dessas células reguladoras nos órgãos analisados. No entanto, uma futura investigação mais detalhada não só no baço e linfonodos mesentéricos é necessária para esclarecer o papel das células reguladoras na manutenção da tolerância oral.



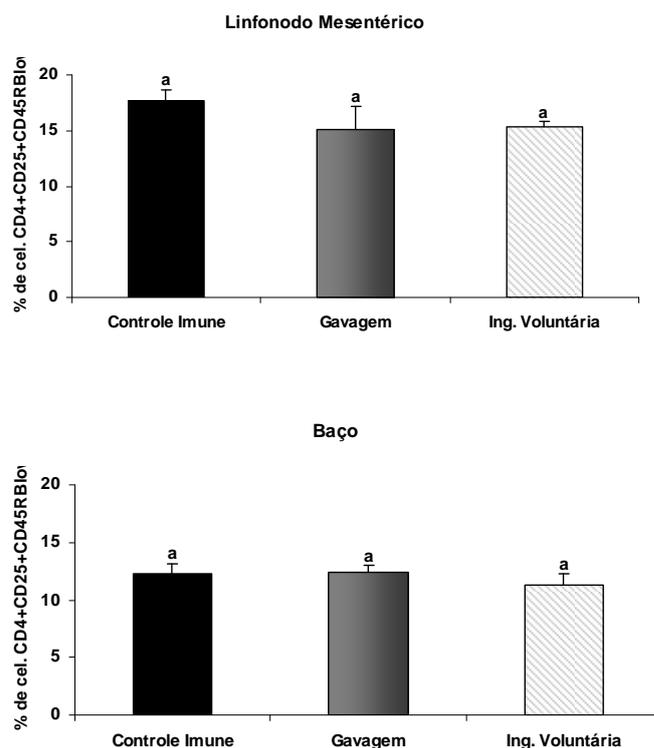
**Figura 19** – Percentual de células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> dos linfonodos inguinais e baço.

*Protocolo I.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados s.c. 7 dias após com 100µg de OVA+ CFA na diluição de 1:1. Após 21 dias, os animais foram sacrificados para retirada dos órgãos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos FITC ou PE+streptavidina e analisados por citometria de fluxo. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células  $\times 10^7$ . As letras a, b e c representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5



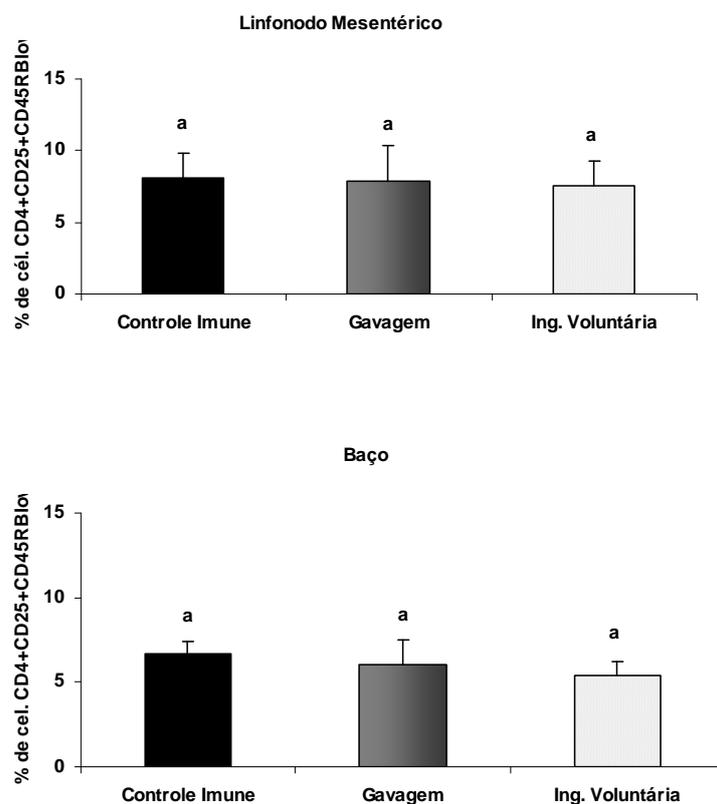
**Figura 20** – Percentual de células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> dos linfonodos mesentéricos e baço.

*Protocolo II.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 7 dias após com 100µg de OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10µ de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos FITC ou PE+streptavidina e analisados por citometria de fluxo. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão da porcentagem de células x10<sup>7</sup>. As letras a, b e c representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5



**Figura 21** – Percentual de células  $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$  dos linfonodos mesentéricos e baço.

*Protocolo II.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 90 dias após com  $100\mu\text{g}$  de OVA+  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Após 14 dias, os animais foram desafiados com  $10\mu$  de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células  $\times 10^7$ . As letras a, b e c representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA).  $N^{\circ}$  de animais/grupo = 5



**Figura 22** – Percentual de células  $CD4^+CD25^+CD45RB^{low}$  dos linfonodos mesentéricos e baço.

*Protocolo III.* Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária ou salina por gavagem (grupo controle imune) e imunizados i.p. 90 dias após com 100 $\mu$ g de OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10 $\mu$  de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos CY, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células  $\times 10^7$ . As letras a, b e c representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5

## **5 - DISCUSSÃO**

Vários trabalhos já discutiram a questão da manutenção da tolerância obtendo resultados contraditórios. Esses trabalhos, no entanto, utilizaram diferentes protocolos experimentais (Strobel & Ferguson, 1987, Melamed e Friedman, 1993, Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996, Faria, 1998a). Por essa razão, o objetivo do nosso trabalho foi estudar a manutenção da tolerância oral comparando os diferentes protocolos experimentais não simplesmente como maneiras de revelar a tolerância induzida mas como fatores efetivos que influenciariam a tolerância resultante ou sua duração. Para tal, utilizamos animais tratados oralmente com OVA por gavagem ou ingestão voluntária e imunizados com os dois adjuvantes mais utilizados experimentalmente, Al(OH)<sub>3</sub> e CFA, em diferentes tempos.

Strobel & Ferguson mostraram que a supressão da produção de imunoglobulinas na tolerância é mantida por até 3 meses após o tratamento oral. Neste trabalho, os animais foram tratados oralmente com OVA por gavagem e imunizados com OVA + CFA em tempos variados chegando até 17 meses após o tratamento oral (Strobel & Ferguson, 1987). Melamed & Friedman, no entanto, mostraram através da medida da resposta proliferativa, que a tolerância é perdida gradualmente quando os animais são imunizados (com OVA + CFA) a partir de 21 dias após o tratamento oral com o antígeno (Melamed & Friedman, 1993). Nossos resultados utilizando animais tratados oralmente (com OVA) e imunizados com OVA + CFA após 3 meses e mostrando que estes já não se encontram mais tolerantes (Fig.6) estão de acordo com Melamed & Friedman e contrariam os resultados de Strobel & Ferguson. Tais resultados foram mostrados tanto pela produção de imunoglobulinas Ig total, IgG1 e IgG2a (Fig.6), como pela produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (Fig. 7, 8 e 9).

De acordo com Moreau e Gaboriau-Routhiau, animais tratados oralmente com OVA e imunizados 60 dias após esse tratamento com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> se mostram tolerantes pela medida de imunoglobulinas IgG. No entanto, 60 dias foi o intervalo de tempo máximo estudado nesse trabalho (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996). Nossos resultados confirmam e estendem os de Moreau e Gaboriau-Routhiau. Em nosso estudo, as imunizações com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> foram feitas até 180 dias após o tratamento oral com antígeno. Nossos dados mostram que a tolerância é mantida por até 180 dias após o tratamento oral em animais tratados por ingestão voluntária e por até 90 dias em animais tratados por gavagem. Mais uma vez, esse resultado pode ser observado pela produção de imunoglobulinas Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA (Fig.10), assim como pela produção das citocinas IL-14, INF-  $\gamma$  e IL-10 (Fig. 11, 12 e 13).

Desta forma, nossos dados sugerem que dois fatores interferem no tempo de manutenção da tolerância oral: o adjuvante utilizado e o regime de administração oral do antígeno (gavagem x ingestão voluntária).

Aparentemente ocorre uma “quebra” do estado de tolerância quando se imuniza os animais com CFA, já que aqueles tratados da mesma forma, porém imunizados com Al(OH)<sub>3</sub>, se mantêm tolerantes por mais tempo. Uma possível explicação para esses resultados seria que o CFA, por ser um adjuvante que leva a um sinal inflamatório muito potente, poderia se sobrepor ou “quebrar” a ação de células reguladoras. (Tadokoro e cols., 2006). Segundo Guéry e cols., a atividade de apresentação de antígeno é mais alta em APCs de animais imunizados com antígenos em IFA do que em CFA e uma possível explicação para isso seria a competição dos peptídeos da *Micobacterium tuberculosis* com os peptídeos do antígeno durante a apresentação de antígenos. Alternativamente, componentes do CFA, como as proteínas de choque térmico (HSP) do *Micobacterium tuberculosis*, estimulam a uma maior secreção local de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , o qual diminuiu a captação e processamento de antígenos por DCs humanas *in vitro*. No entanto a ativação celular não é afetada, talvez a alta produção de IL-2 e INF- $\gamma$ , induzida por CFA pode compensar esta capacidade reduzida de apresentação de antígeno pelas DCs (Guéry, Ria e Adorini, 1996). Talvez essa seja uma das explicações para a manutenção precária da tolerância quando os animais são imunizados com antígeno em CFA, contrariando o que ocorre quando se imuniza com Al(OH)<sub>3</sub>.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostram que a tolerância é mantida por até um ano e meio em animais tratados oralmente com OVA e imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após esse tratamento (Speziali, 1999). Um resultado semelhante foi mostrado por Melamed & Friedman pela medida da supressão da resposta proliferativa de linfócitos de linfonodos poplíteos de camundongos tratados por via oral com OVA e imunizados após 7 dias com OVA + CFA, quando os mesmos mantiveram-se tolerantes por todo o período estudado (47 dias). Nossos resultados confirmam os dois anteriormente citados, mostrando que a tolerância é mantida por até um ano em animais imunizados 7 dias após o tratamento oral (Fig. 14, 15, 16 e 17). Assim, fica claro que não só o tipo de adjuvante é capaz de interferir na manutenção da tolerância, mas também o intervalo de tempo entre o tratamento oral e a imunização primária.

De acordo com Melamed & Friedman, um fator importante para a manutenção da tolerância oral é a exposição contínua ao antígeno. No entanto, os adjuvantes não só

prolongam o tempo de exposição do antígeno, mas também são agentes com ação inflamatória que potenciam a ativação e proliferação de linfócitos T reativos. É provável que os circuitos de células ativadas durante o processo de tolerização sejam expandidos pela ação inflamatória do adjuvante auxiliando na manutenção da memória dessa ativação. Durante a imunização, ocorre a expansão das células reguladoras que limitam a expansão dos clones de células T efetoras estimuladas (Almeida e cols., 2006). Essa “indexação” das células Tregs à dinâmica de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores pode explicar porque a imunização utilizando adjuvantes pode ser um reforço de mecanismos tolerogênicos induzidos pela administração oral de antígenos como na tolerância oral.

Em seguida, decidimos avaliar se a imunização com antígeno em CFA 180 dias após o tratamento oral era capaz de “quebrar” a tolerância em animais que foram tratados oralmente com OVA e imunizados após 7 dias com OVA + Al(OH)<sub>3</sub>. Pela sangria do plexo retro-orbital antes da imunização com CFA, confirmamos a manutenção da tolerância nesses animais. Em seguida, os mesmos foram imunizados com OVA + CFA e, após 14 dias, foi realizada a sangria para obtenção dos soros. Os resultados mostraram que, mesmo após a re-imunização com CFA, os animais mantiveram-se tolerantes. Apesar disto, os níveis de Ig total e IgG1 se mostraram mais altos após a re-imunização. Examinando o aumento nos níveis de Ig, percebemos que o aumento de Ig se deve provavelmente ao aumento de IgG1 (Fig.18). Uma possível explicação para o aumento dos níveis de IgG1 seria a indução, pelo CFA, de IgG1 do tipo não anafilática. A diferença entre os dois tipos de IgG1 é que o tipo anafilática tem capacidade de induzir degranulação de mastócitos e é dependente de IL-4 enquanto a não-anafilática é dependente de IL-12 e/ou INF- $\gamma$  e não é capaz de induzir degranulação de mastócitos (Faquim-Mauro, e cols., 2000). Assim, após a re-imunização, essa subclasse de IgG1 se somaria à IgG1 tipo anafilática que é normalmente induzida pelo adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> (Faquim-Mauro, e cols., 2000). Esse resultado sugere que, depois de estabelecidos os circuitos moleculares e celulares responsáveis pela tolerância, nem mesmo a ativação celular intensa promovida por um adjuvante potente como o CFA é capaz de rompê-los.

Outro fator importante que influenciou a manutenção da tolerância foi o modo de administração oral do antígeno. Em geral, os grupos tratados por ingestão voluntária foram mais capazes de “fixar” a tolerância do que aqueles tratados por gavagem. Além disto, todos os experimentos realizados mostraram uma maior supressão da resposta

imune pelos animais tratados por ingestão voluntária. Vários trabalhos, alguns do nosso laboratório, relatam resultados semelhantes ao nosso, nos quais a administração oral do antígeno por ingestão voluntária se mostra mais eficiente do que por gavagem (Peng e cols., 1989, Faria e cols., 1992, Faria e cols., 2002). A ingestão voluntária é um processo no qual há uma maior frequência do contato do antígeno com o intestino, sendo um processo semelhante ao que ocorre na alimentação diária. De acordo com Faria e cols., a diferença encontrada nos dois modos de administração oral do antígeno pode ser devida ao modo com que o antígeno é processado e apresentado por APCs da mucosa. Quando uma alta dose de antígeno protéico alcança de uma vez (*in bolus*) o tecido linfóide associado à mucosa intestinal, provavelmente todas as APCs são recrutadas para processar e apresentar o antígeno, enquanto que, quando a mesma quantidade de antígeno protéico é gradualmente administrada em pequenas doses, apenas as APCs mais eficientes (DCs) são mobilizadas. Essa apresentação diferenciada pode levar a diferentes formas de ativação de células T, resultando num perfil de produção de citocinas distinto. Alternativamente, os dois modos de tratamento oral podem levar a diferentes graus de digestão luminal do antígeno. Na ingestão voluntária, o antígeno é administrado em doses pequenas e contínuas, o que levaria a uma maior exposição às enzimas digestivas presentes no lúmen intestinal; por gavagem, essa exposição seria menor, já que o antígeno chega ao lúmen em grande quantidade de uma só vez. O resultado desse maior processamento luminal do antígeno pode ser um maior número de epitopos expostos e um menor requerimento do processamento do mesmo por APCs no intestino com conseqüentes diferenças na resposta de células T (Faria e cols., 1998b).

Na década de 90, vários trabalhos postulavam que a atividade reguladora de células T CD4<sup>+</sup> estaria associada à produção de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, que induziriam a supressão de citocinas Th1 como IL-2 e INF- $\gamma$  (Melamed e cols., 1996). Esse fenômeno foi denominado inicialmente de “desvio imune” como um mecanismo para a supressão. No entanto, a supressão mediada pela tolerância oral é também efetiva em reações inflamatórias mediadas por células Th2, indicando que ambos os tipos de reatividade, Th1 e Th2, são suprimidos na tolerância oral (Vaz e cols., 1977; Ngan & Kind, 1978; Mowat, Strobel, Drummond & Ferguson, 1982; Afuwape, Turner & Strobel, 2004).

A IL-10 é uma citocina que tem sido descrita ter potente propriedade imunossupressiva. Essa citocina é produzida por uma grande variedade de células, sendo a principal citocina produzida pelas células T CD4<sup>+</sup> reguladoras Tr1 (Faria e Weiner,

2005). A IL-4, quando numa resposta Th1, tem atividade reguladora, antiinflamatória (Weiner, Gonnella, Slavin e Maron, 1998), no entanto, quando induzida por Al(OH)<sub>3</sub> e produzida em altos níveis, é uma citocina pró-inflamatória que regula positivamente a produção de IgG1 anafilática e IgE mas negativamente a produção de INF- $\gamma$  (Faquim-Mauro, 1999). Segundo Rizzo e cols., IL-10 e IL-4 são essenciais para a indução da tolerância oral e ocorre um sinergismo na ação das duas citocinas durante o processo tolerogênico. Nesse processo, cada citocina atua em um estágio diferente, a IL-4 atua no estágio indutor, estimulando o crescimento das células reguladoras induzidas durante a tolerância, enquanto a IL-10 atua no estágio efetor, suprimindo os efeitos inflamatórios (Rizzo e cols., 1999). No entanto, o papel da IL-4 na tolerância oral é questionado uma vez que mesma pode ser induzida, tanto a altas como a baixas doses de antígeno, em camundongos deficientes de IL-4 e em camundongos tratados com anticorpos anti-IL-4 (Faria e Weiner, 2006). A participação de IL-10 na supressão induzida pela tolerância oral também é polêmica. Aroeira e cols. mostraram claramente que a ausência de IL-10, induzida pelo tratamento *in vivo* de camundongos com anticorpos anti-IL-10 durante o tratamento oral, não interfere na indução de tolerância oral (Aroeira e cols., 1995). Esses dados sugerem que, mesmo que haja participação da IL-10 no processo, sua presença não é essencial. Mais recentemente, Vieira e cols. mostraram que a capacidade reguladora de Tregs produtora de IL-10 *in vitro* é independente de sua produção intrínseca de IL-10 sendo contato dependente, e é superada por adição de IL-2 exógena (Vieira e cols., 2004).

Assim, avaliamos a produção de IL-4 e IL-10 nos animais que receberam imunização primária ou secundária 90 dias após o tratamento oral, período em que um dos grupos já não estavam mais tolerantes. De acordo com nossos resultados, não houve diferenças entre os grupos que foram imunizados com Al(OH)<sub>3</sub>, independentemente do tempo entre tratamento oral e imunização primária (Fig. 11, 13, 15 e 17). Os dois experimentos mostraram uma supressão de ambas as citocinas nos grupos gavagem e ingestão voluntária em relação ao grupo controle imune. Esse resultado confirma dois tipos de relatos anteriores: a) ocorre a supressão da resposta Th2 na tolerância oral; b) IL-10 não parece participar como citocina supressora no processo. Com relação ao grupo imunizado com antígeno em CFA, embora haja uma baixa produção de ambas as citocinas, não houve diferença entre os grupos gavagem e ingestão voluntária em relação ao grupo controle. Como Al(OH)<sub>3</sub> é um adjuvante do tipo Th2, isso explicaria a

maior produção de IL-4 e IL-10 pelos grupos de animais que foram imunizados com este adjuvante.

Um dos possíveis mecanismos explicativos para a indução da tolerância oral é a ação de células reguladoras, Tregs, amplamente estudada nos últimos anos. As células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> naturais são geradas durante a diferenciação tímica, elas representam 10% das células T CD4<sup>+</sup> periféricas de um animal adulto e são fundamentais para a manutenção da tolerância aos auto-componentes. Essas células são anérgicas e, portanto, não proliferam bem e não secretam IL-2. Seu mecanismo de ação envolve o contato celular mais que a secreção de citocinas antiinflamatórias embora elas sejam dependentes, para sua sobrevivência e expansão, da IL-2 produzidas por outros linfócitos T (Sakaguchi, 2004).

Vários estudos mostraram que existe uma expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e tecidos periféricos linfóides de camundongos tratados oralmente com antígenos (Chung e cols., 2005). Zhang e cols. mostraram que a administração de antígeno através da mucosa oral pode ser um método *in vivo* efetivo para ativação de células T CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> reguladoras. Os autores demonstraram ainda que as citocinas TGF-β e IL-10 parecem ter um papel parcial nas propriedades supressivas das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras *in vitro* (Zhang e cols., 2001).

Vários subgrupos de linfócitos T com fenótipo regulador já foram descritos como importantes na indução de imunossupressão via mucosa oral, tais como: Th3, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Faria e Weiner, 2005). Os principais marcadores para células reguladoras são a cadeia α do receptor de interleucina 2 (IL-2R) e Foxp3 (fator de transcrição *forkhead box p3*). No entanto, outros marcadores como CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* ou CD152) e GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) já foram descritos (Sakaguchi e Powrie, 2007). O TGF-β de membrana, geralmente na forma latente associada a LAP (*latent associated peptide*), está presente em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de animais normais. Todas as células T que expressam LAP na sua superfície são células Tregs dependentes de TGF-β (Oida e cols., 2003). O CD45RB é uma fosfatase expressa em altos níveis na superfície de linfócitos virgens. A expressão de CD45RB diminui após a ativação dos linfócitos T sendo que células CD45RB<sup>low</sup> são tidas como células de memória, mas alguns trabalhos mostram que estas células também possuem propriedades reguladoras (Lee & Vitetta, 1990, Sun e cols., 1999, Read e cols., 1998).

Alguns trabalhos mostram que essa subpopulação de Tregs é indispensável para o controle de colite experimental (Powrie e cols., 1993, Ayanakian e cols., 2003)

De acordo com nossos resultados, tanto na população de células reguladoras CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> como na população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>, não houve diferença entre os grupos tolerantes (gavagem e ingestão voluntária) em relação ao grupo controle imune (Fig. 19 a 22). Esse resultado pode ser observado tanto no baço como nos linfonodos mesentéricos. Esperávamos que houvesse uma maior porcentagem de células reguladoras nos grupos gavagem e ingestão voluntária já que, segundo trabalhos de Mucida e cols., a exposição oral do antígeno desencadeia a geração de Tregs antígeno-específicas periféricas do tipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> (Mucida e cols., 2005). Talvez tenha sido difícil visualizar essas populações de células reguladoras em nosso trabalho porque utilizamos camundongos normais e a maioria dos trabalhos que avaliam a geração de Tregs na tolerância oral utilizam camundongos transgênicos para o TCR específico para OVA (DO11.10) e para a imunoglobulina na membrana das células B (que reage com hemaglutinina – HA). Esse procedimento facilita a visualização de linfócitos específicos e, aparentemente, nesses animais estudados, as Treg são anti-OVA. (Curotto de Lafaile e cols., 2004).

O envelhecimento é um processo que se inicia ao nascimento e é acompanhado por várias alterações fisiológicas ao longo de toda a vida. A senescência é o momento em que essas alterações se acumulam e se acentuam produzindo um conjunto de alterações imunológicas mensuráveis que compõem o fenômeno da imuno-senescência. Tais modificações do sistema imune detectáveis na senescência são geralmente vistas como uma deterioração ou declínio da atividade imunológica. No entanto, a imuno-senescência é um processo complexo que envolve muito mais um remodelamento do sistema imune onde múltiplos mecanismos de compensação passam a operar do que um simples declínio unidirecional geral das funções imunológicas (Listi e cols., 2006).

Dentre as alterações da imunosenescência, estão as mudanças nos níveis e funções das imunoglobulinas. Estudos experimentais em camundongos idosos demonstraram que há mudanças significativas na seleção do repertório, maturação de afinidade e função de imunoglobulinas (Song, Price, Cerny, 1997). Outros trabalhos mostraram uma produção reduzida de imunoglobulinas em animais idosos quando comparados aos jovens (Faria e cols., 1998b). No entanto, segundo alguns trabalhos, nem os níveis de imunoglobulinas do soro e nem o número de linfócitos B está reduzido na senescência. Outros relatam que a concentração de imunoglobulinas no soro assim como o número

de linfócitos B que secretam imunoglobulinas estão, na verdade, aumentados (LeMaoult, Szabo, Weksler, 1997). Um trabalho recente de Listi e cols., mostrou, em humanos, que o nível de imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2a estão aumentados no idoso, enquanto que os níveis de IgD e IgM estão reduzidos (Listi e cols., 2006).

Desta forma, outro parâmetro avaliado em nosso trabalho foi a alteração da resposta imune durante o envelhecimento e a senescência. A produção de imunoglobulinas Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA foi medida em animais de 8 a 60 semanas de idade, ou seja, durante toda a fase adulta (envelhecimento).

De acordo com o resultado da figura 6 (protocolo I), podemos avaliar, pelo grupo controle imune que não teve contato oral prévio com o antígeno, que houve um aumento, ao longo do tempo, na capacidade de produção de Ig total, IgG1 e IgG2a anti-OVA ( $p < 0,05$ ). Esse resultado está de acordo com os de Listi e cols. No entanto, quando avaliamos os resultados do protocolo II, no qual a única diferença em relação ao protocolo I foi o adjuvante usado ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), notamos uma redução nessa mesma capacidade de produção de IgG2a anti-OVA ( $p < 0,05$ ). Esse resultado contrasta com os obtidos no protocolo I (Fig. 6) assim como com aqueles obtidos por Listi e cols. Como a única diferença entre os protocolos I e II é o tipo de adjuvante utilizado, nossos dados sugerem que pode haver uma diferença na magnitude da resposta imune com o envelhecimento dependendo do tipo de adjuvante utilizado, seja CFA ou  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Quando analisamos os resultados do protocolo III (Fig. 14), no qual os animais foram imunizados com OVA +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  7 dias após o tratamento oral e desafiados em tempos posteriores, notamos um resultado interessante: os níveis de IgG1 anti-OVA foram mantidos nos grupos controle imunes até mesmo 360 dias após a imunização primária. No entanto, houve um aumento nos níveis de Ig total e IgG2a ao longo do tempo estudado ( $p < 0,05$ ) (Fig. 14). Esse resultado está de acordo com os obtidos por Faria e cols. mostrando que a imunização dos animais quando jovens é capaz não somente de fixar a tolerância oral nos grupos tratados com OVA por via oral, mas também de manter a produção de IgG anti-OVA em altos níveis no grupo controle imune durante um período muito longo (1 ano) (Farai e cols., 1998b). Segundo revisado por Gupta, a maior vantagem de usar  $\text{Al}(\text{OH})_3$  como adjuvante é o rápido desenvolvimento de altos títulos de imunoglobulinas e a resposta de longa duração de imunoglobulinas após uma imunização primária (Gupta, 1998). Talvez seja esta a razão pela qual no protocolo II, no qual  $\text{Al}(\text{OH})_3$  também foi o adjuvante utilizado, porém sem imunização primária

quando jovem, houve um decréscimo na resposta de imunoglobulinas (Fig.10), contrastando com o resultado obtido no protocolo III (Fig.14).

Outra atividade imunológica progressivamente afetada durante o envelhecimento é a produção de citocinas. Tanto em camundongos como em humanos idosos, o padrão de citocinas está significativamente alterado em relação aos jovens, com redução de IL-2, IL-3 e GM-CSF e aumento de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Faria e cols., 1998b). No caso do INF- $\gamma$ , uma citocina pró-inflamatória muito utilizada como parâmetro para avaliação da tolerância oral, há relatos de que essa citocina pode estar inalterada, diminuída ou aumentada na senescência (Faria e cols., 1998 b, Kang e cols., 2004). Em nosso trabalho, avaliamos a produção de INF- $\gamma$  em dois momentos sendo um deles nos grupos imunizados 7 dias após o tratamento oral e o outro nos grupos que receberam imunização primária ou secundária 90 dias após o tratamento oral. No primeiro experimento avaliado (protocolo I, fig. 1), observamos uma redução na produção de INF- $\gamma$  nos animais imunizados 90 dias após o tratamento oral em relação ao grupo imunizado 7 dias após o tratamento oral (Fig. 7). O mesmo resultado foi observado pelo protocolo II (Fig.12), no qual a única diferença em relação ao protocolo I é a utilização de Al(OH)<sub>3</sub> como adjuvante no lugar de CFA. Ambos os resultados mostraram uma redução na produção de INF- $\gamma$  em animais com 20 semanas quando comparados aos animais de 8 semanas. No entanto, quando avaliamos a produção de INF- $\gamma$  no protocolo III, o qual os animais haviam recebido uma imunização primária quando jovens (8 semanas de idade), o nível da produção de INF- $\gamma$  foi mantido (Fig. 16).

Desta forma, assim como para a produção de imunoglobulinas, um contato prévio com antígeno em adjuvante parece ser importante para a manutenção de altos níveis tanto de imunoglobulinas como de citocinas. Talvez, essa manutenção dos níveis de INF- $\gamma$ , uma citocina pró-inflamatória induzida por imunização com CFA, possa estar diretamente relacionada com a manutenção da tolerância oral. O mesmo é esperado para IL-4, também uma citocina pró-inflamatória quando induzida pela imunização com Al(OH)<sub>3</sub>, no entanto não avaliamos neste trabalho a produção da mesma por animais jovens. Ambas citocinas são pró-inflamatórias e são induzidas após imunização, no entanto o tipo de adjuvante utilizado é que direciona uma maior produção de IL-12 e/ou INF- $\gamma$  (CFA) ou IL-4 (Al(OH)<sub>3</sub>).

Assim, podemos sugerir que há uma manutenção paralela da tolerância oral e da inflamação por um estímulo inflamatório que induz células efetoras que, por sua vez, recrutam células reguladoras, mantendo assim uma “indexação” de células efetoras e

reguladoras. Essa sugestão é feita com base nos nossos resultados, onde observamos que animais com níveis reduzidos de INF- $\gamma$  90 dias após o tratamento oral (Fig. 7) não estavam mais tolerantes, ou mostram uma perda gradual da mesma (Fig. 12).

## **6- CONCLUSÃO**

1 - Vários fatores interferem na manutenção da tolerância oral, dentre eles:

- O tipo de adjuvante utilizado na imunização, CFA ou Al(OH)<sub>3</sub>;
- O intervalo entre o tratamento oral e a imunização primária;
- O tipo de regime utilizado no tratamento oral (gavagem ou ingestão voluntária).

2 – A imunização com adjuvantes é importante para a manutenção da tolerância oral.

3 - A imunização com adjuvantes pode estar ligada à manutenção tanto da reatividade inflamatória como também da tolerância, o que sugere que os dois eventos são paralelos.

**7 - REFERÊNCIAS**

1. Afuwape, A.O.; Turner, M.W.; & Strobel, S. (2004) Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 40+48.
2. Almeida, A.R., Zaragoza, B., and Freitas, A.A. (2006) Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: The number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is indexed to the number of IL-2 producing cells. *J. Immunol.* 177:192-200.
3. Alyanakian, M-A., You, S., Damotte, D., Gourian, C., Esling, A., Garcia, C., Havouis, S., Chatenoud, L., and Bach, J-F. (2003) Diversity of regulatory CD4<sup>+</sup> T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases. *PNAS* 100(26) 15806-15811.
4. Aroeira, L.S., Cardillo, F., De Albuquerque, D.A., Vaz, N.M., Mengel, J. (1995) Anti-IL-10 treatment does not block either the induction or the maintenance of orally induced tolerance to OVA. *Scand. J. Immunol.* 41 (4): 319-323.
5. Arranz, E., O'Mahony, S., Barton, J.R.; Ferguson, A. (1992) Immunosenescence and mucosal immunity: significant effects of old age on secretory IgA concentrations and intraepithelial lymphocyte counts. *Gut.* 33: 882-886.
6. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature.* 441(7090): 235-238.
7. Billiau, A. and Matthys, P. (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology.* 70: 849-860.
8. Carvalho, C.R., Verdolin, B.A., Souza, A.V., Vaz, N.M. (1994) Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J. Immunol.* 39: 533-538.
9. Carvalho, C.R. & Vaz, N.M. (1996) Indirect effects are independent of the way of tolerance. *Scand. J. Immunol.* 43: 613-618.
10. Chung, Y., Lee, S.-H., Kim, D.-H. and Kang, C.-Y. (2005). Complementary role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and TGF- $\beta$  in oral tolerance. *Journal of Leukocyte Biology.* 77:906-913.
11. Chechade, M. and Mayer, L. (2004) Oral Tolerance and its relation to food hypersensitivities. *C. Rev. allergy Clin. Immunol.* 115: 3-12.

12. Clambey, E.T.; Kappler, J.W.; Marrack, P. (2007) CD8 T cell clonal expansions & aging: A heterogeneous phenomenon with a common outcome. *Exp. Gerontology*. 42: 407-411
13. Coombes, J.L., Siddiqui, R.R., Cárcamo, J.H., Sun, C-M., Belkaid, Y. and Powrie, F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$ -and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204(8): 1757-1764.
14. Curotto de Lafaile, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N. and Lafaile, J.J. (2004) CD25<sup>-</sup> T cells generate CD25<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by peripheral expansion. *J. Immunol.* 173: 7259-7268.
15. DeJaco, C.; Duftner, C.; Schirmer, M. (2006) Are regulatory T-cells linked with aging? *Exp. Gerontology*. 41: 339-345.
16. Faquim-Mauro, E.L.; Coffman, R. L.; Abrahamsohn, I.A.; and Macedo, M.S. (1999) Cutting Edge: Mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J. Immunol.* 163: 3572-3576.
17. Faquim-Mauro, E.L., and Macedo, M.S. (2000) Induction of IL-4 dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Internat. Immunol.* 12(12): 1733-1740.
18. Faria, A.M.C., Garcia, G., Rios, M.J.C., Michalaros, & Vaz, N. (1993) Decrease in susceptibility to oral tolerance 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. *Immunol.* 78: 147-151.
19. Faria, A.M.C., Ficker, S.M., Speziali, E., Menezes, J.S., Stransky, B., Rodrigues, V.S., Vaz, N.M. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. (1998a) *Mech. of aging and development*. 102: 67-80
20. Faria, A.M.C.; Ficker, S.M.; Speziali, E.; Menezes, J.S.; Stransky, B.; Verdolin, B.A.; Lahmann, W.M., Rodrigues, V.S. and Vaz, N.M. (1998b) Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Brazilian J. Med. Biol. Research*. 31: 35-48.
21. Faria, A.M.C.; Maron, R.; Ficker, S.M.; Slavin, A.J.; Spahn, T.; Weiner, H.L. (2003) Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of

- transforming growth factor-B/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity*. 20: 135-145
22. Faria, A.M.C. and Weiner, H.L. (2005) Oral Tolerance. *Immunol. Reviews*. 206: 232-259.
23. Faria, A.M.C. and Weiner, H.L. (2006). Oral tolerance and TGF- $\beta$ - Producing Cells. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*. 5:179-190.
24. Fujihashi, K., Kato, H., Van GinKel, F.W., Koga, T., Boyaka, O.N., Jackson, R.J., Kato, R., Hgiwara, Y., Etani, Y., Goma, I., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J.R. (2001) A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. *Acta Odontol. Sascand*. 59(5): 301-308.
25. Fujihashi, K., McGhee J.R. (2004) Mucosal immunity and tolerance in the elderly. *Mech. Ageing devel*. 125: 889-898.
26. Gomez, C.R.; Boehmer, E. D.; and Kovacs, E.J. (2005) The aging innate immune system. *Current opinion in Immunology*. 17:457-462.
27. Guéry, J.-C., Ria, F., and Adorini, L. (1996) Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. *J. Exp. Med*. 183: 751-757.
28. Gupta, R.K. (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Ad. Drug Del. Rev*. 32: 155-172.
29. Guy, B. (2007) The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews*. 5: 505-516.
30. Hasler, P.; Zouali, M. (2005) Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cellular Immunol.* 233: 102-108.
31. Haynes, L., Eaton, S.M., Burns, E.M., Randall, T.D. & Swain, S.L. (2003) CD4T cell memory derived from young naïve cells functions well into old age, while memory generated from aged naïve cells functions poorly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:15053-15058.
32. Kang, I., Hong, M.S., Nolasco, H., Park, S.H., Dan, J.M., Choi, J-Y., and Craft, J. (2004) Age-associated change in the frequency of memory CD4<sup>+</sup>T cells impairs long term CD4<sup>+</sup>T cell responses to influenza vaccine. *J. Immunol*. 173: 673-681.
33. Kato, H., Fujihashi, K., Kato, R., Dohi, T., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Kataka, K., Kobayashi, R., and McGhee, J.R. (2003) Lack of oral tolerance in aging is

- due to sequential loss of Peyer's patch cell interactions. *Internat. Immunol.* 15(2):145-158.
34. Ke, Y., Pearce, K., Lake, J.P., Ziegler, H.K., and Kapp, J.A. (1997)  $\gamma\delta$ T lymphocytes regulate the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* 158:3610-3618.
35. Kensil, C.R., Mo, A.X., and Truneh, A. (2004) Current vaccine adjuvants: an overview of diverse class. *Frontiers in Bioscience.* 9: 2972-2988.
36. Lahmann, W.M.; Menezes; J.S.; Verdolin, B.A.; and Vaz, N.M. (1992) Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 25: 813-821.
37. Lee, W.T. & Vitetta, E.S. (1990) Limiting dilution analysis of CD445Rhi and CD45Rlo T cells: further evidence that CD45Rlo cells are memory cells. *Cell Immunol.* 130: 459-471.
38. LeMaoult, J., Szabo, P., Weksler, M.E. (1997) Effect of age on humoral immunity, selection of the B-cell repertoire and B-cell development. *Immunol. Reviews.* 160: 115-126.
39. Linton, P.J. & Dorshkind, K. (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature Immunol.* 5(2):133-139.
40. Listi, F., Candore, G., Modica, M.A., Russo, M., Lorenzo, G. Di, Esposito-Pelliteri, M., Colonna-Romano, G., Aquino, A., Bulati, M., Lio, D., Franceschi, C. and Caruso, C. (2006) A study of serum immunoglobulin levels in elderly persons that provides new insights into B cell immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1089: 487-495.
41. Melamed, D. and Friedman, A. (1993) Modification of the immune response by oral tolerance: Antigen requirements and interaction with immunogenic stimuli. *Cellular Immunol.* 146: 421-420. .
42. Melamed, D., Fishman-Lobell, J., Uni, Z., Weiner, H.L. and Friedman, A. (1996) Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. *Internat. Immunol.*, 8(5): 717-724.
43. Menezes, J. da S., Mucida, D. de S., Cara, D.C., Alvarez-Leite, J.I., Russo, M., Vaz, N.M. and Faria, A.M.C. (2003) Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *J. Soc. Immunol.* 15 (3): 447-455.

44. Mengel, J., Cardillo, F., Aroeira, L.S., Williams, O., Russo, M., Vaz, N.M.(1995) Anti- $\gamma\delta$  T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol. letters*. 48: 97-102.
45. Miller, S.D. and Hanson, D.G. (1979) Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *J. Immunol*. 123(5): 2344-2350.
46. Milling, S.W.F., Cousins, L., and Pherson, G.G.M. (2005) How do Dcs interact with intestinal antigens? *TRENDS in Immunol*. 26:349-352.
47. Mitchell, T.C., Hildeman, D., Kedl, R.M, Teague, T.K., Schaefer, B.C., White, J., Zhu, Y., Kappler, J. and Marrack, P. (2001) Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nature Immunol*. 2 (5): 397-402.
48. Moreau, A.-C. and 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.
49. 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. *Immunol*. 45:105-113.
50. Mowat, A. Mcl. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews*. 3: 331-341.
51. Mucida, D., Kutchukidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaile, J.J. and Lafaile, M.A.C. (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring T regs. *Journal of Clinical Investigations*. 115: 1923-1933.
52. Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turouskaya, O., Scott, I., Kronenbrg, M., Cherout, H. (2007) Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 317(5835): 256-260.
53. Ngan, J., & Kind, L.S. (1978) Supressor T cells for IgE and IgG in Payer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J. immunol*. 120:861-865.
54. Nikolich-Zugich, J. (2005) T cell aging: naïve but not young. *JEM*. 201(6): 837-840.
55. Oida, T., Zhang, X., Goto, M., Hachimura, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., and Weiner, H.L. (2003) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>ligh</sup> – induced colitis by a TGF- $\beta$ -dependent mechanism. *J. Immunol*. 170: 2516-2522.

56. Peng, H.T., Turner, M.W., Strobel, S. (1989) The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunol.* 67: 425-430.
57. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. (1993) Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int. Immunol.* 5(11): 1461-1471.
58. Richman, L.K., Chiller, J.M, Brown, W.R., Hanson, D.G. and Vaz, N.M. (1978) Enterically induced immunologic Tolerance I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J. Immunol.* 121 (6): 2429-2434.
59. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F. (1998) CD38<sup>+</sup> CD45RB(low) CD4<sup>+</sup> T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur. J. Immunol.* 28 (11):3435-3447.
60. Rizzo, L.V., Morawetz, R.A., Miller-Rivero, N.E., Choi, R., Wiggert, B., Chan, C.C., Morse, H.C., III, Nussenblatt, R.B. & Caspi, R.R. (1999) IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* 162: 2613-2622.
61. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Ver. Immunol.* 22: 531-562.
62. Sakaguchi, S. and Powrie, F. (2007) Emerging challenges in regulatory T cell function and Biology. *Science.* 317: 627-629.
63. Schinjns, V.E.J.C. (2002) Antigen delivery systems and immunostimulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87: 195-198.
64. Simon, L., Shine, G. and Dayan, A.D. (1994) Effect of animal age on the uptake of large particulates across the epithelium of the rat small intestine. *Int. J. Exp. Pathol.* 75: 369
65. Song, H., Price, P.W., Cerny, J. (1997) Age-related changes in antibody repertoire: contribution from T cells. *Immunol. Reviews.* 160: 55-62.
66. Spahn T.W.; Fontana, A.; Faria A.M., Slavin, A.J., Eugster, H.P., Zhang, X., Koni, P.A., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., Rennert, P.D., Weiner, H.L. (2001) Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Payer's patches. *Eur J Immunol* 31: 1278-87.

67. Speziali, E. de F. (1999). Manutenção dos padrões de reatividade imunológica durante o processo de senescência. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G.
68. Steinman, R.M. and Nussenzweig, M.C. (2002) Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Immunol.* 99: 351-358.
69. Stills Jr., H.F. (2005) Adjuvantes and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's Complete and others adjuvants. *ILAR Journal.* 46(3): 280-295.
70. Storni, T., Kunding, M., Senti, G., Johansen, P. (2005) Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Ad. Drug Del. Rev.* 57: 333-255.
71. Strobel, S. & Ferguson, A. (1984) Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatr. Res.* 18: 588-594.
72. Strobel, S. & Ferguson, A. (1987) Persistence of oral tolerance in mice fed ovalbumin is different for humoral and cell-mediated immune responses. *Immunol.* 60: 317-318.
73. Strobel, S. and Mowat, A. Mcl. (2006) Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Current Opinion and Clin. Immunol.* 6: 207-213.
74. Sun, C-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204(8): 1775-1785.
75. Sun, J., Dirden-Kramer, B., Ito, Komei, I., Ernst, P.B, and Houten, N.V (1999) Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J. Immunol.* 162: 5868-5875.
76. Szewczuk, M.R.; Campbell, R.J.; and Jung, L.K. (1981) Lack of age-associated immune dysfunction in mucosal-associated lymph nodes. *J. Immunol.* 126(6): 2200-2204.
77. Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaile, J.J. and Dustin, M.L. (2006) Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Medicine.* 203:505-511.

78. Takeoka, Y ; Chen, SY ; Yago, H ; Boyd, RL ; Suehiro, S ; Shultz, LD ; Ansari, AA & Gershwin, ME. (1996). The murine thymic microenvironment: changes with age. *Int Arch Allergy Immunol.* 111: 5-12.
79. Taub, D. D. and Longo, D.L. (2005) Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol. Reviews.* 205: 72-93.
80. Tobagus, I.T., Thomas, W.R. and Holt, P. (2004). Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period. *J. Immunol.* 172: 2274-2285.
81. Tsuji, N.M, Mizumachi, K. and Kurisaki, J.-I. (2003). Antigen-specific, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell clones induced in Peyer's patches. *Internat. Immunol.* 15:525-534.
82. 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.
83. Vaz, N.M; Kane, R.E.; Lynch, J.M. (1981) On the adjuvant effect of Aluminium Hydroxide for mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 76(1): 93-98.
84. Vaz, N.M, Rios, M.J.C., Lopes, L.M., Gontijo, C.M., Castanheira, E.B., Jacquemart, F., and Andrade, L.A.B. (1987) Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 20: 785-790.
85. Veldhoen, M., Stockinger, B. (2006) TGF- $\beta$ 1, a "Jack of all trades" the link with pro-inflammatory IL-17 producing T cells. *Trends. Immunol.* 27(8): 358-361.
86. Vieira, P.L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C. and O'Garra, A. (2004). IL-10-Secreting regulatory T cells do not express foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 5986-5993.
87. Wakabayashi, A., Utsuyama, M., Hosoda, T., Sato, K., Hidokawa, K. (1999) Differential age effect of oral administration of na antigen on antibody response: an induction of tolerance in young mice but enhancement of immune response in old mice. *Mech. Ag. Develop.* 109: 191-201.
88. Wakabayashi, A., Kumagai, Y., Watari, E., Shimizu, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K. and Takahashi, H. (2006). Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunol.* 119: 167-177.

89. Weiner, H.L., Friedman, A., Miller, A. et al.(1994) Oral tolerance: imunologic mechanisms and treatment of animal and human-organ-specific autoimune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* 12: 809-838.
90. Weiner, H.L., Gonnella, P.A., Slavin, A. and Maron, R. (1998) III. Tolerance in the Mucosal Immune System. Oral tolerance: cytokine milieu in the gut and modulation of tolerance by cytokines. *72<sup>nd</sup> Forum in Immunol.* 528-533.
91. Weiner, H.L. (2001) The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and Tr1 and TH3 regulatory cells. *Nature.* 2 (8) : 671-672.
92. Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R. and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 203: 519-527.
93. Zhang, X., Izikson, L., Liu, L., and Weiner, H.L. (2001) Activation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by oral antigen administration. *J. Immunol.* 167: 4245-4253.