

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**LABORATÓRIO DO SISTEMA LINFÓIDE E DA**  
**REGENERAÇÃO**

Geraldo Magela de Azevedo Junior

Efeitos inibitórios da exposição parenteral a antígenos tolerados  
sobre a reação granulomatosa a ovos de *Schistosoma mansoni*.

Belo Horizonte

2012

Geraldo Magela de Azevedo Junior

Efeitos inibitórios da exposição parenteral a antígenos tolerados  
sobre a reação granulomatosa a ovos de *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Departamento de Morfologia,  
Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, como  
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor  
em Biologia Celular. .

Orientadora: Cláudia Rocha Carvalho

Colaboradores: Nelson Monteiro Vaz

Belo Horizonte

2012

Dedico esta tese aos meus filhos, Pedro, Paulo e Lucas.

À minha esposa Rosana pela companhia de toda uma vida.

À minha família e a minha orientadora professora Cláudia.

“Há grandiosidade neste modo de enxergar a vida, com suas diversas forças, tendo sido originalmente soprada sobre algumas poucas formas, ou apenas uma: e enquanto este planeta girava de acordo com a lei fixa da gravidade, de um começo tão simples, infinitas formas de grande beleza evoluíram, e continuam a evoluir.”

**Darwin - 1859**

## **Agradecimentos aos Colaboradores**

À doutora Raquel Alves Costa, pelo auxílio no aprendizado de microscopia confocal e padronização dos experimentos de imunofluorescência.

À bolsista de iniciação científica Mariana Araújo Resende pela ajuda nos experimentos e em outras fases deste trabalho.

Ao doutor Claudiney Melquiades Rodrigues por sempre estar disponível a auxiliar em várias fases deste trabalho e por colaborar nos ensaios com a técnica do CBA.

Ao professor Dr Geovanni Dantas Cassali, Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG.

À professora Débora Negrão Correa e a aluna Cíntia do Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

Ao professor Nelson Monteiro Vaz, departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG pelas longas discussões e por mostrar que há maneiras diferentes de ver e pensar.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Sumário

<b>1 Introdução</b>	<b>13</b>
1.1 - Tolerância imunológica	13
1.2 - Tolerância oral	14
1.3 – Características imunológicas da mucosa intestinal	15
1.4 – Características da tolerância oral	16
1.5 – Mecanismos da tolerância oral	18
1.6 – Efeitos indiretos da tolerância oral	22
1.7 – Granuloma esquistossomótico	24
1.8 – Moléculas de adesão	30
1.9 – Pulmões	33
<b>2 Objetivos</b>	<b>35</b>
2.1 - Objetivo geral	35
2.2 – Objetivos específicos	35
<b>3 Materiais e Métodos</b>	<b>36</b>
3.1 – Animais	36
3.2 – Antígenos	36
3.3 – Tratamento oral para obtenção de tolerância	36
3.4 – Granulomas pulmonares	36
3.5 – Imunizações	37
3.6 – Sangria	37
3.7 – ELISA	37
3.8 – Histologia	38

3.9 – Processamento do material para imunofluorescência - - - - -	38
3.10 – Análise através de microscopia confocal - - - - -	39
3.11 – Análise através de imunohistoquímica - - - - -	40
3.12 – Análise quantitativa das citocinas séricas e do pulmão - - - - -	40
3.13 – Análise estatística - - - - -	41
<b>4 Resultados - - - - -</b>	<b>42</b>
<b>5 Discussão - - - - -</b>	<b>61</b>
<b>6 Conclusões - - - - -</b>	<b>66</b>
<b>7 Referências Bibliográficas - - - - -</b>	<b>67</b>



### Lista de Abreviaturas

**Al(OH)<sub>3</sub>**: Hidróxido de alumínio.

**ELISA**: Enzyme Linked Immusorbent Assay – Ensaio Imunoenzimático.

**HRP**: Horseadish peroxidase – Peroxidase.

**IFN**: Interferon.

**Ig**: Imunoglobulina.

**IL**: Interleucina.

**i.p.**: Via intraperitoneal.

**i.v.**: Via intra-venosa.

**GALT**: Gut Associated Lymphoid Tissue – Tecido Linfóide Associado ao Intestino.

**OVA**: Ovalbumina.

**OPD**: Ortofenileno-diamino, Substrato Cromogênico da HRP.

**PBS**: Phosphate Buffered Saline – Salina tamponada com fosfato.

**TGF- $\beta$** : Transforming Growth Factor  $\beta$ .

**Th1**: perfil de secreção de citocinas do tipo 1.

**Th2**: perfil de secreção de citocinas do tipo 2.

**TNF**: Tumor Necrosis Factor – Fator de Necrose Tumoral.

### Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Elisa* anti-OVA - - - - -	42
<b>Figura 2</b> - Elisa* anti-SEA - - - - -	43
<b>Figura 3</b> - Área dos granulomas com 18 dias - - - - -	44
<b>Figura 4</b> - Granulomas pulmonares com 18 dias corados em HE e Tricromático de Gomori - - - - -	45
<b>Figura 5</b> - Granulomas pulmonares com 1, 5, 11 e 14 dias corados em HE - - -	47
<b>Figura 6</b> - Área dos granulomas com 1, 5, 11 e 14 dias - - - - -	48
<b>Figura 7</b> - Marcação celular (confocal) com anticorpo anti-F4/80 - - - - -	49
<b>Figura 8</b> - Marcação celular (confocal) com anticorpo anti-CD3 - - - - -	50
<b>Figura 9</b> - Marcação celular (confocal) com anticorpo anti-CD4 - - - - -	51
<b>Figura 10</b> - Marcação celular (confocal) com anticorpo anti- $\alpha$ SMA - - - - -	52
<b>Figura 11</b> - Marcação em granulomas (confocal) com anticorpo anti-ICAM-1-54	
<b>Figura 12</b> - Marcação em parênquima pulmonar (confocal) com anticorpo anti- ICAM-1 - - - - -	55
<b>Figura 13</b> - Dosagem de citocinas nos pulmões com 14 dias - - - - -	57
<b>Figura 14</b> - Dosagem de citocinas no soro com 1, 5, 14 e 18 dias- - - - -	58
<b>Figura 15</b> - Marcação (imunohistoquímica) com anticorpo anti-ICAM-1 em pul- mão e baço com 5 dias - - - - -	60

## Resumo

A injeção parenteral de proteínas previamente administradas por via oral inibe o desencadeamento de respostas imunes à proteínas não especificamente relacionadas e bloqueia reações inflamatórias de origem imunológica, tais como doenças auto-imunes. Este efeito inibitório que denominamos “efeitos indiretos da tolerância oral” também é conhecido como “bystander suppression”. Neste trabalho mostrou-se que a injeção i.p. de OVA+Al(OH)<sub>3</sub> minutos antes da injeção i.v. de ovos de *Schistosoma mansoni* em camundongos tolerantes a OVA bloqueia a formação de granulomas pulmonares. Demonstrou-se que há menor expressão de ICAM-1 no parênquima pulmonar adjacente aos granulomas de camundongos tolerantes à OVA e imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> em comparação com grupos controles. Aos 18 dias após a inoculação dos ovos, não foram observadas diferenças na intensidade de expressão de CD3, CD4, F4/80 e  $\alpha$ -SMA nos granulomas de grupos tolerante e controles. A redução dos granulomas após a re-exposição parenteral de proteínas toleradas não foi correlacionada com alterações nos níveis de citocinas Th1/Th2 presentes no soro ou em extratos pulmonares.

**Palavras chave:** granuloma, *Schistosoma mansoni*, tolerância oral, inflamação.

## Abstract

Parenteral injection of tolerated proteins into orally tolerant mice inhibits the initiation of immunological responses to unrelated proteins and blocks severe chronic inflammatory reactions of immunological origin, such as autoimmune reactions. This inhibitory effect which we have called “indirect effects of oral tolerance” is also known as “bystander suppression”. Herein, we show that i.p. injection of OVA + Al(OH)<sub>3</sub> minutes before i.v. injection of *Schistosoma mansoni* eggs into OVA tolerant mice blocked the increase of pulmonary granulomas. In addition, the expression of ICAM-1 in lung parenchyma in areas outside the granulomas of OVA orally tolerant mice was significantly reduced. However, at day 18 after granuloma induction there was no difference in immunofluorescence intensity to CD3, CD4, F4/80, and  $\alpha$ -SMA per granuloma area of tolerant and control groups. Reduction of granulomas by reexposure to orally tolerated proteins was not correlated with a shift in Th-1/Th-2 cytokines in serum or lung extract.

**Key words: granuloma, *Schistosoma mansoni*, oral tolerance, inflammation.**

# 1 – Introdução

## 1.1 - Tolerância Imunológica.

A noção de tolerância imunológica, desenvolvida a partir dos experimentos de Medawar e colaboradores com aloenxertos (Medawar, 1961), embora incorporada como um aspecto básico da dinâmica do sistema imune, foi assimilada como uma transformação negativa, uma ausência de reatividade. Assim, a tolerância imunológica é definida como uma condição em que uma resposta imune deletéria é prevenida, suprimida ou direcionada para uma resposta inócua. Neste sentido, o conhecimento dos mecanismos da tolerância são importantes para o desenvolvimento de terapias de doenças autoimunes (Miller, 1996).

Por outro lado, a tolerância imunológica também é descrita como um processo ativo onde os linfócitos T ocupam o centro das atenções e a tolerância é admitida como um aspecto da “regulação” de respostas imunes (Bluestone, 2011). Além disso, a maioria das preocupações com a tolerância imunológica está voltada para a “tolerância natural”, ou seja, para o conjunto de mecanismos que impediria o desenvolvimento de agressões “autoimunes”. Tudo se passa como se esse “desconhecimento” da imunogenicidade do próprio corpo (a discriminação self/nonself) representasse a “fisiologia” imunológica.

No entanto, a tolerância imunológica a materiais antigênicos externos ao corpo é um aspecto importante do viver sadio (Vaz et al., 1994). Na verdade, a maioria dos contatos do organismo com materiais imunogênicos ocorre através das mucosas e tem como consequência o desenvolvimento de tolerância. Estão nessa categoria os produtos imunogênicos da microbiota autóctone e as proteínas da dieta.

## 1.2 - Tolerância Oral

A chamada tolerância oral a materiais contactados por via digestiva é um estado no qual a imunização parenteral com um antígeno é inibida pela ingestão prévia do mesmo antígeno, como ocorre fisiologicamente com as proteínas da dieta. (Richman et al., 1978; Weiner, 2001; Weiner et al., 2011; Sgarbi Reis et al., 2012).

Embora micróbios sejam vistos como patógenos, hoje é bem estabelecido que a maioria das interações são simbióticas e, em animais isentos de germes (germ-free), observam-se alterações estruturais como: redução do tamanho das placas de Peyer, redução dos folículos linfóides no baço, redução dos níveis sistêmicos de IgG e IgA, redução da celularidade dos linfonodos mesentéricos e da lâmina própria, com redução de células T CD4+ e de células T  $\gamma\delta$ , observa-se também alterações funcionais como: redução da expressão de receptores do tipo Toll e MHC classe II em enterócitos e redução do número de linfócitos intra-epiteliais (Lee et al., 2010; Sgarbi Reis et al., 2012).

A grande maioria das pessoas desenvolve uma tolerância robusta a microbiota intestinal e às proteínas da dieta. Uma pequena parcela de indivíduos (5-6%) apresenta reações adversas a essas proteínas, tais como alergias alimentares e distúrbios de natureza mais grave, englobados sob o nome de doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn e a colite ulcerativa. A origem de tais distúrbios é atribuída a uma quebra ou falha da indução ou manutenção da tolerância oral (Strobel, 1998), mas há indicações recentes de que a concomitância de múltiplos fatores possa ser necessária para que tais processos se desenvolvam (Caldwell et al., 2010).

O conhecimento dos mecanismos que controlam o equilíbrio entre a tolerância oral e a imunopatologia da mucosa intestinal, por um lado, é um aspecto da imunologia básica e,

por outro lado, é fundamental para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de doenças autoimunes e outras doenças gastrintestinais.

### **1.3 - Características imunológicas da mucosa intestinal**

O tubo digestivo abriga grande quantidade de linfócitos organizados em um Tecido Linfóide Associado ao Intestino (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT). Além de constituir o maior componente do sistema imune, o tecido linfóide associado à mucosa digestiva está em contato constante com grande variedade de materiais antigênicos. Ali se encontram a maioria dos linfócitos do organismo, sendo que cerca de 80-90% de linfócitos B produtores de imunoglobulinas localizam-se no intestino delgado (Van der Heijden et al., 1987). Esse tecido pode ser dividido em sub-regiões, há linfócitos no epitélio, na lâmina própria, nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos (Mowat, 2003). Cerca de 60-70% dos linfócitos da lâmina própria são CD4+ e de 30-40% são CD8+. Os linfócitos intra-epiteliais são predominantemente CD8+, apresentam receptores para caderina-E presentes nos enterócitos e atuam ativamente na manutenção do epitélio (Wittig et al., 2003).

As placas de Peyer (Johannes Conrad Peyer, 1653-1712), são grandes coleções de células B em meio a áreas de células T. O epitélio suprajacente apresenta diferenças morfológicas em relação a outras áreas, como borda em escova reduzida e maior infiltração por células M. As células M são enterócitos modificados presentes no epitélio associado às placas de Peyer, que exibem intensa atividade pinocítica. Patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e reovírus se ligam às células M e podem ser encontrados em seu interior. As células M não processam antígenos ou apresentam peptídeos a células T, mas transferem antígenos às células apresentadoras. As principais células apresentadoras são as células dendríticas. Uma característica importante do tecido linfóide intestinal é a sua

capacidade de secretar IgA (Tomasi, 1992). As células B realizam mudança de isotipo, para IgA, nas placas de Peyer sob a influência de TGF $\beta$  e IL-10. No intestino, a IgA é um dímero ao qual é adicionado um componente secretório, que torna a molécula mais resistente á proteólise nas mucosas. A secreção da IgA é feita por plasmócitos localizados na lâmina própria e essas moléculas são conjugadas ao componente secretório durante a transcitose pela célula epitelial. A IgA é encontrada na saliva, secreção biliar, respiratória, geniturinária, lágrimas, leite e suor.

A acumulação de linfócitos nos linfonodos mesentéricos requer selectina-L e também integrina- $\alpha\beta 7$ . Devido a este duplo requisito, os linfonodos mesentéricos são considerados locais intermediários na recirculação entre os tecidos periféricos e a mucosa (Weiner, 2001). As células linfóides ativadas por antígenos nas mucosas exibem moléculas de adesão ( $\alpha\beta 7$  ou MADCAM-1) diferentes daquelas ativadas nos tecidos periféricos ( $\alpha\beta 1$  ou VLA4) (Weiner, 2001).

#### **1.4 - Características da tolerância oral.**

A exposição oral a um antígeno pode desencadear: a tolerância oral; imunização sistêmica; e/ou secreção local de IgA.

Além disso, foi demonstrado que animais previamente imunizados por via oral apresentam estabilização dos títulos de anticorpos em desafios subsequentes, sendo que animais imunizados por via parenteral respondem com elevações progressivas da reatividade específica a cada exposição ao mesmo antígeno. Ou seja, mais que uma inibição (supressão), a tolerância oral representa uma estabilização dos níveis de resposta específica (Verdolin et al., 2001).



A tolerância oral afeta vários aspectos da reatividade imunológica: ela reduz o aparecimento de células formadoras de anticorpos e de anticorpos circulantes; reduz a hipersensibilidade retardada e a proliferação antígeno específica de células T “in vitro” (Titus et al., 1981). A redução do título de anticorpos geralmente é mais difícil de se obter do que a redução de respostas celulares, sendo a redução dos títulos de IgE uma exceção a essa regra (Maia et al., 1974; Faria et al., 1999). A tolerância oral previne o desenvolvimento de algumas doenças auto-imunes experimentais (Khoury et al., 1990; Zhang et al., 1990), alergia (Pomeranz, 1970; Van Hoogstraten et al., 1991) e asma experimental (Russo et al., 2001)

Experimentalmente, a tolerância oral pode ser desencadeada pela administração intragástrica (gavagem) ou pela ingestão voluntária do antígeno (Faria et al., 1993).

Embora muito efetiva para bloquear o início de respostas imunes, a ingestão de antígenos por animais nos quais essa resposta já está em andamento, frequentemente potencia a resposta imune, em vez de inibi-la (Conde et al., 1998; Strobel et al., 1998). Essa dificuldade na indução de tolerância oral em organismos previamente imunizados, como seria desejável em casos de doenças auto-imunes humanas, se aplica principalmente à supressão da produção de imunoglobulinas, pois a resposta celular e a proliferação de linfócitos antígeno-específicos são mais facilmente reduzidas mesmo em animais previamente imunizados. O sistema imune seria mais susceptível a sinais tolerogênicos na fase inicial da expansão clonal (Leishman et al., 2000). Apesar de seu potencial uso na prevenção de algumas doenças auto-imunes e alérgicas humanas, poucos avanços têm sido obtidos com o uso da tolerância oral no tratamento de doenças já em curso (Weiner, 2004; Weiner et al., 2011). Em um modelo murino de asma, a administração oral do antígeno

após a sensibilização teve um efeito terapêutico limitado (Chung et al., 2002; Russo et al., 2001).

### **1.5 - Mecanismos da tolerância oral**

Pequenas quantidades de proteínas intactas ou parcialmente degradadas no intestino penetram na circulação diariamente e anticorpos para os antígenos da dieta podem ser encontrados em indivíduos normais (Husby et al., 1985). No entanto, a expansão clonal progressiva dos linfócitos, característica da resposta imune específica, está ausente para os antígenos que foram contactados inicialmente pela via das mucosas. Um dos mecanismos propostos para explicar a tolerância oral é a deleção clonal, proposta originalmente por Burnet para explicar a tolerância aos auto-componentes. Outro mecanismo proposto é a anergia que tornaria os linfócitos incapazes de proliferar e produzir respostas imunes. A anergia pode refletir uma apresentação antigênica alterada, com poucas moléculas có-estimulatórias nas interações celulares. Incluídas nestas moléculas co-estimulatórias encontram-se ICAM-1, B7-1, B7-2 e CD40. É proposto ainda que as células dendríticas intestinais são os elementos cruciais no desencadeamento da resposta local, sendo que eventos inflamatórios associados levariam à imunização e a ausência de inflamação levaria à tolerização por via oral (Strobel et al., 1998).

Dois argumentos são decisivos para a rejeição destas duas hipóteses (deleção clonal e anergia) para explicar a tolerância oral e mostram que a tolerância oral é um fenômeno ativo: a) a transferência adotiva da tolerância por linfócitos T de doadores tolerantes para receptores normais (naive); e, b) melhor ainda, a impossibilidade de romper a tolerância pela transferência de linfócitos de doadores imunizados, que estão no momento produzindo anticorpos, para receptores tolerantes, nos quais a síntese de anticorpos se interrompe.

Vários fatores afetam a indução e a manutenção da tolerância oral, incluindo uma combinação de idade e espécie ou linhagem dos animais, dose e natureza do antígeno usado, sendo máxima em camundongos adultos jovens e decrescentes em animais idosos (Vaz et al., 1997; Faria et al., 1998). A transferência de células linfóides do baço de animais jovens para animais idosos, antes do contato com o antígeno, os torna susceptíveis ao desencadeamento de tolerância oral (Lahmann et al., 1992). Além disso, é possível transferir adotivamente a tolerância oral para animais normais pelo transplante de linfócitos T de doadores singênicos tolerizados por doses altas de antígeno por via oral (Richman et al., 1978). Esses experimentos são contrários à idéia de que mecanismos como deleção clonal ou anergia sejam os responsáveis pela tolerância.

Há evidências de que a tolerância oral seja desencadeada por mecanismos supressivos mediados por células T, mecanismos ativos envolvendo células T regulatórias, através da secreção de citocinas, como TGF $\beta$  (Miller et al., 1992; Weiner, 2001). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> com atividade supressora foram identificados na mucosa intestinal, linfonodos mesentéricos e no baço e sugeriu-se a existência de uma subpopulação de células regulatórias (Th3) que produziriam IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , em seu papel supressor (Smith et al., 2002; Strobel et al., 1998; Weiner, 2001). Por outro lado, demonstrou-se que animais deficientes em IL-4, assim como animais tratados com anticorpos anti IL-10 desenvolvem tolerância oral (Strobel et al., 1998; Weiner, 2001).

Sub-populações de linfócitos com marcadores fenotípicos específicos e com padrões de secreção de citocinas distintos são observadas na mucosa, como células Th3, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, e células T produtoras de TGF e IL-10 (Weiner, 2001). Vinte e quatro horas após a ingestão de um antígeno já se observam células regulatórias, com a

capacidade de secretar citocinas com atividade supressora, como IL-4, IL-10 e TGF nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos (Hoyne et al., 1995).

Estudos em animais transgênicos revelam que os linfonodos mesentéricos são indispensáveis na indução de tolerância e de imunidade, ao contrário das placas de Peyer (Smith et al., 2002). Estudos com transferência de células T CD4+ de camundongos transgênicos para o TCR anti-ova para camundongos subsequentemente submetidos a esquemas de tolerização ou de imunização, demonstraram que tanto na imunização, quanto na tolerização, ocorrem ativação e proliferação de células T nas placas de Peyer, linfonodos periféricos e linfonodos mesentéricos. Nos linfonodos mesentéricos, os animais tolerizados apresentam menor ativação e proliferação que animais imunizados. Em animais imunizados, há maior persistência de células T nas placas de Peyer. Nos linfonodos periféricos não se observam diferenças nos dois grupos (Smith 2002).

Estudos (Sakaguchi et al., 1985; 2000) demonstraram que sub-populações de células T possuem a capacidade de inibir o desencadeamento de lesões auto-imunes experimentais. Estas células foram caracterizadas como células T regulatórias com fenótipo CD4+CD25+. O aumento da frequência de células T CD4+CD25+ tem sido correlacionado com o estabelecimento da tolerância (Bilsborough et al., 2002). Essas células T CD4+CD25+ constituem 15 a 30 por cento dos linfócitos T em humanos saudáveis e em recém nascidos. Tais células são dotadas de atividade supressora “in vitro”, necessitando de contato célula-célula, o que sugere que tal efeito não ocorre através de citocinas (Fai et al., 2001).

Estudos demonstraram (Schwartz et al., 2002) que as células regulatórias CD4+CD25+ têm um papel fisiológico na manutenção da homeostase do organismo, não apenas como células supressoras. Estas células regulatórias apresentam um papel importante na recuperação de lesões experimentais no sistema nervoso central em animais

de experimentação, sendo o efeito protetor antígeno específico. Essas células, portanto, atuam tanto na regeneração neural quanto no desencadeamento de lesões de auto-imunidade nas encefalites alérgicas.

Além das células T, tem-se dado também uma atenção especial às células apresentadoras de antígenos do intestino para explicar a tolerância oral (Weiner, 2001b). O intestino apresenta distintas subpopulações de células dendríticas caracterizadas como: linfóides (CD11c+/CD8+/CD11b-), mielóides (CD11c+/CD8-/CD11b+) e duplo negativas (CD11c+/CD8-/CD11b-). Cada subpopulação apresenta propriedades distintas, sendo a mais evidente a produção de IL-10 pela linhagem mielóide. As células dendríticas da placa de Peyer polarizam as células T específicas a produzirem citocinas de padrão Th2 e IL-10 (Mowat, 2003). Há um tráfego de células dendríticas da mucosa em direção aos linfonodos mesentéricos sendo que a exposição a LPS causa aumento desse fluxo. Em situações onde ocorre lesão tecidual, na presença de LPS, as células dendríticas produziram IL-12 desencadeando imunidade sistêmica e local. Sendo assim, a tolerância oral não ocorreria simplesmente em decorrência da distinção entre “self e non-self”, mas como parte de uma reação a sinais de lesão (“perigo”) (Matzinger, 2002), como fenômenos inflamatórios presentes na mucosa intestinal (Mowat, 2003).

Assim, a tolerância imunológica pode ser vista como um estado dinâmico e fisiológico onde atuam vários fatores sejam locais ou sistêmicos. Encontramos na literatura evidências da participação de múltiplos tipos celulares, entre eles diversas células regulatórias (nTregs, iTregs, Th3, Tr1 e CD8+ Tregs), sendo o intestino o maior sítio de indução de células regulatórias induzidas (Bilsborough et al., 2002; Bluestone, 2011; Tang et al., 2008; Weiner et al., 2011; Sgarbi Reis et al., 2012; Mucida et al., 2005).

A tolerância oral é um fenômeno imunológico ativo, como demonstrado pela incapacidade de desencadeá-la em animais deficientes em moléculas co-estimulatórias, e é um fenômeno que depende de fatores relacionados a dieta e a flora intestinal (Weiner et al., 2011; Sgarbi Reis et al., 2012).

### **1.6 - Efeitos indiretos da tolerância oral**

Em 1981, Vaz e colaboradores mostraram que as reações desencadeadas pela injeção de DNP-Ova em camundongos tolerantes por via oral a Ova eram capazes de inibir respostas imunes a uma proteína não relacionada, DNP-KLH, injetada simultaneamente. Esse fenômeno foi denominado de supressão cruzada (Vaz et al., 1981). Posteriormente vários outros trabalhos mostraram que essa inibição decorrente da injeção parenteral de antígenos tolerados pode ocorrer com diferentes proteínas presentes na dieta ou mesmo auto componentes, independentemente, portanto, da via de indução da tolerância (Carvalho et al., 1994, 1996 e 1997). O fator crucial na inibição seria a exposição a um antígeno “tolerado” em condições “imunizantes”, isto é, por via parenteral e com adjuvantes.

Os efeitos indiretos da tolerância oral não resultam do fenômeno conhecido como “competição antigênica”, em que os antígenos competem pela ligação no MHC das células apresentadoras de antígenos; não requerem que o antígeno tolerado e o segundo antígeno sejam injetados pela mesma via; requerem que o antígeno tolerado seja introduzido por uma via imunizante, sendo que as vias venosa ou oral são ineficazes; e requerem que o antígeno tolerado seja introduzido antes do segundo antígeno (Carvalho et al., 1994, 1996 e 1997). A presença do antígeno tolerado apenas na imunização primária é capaz de inibir

imunizações secundárias e terciárias com antígenos não-relacionados, mesmo na ausência do antígeno tolerado (Carvalho et al., 1997).

A proposta mais conhecida para explicar estes efeitos sugere que o contato com o antígeno tolerado faria surgir uma sub-população de células regulatórias (Th3) que produzem IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ ; e que essas citocinas seriam também responsáveis pela supressão de linfócitos reativos a outros antígenos presentes na mesma ocasião e nos mesmos locais (Miller et al., 1991; Strobel et al., 1998; Weiner, 2001). Essa hipótese é conhecida como supressão do “espectador inocente”. No entanto, vários aspectos dos efeitos indiretos, como os citados acima, tornam improvável a hipótese do espectador inocente (Carvalho et al., 1997).

Os efeitos indiretos da exposição parenteral a antígenos tolerados podem interferir com o estabelecimento de reações inflamatórias de origem imunológica, ou não-imunológica, como no edema de pata gerado pela injeção de carragenina (Ramos et al., 2008), podem apresentar efeitos sistêmicos, alterando a mobilização de leucócitos na medula e os níveis de leucócitos circulantes em modelos de peritonite alérgica (Rodrigues 2006) e podem também alterar o processo de cicatrização em feridas de pele (Costa et al., 2011).

Quando injetados na veia da cauda de camundongos normais, não-infectados, ovos vivos de *Schistosoma mansoni*, embolizam na circulação pulmonar onde desencadeiam a formação de granulomas. Quando isso é feito em camundongos previamente tolerizados com ovalbumina (Ova) e os animais são concomitantemente injetados (i.p.) com Ova em adjuvante CFA, há uma drástica redução das dimensões dos granulomas pulmonares ao redor dos ovos de *S. mansoni* (Carvalho et al., 2002). Este fenômeno não dispõe ainda de uma explicação adequada.

## 1.7 - Granuloma Esquistossomótico

A inflamação é definida como um conjunto de alterações desencadeadas em animais multicelulares por um estímulo lesivo. Pode ser classificada conforme o tempo de reação, conforme as características do exsudato e conforme sua etiologia. As alterações inflamatórias são estereotipadas e seguem uma seqüência de fenômenos como aumento de permeabilidade celular, exsudação de leucócitos e resolução por cura, reparação ou fibrose.

A manifestação da resposta inflamatória nos diferentes tecidos depende de fatores específicos relacionados aos órgãos e células, bem como do padrão de citocinas no meio inflamatório (Jacob et al., 1997).

Em processos inflamatórios crônicos pode ser desencadeada uma reação do tipo granulomatosa. Um granuloma pode ser definido como uma coleção compacta de fagócitos mononucleares maduros que pode ou não estar acompanhada de aspectos acessórios, tais como necrose ou infiltração de outros leucócitos (Lenzi et al., 1998). A dinâmica de formação do granuloma varia de acordo com o agente etiológico que desencadeia a sua formação, um agente que pode ser intracelular, extracelular ou mixto (Lenzi et al., 1991). Uma outra característica que um granuloma pode apresentar é a presença de células gigantes multinucleadas tipo Langhans ou tipo corpo estranho. Essas células gigantes são formadas pela coalescência e fusão de células epitelióides (Adams, 1983). A formação de granulomas pode ocorrer em várias patologias humanas como na tuberculose, hanseníase, sífilis, paracocidiose e esquistossomose.

A esquistossomose é uma doença parasitária que ocorre após a infecção com o *S. mansoni*, e sua morbidade está correlacionada com a formação dos granulomas que se formam em torno dos ovos do parasita, que se depositam nos tecidos do hospedeiro,



preferencialmente no intestino, fígado e pulmões. Os granulomas em torno dos ovos, localizados nas vênulas do fígado, podem evoluir com fibrose e hipertensão das veias do sistema porta-hepático (Gryseels et al., 2006).

A formação dos granulomas na esquistossomose é dependente de linfócitos T sensibilizados para antígenos presentes no ovo de *S. mansoni* levando a uma resposta do tipo hipersensibilidade tardia com grande produção de TNF $\alpha$  (Jacobs et al., 1997; Phillips et al., 1977; Co et al., 2004). Camundongos atímicos ou SCID (Imunodeficiência Severa Combinada), que não produzem linfócitos T maduros, podem apresentar parasitemia, mas não chegam a formar granulomas (Phillips et al., 1977; Amiri et al., 1992). A transferência adotiva de linfócitos T de camundongos infectados com *S. mansoni* é capaz de sensibilizar receptores normais que, então, quando infectados, formam granulomas mais rapidamente (Phillips et al., 1986). Na infecção natural, há uma fase aguda, inicial, entre 8 e 10 semanas com grande celularidade e produção de altos níveis de citocinas. Já na fase crônica, entre 16 e 20 semanas, há fibrose, redução da celularidade e diminuição da produção de citocinas. Com a evolução da infecção, observa-se, redução do tamanho dos granulomas. Esse fenômeno imunomodulatório é observado apenas no fígado. No intestino e nos pulmões, não se observa alteração na morfologia dos granulomas com o passar do tempo (Silva et al., 2000; Souza Vidal et al., 1993).

Observando a cinética celular nos granulomas, notou-se que há um tráfego, com células entrando e saindo do granuloma. Os linfócitos localizados no granuloma possuem marcadores de ativação celular (CD69, IL-2R) e produzem citocinas (IL-2; IL-4 e INF $\gamma$ ). Se comparados a linfócitos presentes no baço, os presentes no granuloma produzem IL-2 em menor quantidade. Devido a isto, os linfócitos localizados nos granulomas são mais propensos a sofrer apoptose. A análise do ciclo celular dos linfócitos localizados nos

granulomas revela que a maioria encontra-se no estágio G0/G1, sendo que um maior número de linfócitos no baço encontram-se em proliferação (Rumbley et al., 1998). Os linfócitos localizados nos granulomas são específicos para antígenos do ovo (SEA) como demonstrado em experimentos de migração, onde se observa maior recrutamento e permanência nos granulomas com SEA, de linfócitos anti-SEA (Rumbley et al., 1998).

Outras células presentes nos tecidos podem participar da regulação da inflamação no granuloma. Mastócitos, basófilos e eosinófilos quando ativados pelos receptores de imunoglobulinas FcR1 atuam nessa regulação através da secreção de citocinas (IL-3 e IL-4) (Keegan et al., 1992).

Na esquistossomose, a reação granulomatosa é comumente seguida de fibrose que pode produzir alterações circulatórias graves nos órgãos afetados, e torna-se o principal fator de morbidade. A formação de granulomas e a sua evolução para a fibrose dependem de fatores como citocinas e ativação de sub-populações específicas de linfócitos (Pearce et al., 2002; Phillips et al., 1986; Cheever, 1997; Cheever et al., 1998). A injeção de IL-12 junto com ovos de *S. mansoni* por via intraperitoneal, antes da infecção percutânea com cercárias, reduz a fibrose em torno do granuloma sem reduzir o número de ovos ou de vermes adultos (Wynn et al., 1995). Os indivíduos que apresentam maior fibrose geralmente apresentam um perfil de citocinas com predominância de IL-13 e de TNF, sendo que o IFN $\gamma$  teria uma ação oposta (Pearce et al., 2002; Caldas et al., 2008).

O modelo que utilizamos no estudo dos granulomas, inoculação endovenosa de ovos de *S. mansoni*, permite estudar vários granulomas no mesmo estágio do desenvolvimento, ou seja, sincronizados, uma vez que os ovos chegam ao pulmão ao mesmo tempo. Granulomas pulmonares isolados de animais nas diferentes fases de infecção natural por *S. mansoni* e inoculados com ovos por via endovenosa, apresentavam

padrões diferentes de secreção de citocinas (Chensue et al., 1994). A secreção de IL-4 é mais pronunciada nos primeiros dois dias de formação do granuloma em animais com infecção natural em fase inicial. Essa produção é elevada mesmo na ausência de estímulos no meio de cultura. A secreção de IFN  $\gamma$  no meio de cultura na fase inicial ou crônica da infecção não apresentou diferenças, sendo independente da presença de estímulo antigênico. A IL-4 e o IFN $\gamma$  modulam atividades de macrófagos, como produção de IL-1 e de TNF  $\alpha$ . Tanto em animais na fase inicial, quanto na fase crônica da infecção, observa-se a mesma seqüência de eventos com produção inicial de IL-1 e tardia de TNF $\alpha$ , apenas com níveis bem menores em animais crônicos. O uso de anticorpos neutralizantes para IL-4 em animais com granulomas pulmonares esquistossomóticos e submetidos a transferência de células linfóides do baço de animais em fase inicial, causaram uma redução de 40 a 45% no tamanho dos granulomas, sendo que anticorpos neutralizantes para IFN $\gamma$ , não causaram alterações. Morfologicamente os autores observaram que animais submetidos ao tratamento com anticorpos neutralizantes para IL-4 e IFN $\gamma$  apresentaram, nos granulomas, redução da celularidade, redução do número de eosinófilos, da formação de células epitelióides e de células gigantes. O papel exercido por IL-4 seria o de recrutar as células nas fases iniciais da formação do granuloma esquistossomótico.

Em outro estudo, (Chensue et al., 1992) observou-se que diferentes agentes de lesão causam diferentes padrões de secreção de citocinas. Animais inoculados com “beads” revestidos por PPD ou SEA apresentam perfil de citocinas diferentes. O primeiro com perfil Th1 e o segundo com perfil Th2. Sendo que, no granuloma induzido por PPD ou SEA, a citocina TNF  $\alpha$  possui papel importante, ocorrendo redução de 40% e 10% do granuloma, respectivamente, quando ausente. Macrófagos isolados dos granulomas mostram níveis de

TNF e IL-6 diferentes se isolados de granulomas contendo “beads” sensibilizados com PPD ou SEA, sendo que o TNF é mais elevado em beads com PPD e a IL-6 em beads com SEA.

O uso de anticorpos neutralizantes para IFN  $\gamma$  causa redução dos granulomas induzidos por PPD (20%) e aumento dos granulomas induzidos por SEA (50%) (Chensue et al., 1995). Anticorpos neutralizantes para TNF  $\alpha$  causam redução do granuloma induzidos por PPD (40%) e por SEA (15%). O bloqueio de IL-10 não causa alterações.

Wynn (1993) e colaboradores demonstraram através da detecção de RNAm no fígado, que animais infectados com *S. mansoni* apresentavam níveis elevados de citocinas tanto de padrão Th1 (10 a 15 vezes) quanto Th2 (17 a 65 vezes). Em animais inoculados por via endovenosa com ovos de *S. mansoni* e com granulomas pulmonares, os autores demonstraram que, a partir do primeiro dia, há aumento de secreção de IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, a partir do terceiro dia há aumento de IL-2, IL-4 e IL-10 e a partir do sexto dia observa-se aumento de IL-5 e TNF  $\alpha$ . O uso de anticorpos neutralizantes para IL-4 e IL-2 causaram redução no diâmetro dos granulomas a partir do sexto dia com acentuação entre 10 e 14 dias.

Observa-se a secreção de citocinas na esquistossomose hepática murina com uma mudança de padrão inicialmente do tipo Th1 (IL-2, IFN  $\gamma$ ) para Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) (Jacob et al., 1998), relacionadas com fenômenos de hipersensibilidade do tipo imediata, eosinopoiese e produção de imunoglobulina E. Já foi demonstrado que o tratamento com anticorpos anti IL-4 reduz drasticamente o tamanho do granuloma ao redor de ovos de *S. mansoni* no pulmão, não afetando o tamanho dos granulomas presentes no fígado no mesmo animal (Cheever et al., 1998). Anticorpos neutralizantes para IL-2 e IL-4 diminuem o tamanho do granuloma devido à redução da ativação de linfócitos CD4 e redução da diferenciação e expansão de linfócitos Th2 (Chensue et al., 1992).

A citocina TNF  $\alpha$  possui a capacidade de restaurar a formação de granulomas ao redor de ovos de *S. mansoni* em animais com imunodeficiência severa combinada (SCID) (Jacob set al., 1997; Ritter et al., 1996). Lukacs e colaboradores (1994) demonstraram que TNF  $\alpha$  possui papel importante na formação dos granulomas, sendo que o tratamento in vivo com anticorpos contra esta citocina causa redução no tamanho dos granulomas. Esses autores também demonstraram correlação entre os níveis de TNF  $\alpha$  e de expressão de ICAM-1 nas células linfocitárias.

A formação do granuloma esquistossomótico é mediada por linfócitos T CD4, e várias moléculas coestimulatórias também participam. Camundongos deficientes em CD80 (B7-1) e em CD86 (B7-2) não produzem resposta granulomatosa adequada aos ovos de *S. mansoni*, sendo que apenas a presença de CD86 restaura essa capacidade. O bloqueio da molécula CD86 causa diminuição na produção de IL-4, IL-5 e IL-13 por linfócitos CD4+ (Pearce et al., 2002). A modulação do granuloma na forma crônica da esquistossomose está relacionada com a diminuição de MHC-II e CD86, associada a níveis elevados de IL-10 (Jacobs et al., 1998).

Acredita-se que a fibrose patológica na esquistossomose mansonica deve-se a um balanço inadequado entre os perfis de secreção de citocinas de padrão Th-1 (IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  e IL-2), e de padrão Th-2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13) (Lenzi et al., 1997). A resposta de padrão do tipo 2 exercem proteção nas fases iniciais da doença mas são responsáveis pelo desencadeamento da fibrose. Animais nocautes para IL-4 e para IL-10 apresentam maior mortalidade nas fases iniciais da esquistossomose. Um mecanismo postulado para explicar a diferença entre as manifestações clínicas e para explicar a transição Th1/Th2 seria a diferença nos macrófagos. Estas células são classificadas como macrófagos com padrão clássico (NOS-2) e macrófagos com padrão alternativo (Arg-1) (Mill set al., 2000; Wyn et

al., 2004) e apresentam padrões de ativação diferentes conforme a linhagem dos animais. Os macrófagos influenciam a natureza da resposta a ovos de *S. mansoni* inoculados no pulmão, e padrões de ativação opostos podem ser responsáveis por quadros morfológicos distintos. Interessantemente estas células ativadas produzem fatores que podem controlar a extensão do processo inflamatório, de uma maneira parácrina, como demonstrado em relação a molécula RELM- $\alpha$  (Resistin Like Molecule). Animais nocaute para essa molécula exibem inflamação mais severa, granulomas maiores e maior expressão de genes para citocinas do tipo Th-2 (Nair et al., 2009).

Observa-se em experimentos de análise global de expressão gênica, em animais Knockout, que os animais polarizados para uma resposta imune Th1 (IL10<sup>-/-</sup> e IL4<sup>-/-</sup>) ou polarizados para uma resposta Th2 (IL10<sup>-/-</sup> e IL12<sup>-/-</sup>) apresentam granulomas pulmonares que ocupam extremos opostos, tanto em celularidade quanto em tamanho (Sandler et al., 2003). Os animais com padrão Th1 possuem granulomas menores e com menor quantidade de eosinófilos, já nos animais com padrão Th2 ocorre o oposto. O padrão de expressão gênica dos animais com padrão Th1 apresenta predominância de moléculas relacionadas à fase aguda, quimiocinas para neutrófilos, monócitos e linfócitos e relacionadas com apoptose. Os animais polarizados para uma resposta imune Th2 expressam genes relacionados com moléculas de reparo, metaloproteinases e quimiocinas para monócitos e eosinófilos. Observa-se uma diferença na deposição de colágeno, sendo que há um acúmulo maior nos animais com citocinas do tipo Th2 (Sandler et al., 2003).

## **1.8 - Moléculas de Adesão**

Tanto a deposição de ovos nos tecidos quanto a migração dos leucócitos para a formação dos granulomas depende da expressão de moléculas de adesão.

As moléculas de adesão podem ser agrupadas em três famílias (caderinas, selectinas e integrinas) e uma superfamília (imunoglobulinas) de proteínas. A interação entre ovos de *S. mansoni* e o endotélio, tem sido muito investigada. Logo após a oviposição o endotélio recobre os ovos, sendo esse fenômeno mais acentuado na presença de soro quando realizado em cultura. As células endoteliais reconstituem-se em cerca de 4 horas. Nessa fase inicial, não se observa resposta inflamatória, mas ovos já embrionados desencadeiam fenômenos inflamatórios (File, 1995). In vitro, observa-se a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais expostas ao antígeno do ovo somente mediante uma exposição concomitante a TNF  $\alpha$  (Lukacs et al., 1994).

Moléculas de adesão que apresentam homologia com membros da família das imunoglobulinas, que estão envolvidas nos processos de migração dos leucócitos são: MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) e VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1). A integrina  $\alpha 4\beta 7$  possui papel como receptor para migração nas mucosas e também reconhece VCAM-1 e a fibronectina, participando de fenômenos inflamatórios. A fase de rolamento no endotélio ocorre sem ativação leucocitária; a ativação ocorre na fase mediada por integrinas (Hogg et al., 1995).

O fígado expressa constitutivamente ICAM-1 nas células endoteliais dos sinusóides. Na infecção por *S. mansoni* ou após a injeção de “beads” contendo antígenos solúveis do ovo (SEA), observa-se aumento expressão de ICAM-1 a partir do terceiro dia de exposição e há correlação entre a expressão de moléculas de adesão e a deposição de ovos no fígado. A interação mais importante na formação dos granulomas se dá entre ICAM-1 e seu ligante LFA-1. Os granulomas crescem até a oitava ou décima semana de infecção, coincidindo com o padrão de expressão de ICAM-1. A marcação imunohistoquímica para ICAM-1,

inicialmente fraca e difusa, acentua-se a partir da oitava ou décima semana com marcação mais intensa ao redor do granuloma, principalmente nas células endoteliais; após vinte semanas, há apenas fraca marcação nas margens do granuloma (Ritter et al., 1996).

Esses estudos demonstram que ICAM-1 é importante para a formação do granuloma e que elementos secretados pelos ovos de *S. mansoni* podem induzir a expressão de ICAM-1, sendo isto precedido pela produção de TNF  $\alpha$  (Lukacs et al., 1994; Ritter et al., 1996). Observam-se dois padrões de expressão de ICAM-1, o primeiro com marcação em todo o granuloma, presente na oitava semana; outro, com marcação na periferia está presente no início da terceira semana e retorna, de forma mais pronunciada, na vigésima semana. A análise por imunomicroscopia eletrônica revela co-localização de ICAM-1 e pigmento esquistossomótico na face luminal dos hepatócitos, sinusóides, macrófagos e eosinófilos (Jacob et al., 1997).

Animais deficientes para o gene de ICAM-1 não apresentam alteração na formação dos granulomas devido à maior expressão compensatória de VCAM-1. Animais SCID apresentam marcação imunohistoquímica significativa para ICAM-1, mesmo na ausência de resposta imunológica, provavelmente devido à interação direta entre o endotélio vascular e o ovo de *S. mansoni* (Jacob et al., 1997; Jacob et al., 1998; Ritter et al., 1996).

Formas solúveis de ICAM-1 e de Selectina-E estão presentes no soro de pacientes com esquistossomose mansônica, havendo diferenças nas concentrações nas diferentes formas clínicas. Pacientes com formas mais graves apresentam maiores níveis. Acredita-se que as formas solúveis de ICAM-1 apresentariam um papel imunorregulador por bloquear sinais co-estimulatórios das células apresentadoras de antígenos (Jacob et al., 1998).



## 1.9 - Pulmões

Em humanos adultos normais, o trato respiratório possui uma área de aproximadamente 70 m<sup>2</sup>, que está diretamente em contato com o meio ambiente exterior. Apresenta uma via de condução e uma estrutura parenquimatosa com extensa vascularização que é responsável pela hematose. A via de condução é revestida por células ciliadas, células secretoras de muco e linfócitos T intra-epiteliais. Na lâmina própria há mastócitos, linfócitos B e plasmócitos secretores de IgA. Possui também células dendríticas residentes, predominantemente mielóides.

Os pulmões possuem um sistema inato que mantém a esterilidade alveolar e é constituído por um mecanismo ciliar e muco. Há também vários grupos de moléculas que auxiliam esta situação. Entre essas substâncias estão as defensinas, as catelicidinas e as colectinas (Zhang et al., 2000). A resposta adaptativa é desencadeada quando este sistema é sobrepujado.

Nos pulmões, a atividade imunológica adaptativa está expressa em duas regiões distintas: no tecido linfóide associado aos brônquios, BALT (na sigla em inglês), e nos linfonodos do mediastino.

Os alvéolos pulmonares são revestidos por células planas denominadas pneumócitos, de tipos I e II, e possuem em seus lumens macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. O estroma intersticial alveolar possui macrófagos, células dendríticas, linfócitos T, linfócitos B, mastócitos, mas não contém plasmócitos. Na presença de patógenos, o tecido linfóide pulmonar se desvia de seu estado basal, para um estado inflamatório. Macrófagos alveolares provavelmente participam desta mudança. A ativação do endotélio em vasos pulmonares aumenta a expressão de marcadores de “homing”  $\alpha 4\beta 1$

e CCR10, que são expressos constitutivamente no epitélio respiratório e cujos ligantes são VCAM1 e CCL28. Por sua vez, no intestino os mecanismos de “homing” levam a expressão de  $\alpha 4\beta 7$  e CCR9. Células endoteliais dos capilares pulmonares expressam constitutivamente ICAM-1 e P-selectina cujos ligantes são LFA-1 (antígeno associado a função linfocitária) e PSGL1 (glicoproteína ligante de P-Selectina 1). Outros ligantes descritos são CXCR6-CXCL16 e a integrina  $\alpha 1\beta 1$  (VLA-1). As células dendríticas pulmonares exibem alto ritmo de reciclagem (turnover) e são rapidamente mobilizadas durante infecções ou em re-exposição a antígenos previamente contactados. Essa mobilização em estados basais envolve a participação de CCR1 e CCR5.

As células epiteliais alveolares produzem óxido nítrico, quimiocinas e citocinas (interferons, G-CSF e GM-CSF) e ICAM-1. Os macrófagos alveolares fagocitam antígenos que alcançam a luz alveolar, e impedem sua apresentação ao BALT; não migram para linfonodos regionais e não possuem papel significativo na apresentação antigênica. Os macrófagos alveolares induzem a expressão de  $\alpha \nu\beta 6$  nas células epiteliais alveolares levando a ativação de TGF $\beta$  localmente. A manutenção do número de macrófagos alveolares se dá pela proliferação local de seus precursores e em estados inflamatórios através da emigração de monócitos sanguíneos, que usam CCL2-CCR2 em sua migração.

Células T regulatórias participam da resposta a agentes infecciosos e podem prevenir o desencadeamento de reações alérgicas no pulmão, um mecanismo que pode ser rompido em reações inflamatórias através da ativação de células dendríticas por patógenos com grande secreção de IL-6 e IL-1 (Holt et al., 2008).

## 2 – Objetivos

### **Objetivo geral:**

Caracterizar os mecanismos envolvidos na redução de granulomas esquistossomóticos pela injeção intraperitoneal de ovalbumina (OVA) em camundongos previamente tolerizados por via oral com OVA.

### **Objetivos específicos:**

- 1- Analisar histologicamente os granulomas pulmonares avaliando o tamanho, composição celular e grau de fibrose nos dias 1, 5, 11, 14 e 18 após a inoculação dos ovos;
- 2 - Analisar por imunofluorescência o infiltrado inflamatório na região contendo os ovos em fragmentos de pulmão coletados 18 dias após a inoculação dos ovos, para avaliar a presença de:
  - 2.1 – linfócitos T através da marcação com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4.
  - 2.2 - macrófagos através da marcação com anti-F4/80.
  - 2.3 – miofibroblastos através da marcação com anti- $\alpha$ SMA.
- 3- Analisar por imunofluorescência a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1/CD54) nas células que compõem o granuloma periovular e no tecido pulmonar ao redor do granuloma, 18 dias após a inoculação dos ovos;
- 4- Avaliar as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  em extrato de pulmão, 14 dias após a inoculação dos ovos.
- 5 - Avaliar as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$  no soro, nos dias 1, 5, 14 e 18 após a inoculação dos ovos.

## **3 – Materiais e Métodos**

### **3.1 - Animais.**

Camundongos C57BL/6 adultos jovens (8 semanas), fêmeas, foram obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG e permaneceram no Biotério de Animais Experimentais do Departamento de Morfologia (Câmara Climatizada) com ração padrão para camundongos e água, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

### **3.2 - Antígenos.**

Foi utilizada ovalbumina cristalizada (Ova, Sigma Grau V).

### **3.3 - Tratamento oral para obtenção de tolerância.**

Camundongos receberam “ad libitum” uma solução de clara de ovo na diluição de 1:5 em água, contendo em média 4 mg de ovalbumina por ml (Faria 1993), em lugar da água, por três dias consecutivos. As garrafas contendo a solução foram trocadas diariamente para prevenir contaminação. Os grupos controle receberam apenas água filtrada. Este tratamento terminou 7 dias antes da imunização parenteral.

### **3.4 - Granulomas pulmonares.**

Sete dias após a indução da tolerância oral, 2000 ovos vivos foram injetados pela veia da cauda em 0,2 ml de solução salina 1,8%. Os ovos de *S. mansoni* foram obtidos a partir do fígado de camundongos Swiss com 8 a 12 semanas de infecção por 70 cercárias, gentilmente cedidos pela Professora Débora Negrão Correa do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG.

### **3.5 - Imunizações.**

Camundongos pré-tratados com OVA por via oral (grupo tolerante) e controles (grupo imune) receberam uma imunização intraperitoneal (i.p.) com 10 µg de Ova + 1,6 mg Al(OH)<sub>3</sub> em 0,25 ml de salina poucos minutos antes da inoculação i.v. dos ovos de *S. mansoni*. Um grupo controle não foi imunizado (grupo granuloma).

### **3.6 - Sangria.**

Para obtenção de soro uma amostra de sangue foi coletada do plexo axilar antes da retirada dos pulmões, e, após a coagulação o soro foi separado e congelado a -20°C para teste dos anticorpos anti-OVA e anti-SEA (antígeno solúvel do ovo) e análise quantitativa de citocinas por “cytometric bead array” (CBA).

### **3.7 - ELISA.**

Anticorpos anti-Ova e anti-SEA do soro foram detectados por ensaios imunoenzimáticos padrão. Em resumo, placas de poliestireno (Nunc) foram sensibilizadas overnight a 4°C com 2 µg por well de proteína purificada, lavadas com salina contendo 0.05% Tween-20, saturadas com 0.25% caseína diluída em salina tamponada (PBS). Depois de novamente lavadas adicionou-se o soro em diluições sucessivas de 1:50 a 1:1600. Depois de 1 hora, a 37°C, as placas foram lavadas, incubadas por 1 hora a 37°C com imunossoro de cabra anti-Ig de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotechnology). Depois de novamente lavadas, adicionou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ortofenilenodiamino (OPD) para revelar a reação. Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:20, e lida a 492 nm em leitor de ELISA (BioRad, Hercules, CA). Os resultados foram obtidos após a soma das densidades óticas das seis diluições dos soros dos animais individuais. Cada resultado representa a média±SEM de cinco animais por grupo.

### **3.8 - Histologia.**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical nos dias 1, 5, 11, 14 e 18 após a injeção i.v. dos ovos. Para avaliação histológica, um dos pulmões foi fixado por imersão em solução de formalina de Carlson em tampão Milloning (pH 7.0) por 24h. Após a fixação, o material histológico foi transferido para álcool 70° e submetido às etapas que se seguem em temperatura ambiente: **Desidratação:** séries graduais de etanol (70%-100%), 30 minutos cada; **Diafanização:** xilol em temperatura ambiente (3X, 20 minutos cada); **Infiltração:** Parafina a 56°C (3X, 20 minutos cada); **Inclusão:** Parafina a 56°C. Cortes de 4µm foram corados com hematoxilina/eosina ou Tricromático de Gômori. Imagens digitalizadas foram obtidas usando-se um microscópio ótico (Olympus BX50 com câmera Olympus Q Colour 3) e analisadas utilizando-se o software Q-Capture Pro (Q Imaging, Canada).

### **3.9 - Processamento do material para imunofluorescência.**

Um dos pulmões foi fixado em solução de metanol 80% - DMSO (dimetil sulfóxido) 20%, imerso em gelo seco (-54°C) e transferido para congelador a -80°C onde permaneceu por cerca de sete dias para a crio-substituição (Carvalhães et al., 2006). Em seguida, o material foi transferido para congelador a -20°C por um a dois dias e levado para a temperatura ambiente para as etapas de desidratação, diafanização, infiltração e inclusão em paraplast. Após a inclusão em paraplast, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura e submetidos à técnica de imunofluorescência com os seguintes anticorpos primários: rato anti-F4/80 (eBioscience San Diego, CA), rato anti-CD3 (Pharmigen San Diego, CA), rato anti-CD4 (Pharmigen, San Diego, CA), camundongo anti- $\alpha$ -SMA (Sigma St. Louis, MO) e camundongo anti-ICAM-1 (R&D Systems, San Diego, CA). Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados em temperatura ambiente com anticorpos

secundários cabra anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) ou cabra anti-IgG de rato conjugado com FITC (eBioscience San Diego, CA). Após lavagem em PBS, os núcleos foram marcados com 4'6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) e os cortes foram novamente lavados com PBS antes de serem montados com uma mistura de 10% 1.0 M Tris-HCl, pH 9.0 and 90% glicerol.

No início do experimento, foi feito o controle sem o uso dos anticorpos primário e secundário para verificar se o tecido possuía auto-fluorescência. Este resultado foi negativo para animais de todos os grupos experimentais, exceto o ovo de *S. mansoni* cuja auto-fluorescência foi excluída das análises. Controles utilizando somente os anticorpos secundários foram feitos em todos os experimentos e foram negativos em todos os casos.

### **3.10 - Análise através de microscopia confocal.**

Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscopia confocal (Zeiss 510META; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Foram coletadas 3 imagens de cada amostra com as objetivos 40x ou 63x. As imagens foram analisadas em escala de cinza através do programa ImageTool 2.0 (<http://www.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). A intensidade de fluorescência é fornecida através da unidade “Nível de Cinza”, que varia do valor zero (preto) ao valor 255 (branco). Quanto mais próximo ao valor 255, maior a intensidade fluorescência. Para a análise quantitativa todos os parâmetros de configuração do microscópio obtidos no início da aquisição dos dados foram mantidos para cada anticorpo usado para as amostras de todos os grupos experimentais e controle do anticorpo secundário, tornando o nível de fluorescência uniforme, confiável e possível de comparação.

### **3.11 - Análise através de imunohistoquímica**

Cortes histológicos dos pulmões, fixados em formol tamponado e incluídos em parafina, com espessura de 4 µm foram submetidos à análise imunohistoquímica para detecção de ICAM-1 (Caltag Laboratories, San Francisco, CA, Rat Monoclonal Antibody to Mouse CD54 ICAM-1), pela técnica de imunohistoquímica direta, usando anticorpo biotilado, estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina (DAB). A diluição do anticorpo obtida para melhores resultados foi de 1/40. A reação foi realizada no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral utilizando-se o Kit Ultravision Detection System da LAB Vision Corporation. Os cortes são desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool seguida de água corrente. Em seguida são submetidos a reativação antigênica utilizando a solução Retrieval (Dako) conforme recomendações do fabricante. Logo após, os cortes são submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena através de uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. Para evitar ligações inespecíficas, as lâminas são incubadas com soro bloqueio fornecido pelo Kit. Feito isso, as lâminas são incubadas com o anticorpo primário (anti-CD54) biotilado, por uma hora. Após esse passo, as lâminas são incubadas com o complexo Estreptavidina-peroxidase fornecido pelo Kit. A revelação é feita com uma solução de DAB fornecida pelo Kit. A contra coloração é realizada com Hematoxilina. No final, a lâmina é montada conforme rotina histológica convencional.

### **3.12 - Análise quantitativa das citocinas séricas e do pulmão**

Amostras de soro foram coletadas como previamente descrito e armazenadas a – 20°C até o uso. Cem miligramas de tecido pulmonar de todos os animais de cada grupo experimental foram homogeneizadas em 1 ml de PBS contendo inibidores de proteases ( 0,1 mM de fenilmetilsulfonil fluoreto, 0.1 mM de Cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e



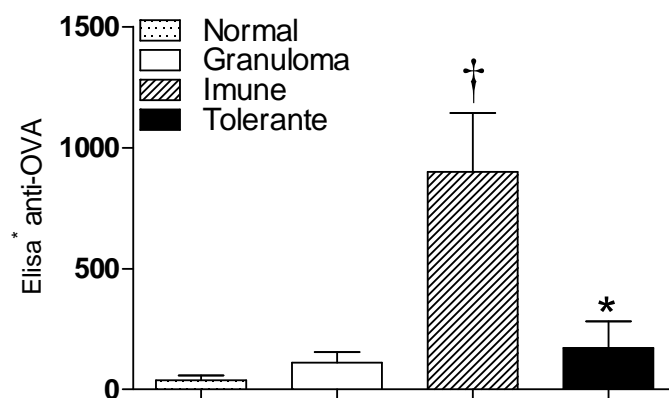
20 KI aprotinin A) e 0,05% de Tween 20. As amostras eram então centrifugadas por 10 minutos em 3000 RPM e o sobrenadante usado para a análise. As citocinas ( IL-2, IL-4, IL-5, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ) presentes no soro e no pulmão foram dosadas com o Kit CBA (Cytometric Bead Array) Th1/Th2 conforme especificações do fabricante (BD Biosciences, CA, USA).

### **3.13 - Análise estatística.**

Os resultados foram analisados utilizando-se o software Graphpad Prism 4 (GraphPad Software, CA, USA), através de análise de variância, ANOVA, e em seguida aplicado o teste Student-Newman-Keuls. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM.

## **4 – Resultados**

Para avaliar os efeitos indiretos da injeção parenteral de uma proteína tolerada na formação de granulomas, camundongos tratados com OVA por via oral, e animais controle não tratados com OVA, receberam uma injeção i.p. de Ova em adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> pouco antes da inoculação i.v. de 2000 ovos vivos de *Schistosoma mansoni* por uma veia da cauda. Outro grupo controle recebeu apenas a inoculação de ovos, sem imunização i.p. Para avaliar o estabelecimento da tolerância oral à OVA, anticorpos anti-OVA foram dosados no soro.

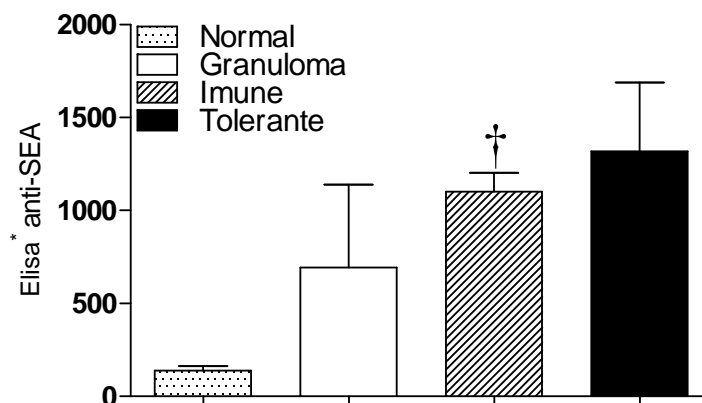


**Figura 1** – O pré-tratamento com OVA por via oral inibe o aumento de anticorpos anti-OVA no soro. Anticorpos anti-OVA foram medidos por ELISA no soro de camundongos naïve (normal, barra pontilhada) ou 18 dias após a inoculação i.v. de ovos de *S. mansoni* em camundongos não imunizados (granuloma, barra branca), imunizados com OVA (imune, barra hachurada) e imunizados com OVA após pré-tratamento oral com OVA (tolerante, barra preta). Elisa\* foi obtido após a soma das densidades ópticas de seis diluições do soro de 1:50 a 1:1600. Os resultados dos gráficos representam a média ± SEM. \*p ≤ 0,05 tolerante versus imune; † p ≤ 0,05 imune versus normal.

Na figura 1 podemos ver que os animais tratados com OVA por via oral antes da imunização i.p apresentam menos anticorpos anti-OVA do que aqueles que foram

imunizados com OVA sem o pré-tratamento por via oral, atestando o estabelecimento da tolerância oral a OVA.

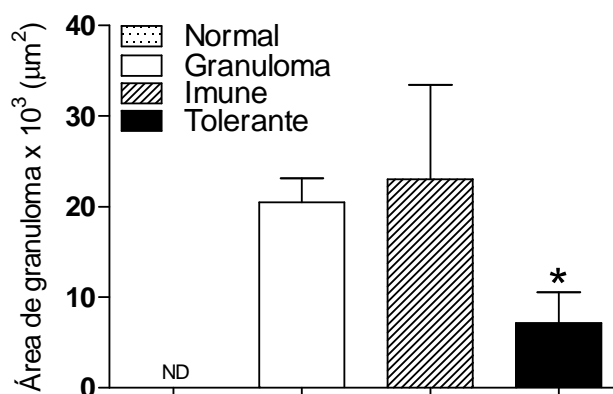
Anticorpos anti-SEA também foram dosados no soro para verificar se a injeção do antígeno tolerado com adjuvante  $Al(OH)_3$  concomitante com a inoculação dos ovos de *S. mansoni* resultaria na inibição da formação de anticorpos anti-SEA. Podemos ver na figura 2 que a re-exposição parenteral ao antígeno tolerado (OVA), não inibiu a formação de anticorpos anti-SEA.



**Figura 2** – A re-exposição parenteral ao antígeno tolerado em  $Al(OH)_3$  não reduz o nível de anticorpos anti-SEA. Anticorpos anti-SEA foram medidos no soro de camundongos naïve (barra pontilhada) ou 18 dias após a injeção de ovos de *S. mansoni* em camundongos não imunizados (barra branca), imunizados com OVA (barra hachurada) e imunizados com OVA após pré-tratamento oral com OVA (barra preta). Elisa\* foi obtido após a soma das densidades ópticas de seis diluições do soro de 1:50 a 1:1600. Os resultados dos gráficos representam a média  $\pm$  SEM. †  $p \leq 0,05$  imune versus normal.

Embora os efeitos indiretos da tolerância oral desencadeados pela injeção i.p de OVA em  $Al(OH)_3$  em animais tolerantes a OVA não tenham inibido a formação de

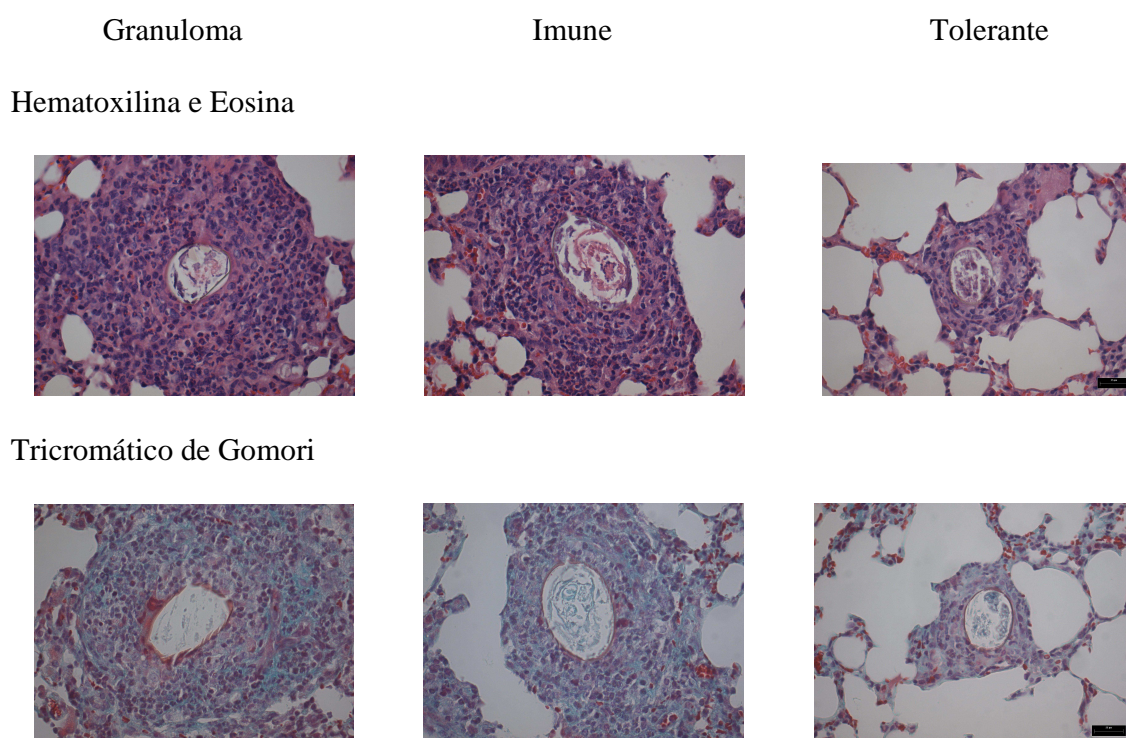
anticorpos anti-SEA, eles inibiram a formação dos granulomas. Na figura 3 podemos ver que o tamanho dos granulomas ao redor de ovos de *S. mansoni* aos 18 dias após a inoculação dos ovos é menor nos camundongos que receberam a injeção i.p. do antígeno tolerado.



**Figura 3** – A re-exposição parenteral ao antígeno tolerado reduz a área dos granulomas. Granulomas pulmonares foram medidos aos 18 dias após a inoculação de ovos de *S. mansoni*. em camundongos não imunizados (barra branca), imunizados com OVA (barra hachurada) e imunizados com OVA após pré-tratamento oral com OVA (barra preta). Os resultados dos gráficos representam a média  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0,05$  tolerante versus imune. ND: Não detectado.

A análise qualitativa dos granulomas corados com HE mostrou que há redução na quantidade de células, sem que haja alterações significativas na composição celular dos granulomas, uma vez que mesmo os granulomas menores do grupo tolerante apresentam

eosinófilos, macrófagos e linfócitos (figura 4). Após análise qualitativa das lâminas coradas com HE, podemos concluir também que o grupo tolerante apresenta redução do exsudato inflamatório difuso e ao redor das vias aéreas principais, ou seja, há menor exsudação alveolar de células inflamatórias. Os granulomas menores de animais do grupo tolerante também apresentam deposição de colágeno, como pode ser visto após coloração com tricromático de Gomori (figura 4).

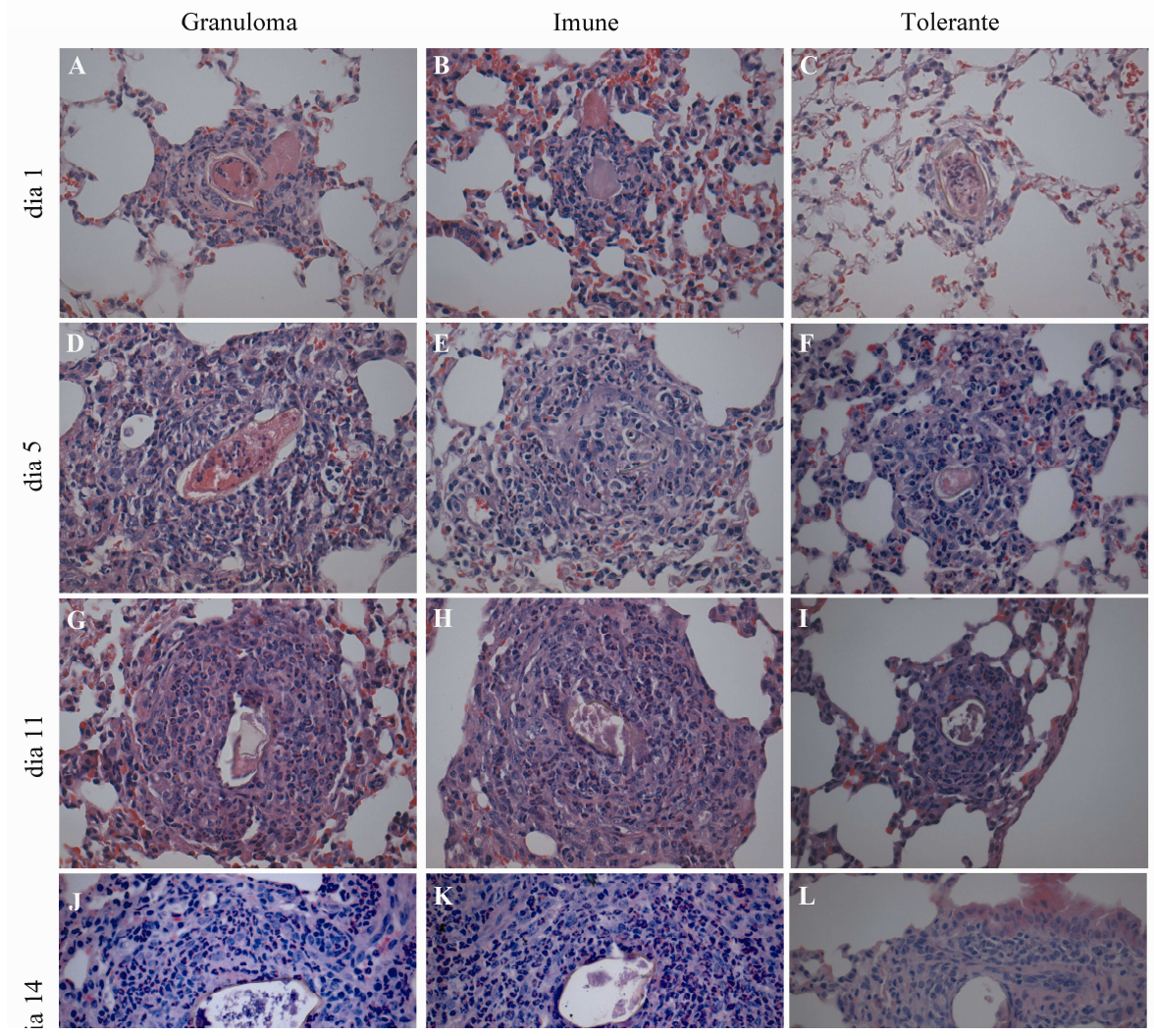


**Figura 4** – Granulomas pulmonares 18 dias após inoculação de ovos de *S. mansoni* em camundongos não imunizados (granuloma), imunizados com OVA (imune) e imunizados com OVA após pré-tratamento oral com OVA (tolerante). Corte corado em HE ou tricromático de Gomori com aumento de 400X. Barra de escala = 25µm.

Os granulomas que se formam ao redor de ovos de *S. mansoni* apresentam características morfológicas distintas nas fases classificadas como pré-granulomatosa e granulomatosa, sendo que na fase pré-granulomatosa há exsudação de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e alterações vasculares como microtrombos. Na fase

granulomatosa, há organização destes elementos celulares, formação de células gigantes e fibrose. A figura 5 mostra os granulomas representativos de cada grupo após coloração com HE nos dias 1, 5, 11 e 14 após a inoculação i.v. dos ovos. As alterações observadas nos animais tolerantes podem ser detectadas desde as fases iniciais sendo que nos animais tolerantes a OVA a re-exposição parenteral a esta proteína reduz o tamanho dos granulomas como mostra também a figura 6.

As análises qualitativas (em maior aumento) dos granulomas no dia 1 mostram um infiltrado inflamatório com predominância de neutrófilos e macrófagos ao redor dos ovos em todos os grupos, sendo muito menos intenso no grupo tolerante. No dia 5, macrófagos, eosinófilos e alguns linfócitos podem ser detectados. Nos dias 11 e 14, os granulomas estão mais organizados e alguns fibroblastos podem ser detectados. Os granulomas no grupo tolerante seguem o mesmo padrão de organização, porém não alcançam o mesmo tamanho dos demais grupos.



ERROR: ioerror  
OFFENDING COMMAND: image

STACK: