

Raphaela Mendes Fernandes de Souza Lôbo

**Efeitos do Envelhecimento  
na Tolerância Oral e na  
Alergia Alimentar**

**BELO HORIZONTE**

**2011**

**Raphaella Mendes Fernandes de Souza Lôbo**

# **Efeitos do Envelhecimento na Tolerância Oral e na Alergia Alimentar**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Caetano de Faria**

**Área de Concentração: Imunologia**

**Tese 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 doutora.**

**BELO HORIZONTE**

**2011**

**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: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG).**

**"É impossível avaliar a força que  
possuímos sem medir o tamanho do  
obstáculo que podemos vencer, nem o  
valor de uma ação sem sabermos o  
sacrifício que ela comporta."**

**(H. W. Beecher)**

# AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles, que direta ou indiretamente, cooperaram na realização deste trabalho. Entretanto, dirijo agradecimentos especiais à:

**Deus**, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e nunca desistir, mostrando o caminho certo para as incertezas;

Minha orientadora **Ana Maria Caetano de Faria**, que fez desse trabalho um ideal, mesclando a arte de ensinar com o dom da convivência, transformando o mestre em amiga, transmitindo suas experiências que grandemente ajudaram na minha formação. Ana, o meu profundo agradecimento e respeito, que sempre serão poucos diante do muito que você ofereceu.

À todos os colegas do Laboratório de Imunobiologia, **Andréia, Ana Cristina, Archimedes, Bernardo, Thaís e Rafael Rezende**, pelo ótimo convívio e aprendizado constante.

Aos amigos inesquecíveis **Andrezza, Samara, Rafael Pires, Magda, Frank, Bárbara, Flávia e Josiely**, que com muito bom humor e competência, me ajudaram incansavelmente em todo trabalho. Meu eterno agradecimento a todos!

Aos professores **Nelson, Cláudia e Tomaz** por aumentarem meu interesse pela ciência;

À **Celise** pelo auxílio nos assuntos acadêmicos;

À **Ildinha, Ana Cecilia e Luciana**, pelo cuidado extremo com os animais idosos e com o biotério;

À **Nilda**, por manter nosso laboratório sempre impecável;

Aos meus pais, **Pedro e Dalva**, que sempre me apoiaram e muitas vezes, acordaram cedo para me levar à UFMG. Amo vocês!

Ao meu marido **Alan**, que foi um grande aliado em todo esse árduo período, minha eterna gratidão pelos inúmeros incentivos de apoio, compreensão e paciência, cuidando do nosso filho **Pedro**, desde 4 meses até hoje, com muito amor para que eu pudesse “viajar” para UFMG todos os dias às 5 horas da manhã e voltar só à noite. Meus amores, minhas sinceras desculpas pelos dias e finais de semana de ausência, roubando-lhes meu convívio como esposa e mãe. Vocês são minha vida!

Aos meus irmãos, **Jansen e Ráisa**, pelo companheirismo e compreensão pelos dias de estresse. Obrigada!

À família Lobo; **Josi, Gisele, Celci, Marcela, Sérgio Júnior, D. Carmélia**, e principalmente **D. Marta**, que me incentivou e cuidou com todo carinho do Pedro nesses últimos anos que estive fora todos os dias. Meus eternos agradecimentos;

Aos amigos, cunhada, concunhados, enfim...

**A todos o meu obrigado por permitirem que esta  
tese se tornasse uma realidade!**

## Sumário

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS _____   | I   |
| LISTA DE TABELAS _____   | III |
| LISTA DE ABREVIações _____   | IV  |
| RESUMO _____   | VII |
| ABSTRACT _____   | X   |
| 1. Introdução _____  | 1   |
| O Tecido Linfóide associado às mucosas _____   | 1   |
| O Tecido Linfóide associado ao intestino _____   | 2   |
| A Tolerância Oral _____  | 6   |
| A Alergia Alimentar _____  | 14  |
| O Envelhecimento _____   | 20  |
| 2. Objetivo Geral _____  | 27  |
| Objetivos Específicos _____  | 27  |
| 3. Materiais e Métodos _____   | 30  |
| A. Animais _____   | 30  |
| B. Protocolo Experimental para Indução de Tolerância Oral em camundongos BALB/c idosos: _____      | 30  |
| C. Protocolo Experimental para Indução de alergia alimentar em camundongos BALB/c idosos: _____    | 31  |
| D. Protocolo Experimental para Indução de alergia alimentar em camundongos idosos DO. 11.10: _____ | 33  |
| E. Indução de Tolerância Oral _____  | 34  |
| F. Indução de alergia alimentar _____  | 35  |
| G. Obtenção dos soros _____  | 35  |
| H. Obtenção do muco intestinal _____   | 35  |
| I. Medida de anticorpos séricos totais anti-Ova por ELISA _____                                    | 36  |
| J. Medida de IgG1 e IgG2a anti-Ova por ELISA _____   | 36  |
| K. Obtenção das Fezes e Preparo para dosagem de S-IgA _____  | 37  |
| L. Medida de IgA secretória anti-ova por ELISA _____   | 37  |

|    |  |     |
|----|--|-----|
| M. | Medida de IgA secretória total por ELISA   | 38  |
| N. | Medida de IgE sérica anti-Ova por ELISA  | 39  |
| O. | Medida de IgE sérica total por ELISA   | 39  |
| P. | Preparação de suspensão das células linfóides  | 40  |
| Q. | Cultura de células e coleta do sobrenadante  | 41  |
| R. | Medida da concentração de citocinas no sobrenadante da cultura celular por ELISA     | 41  |
| S. | Obtenção dos dados no citômetro de fluxo e análise dos resultados                    | 42  |
| T. | Análise Estatística  | 44  |
| U. | Soluções utilizadas  | 44  |
| 4. | Resultados   | 46  |
|    | Parte I:   | 46  |
|    | O Processo de Envelhecimento e a Indução da Tolerância Oral                          | 46  |
|    | Parte II:  | 71  |
|    | O Processo de Envelhecimento e a Indução da Alergia Alimentar                        | 71  |
| 5. | Discussão  | 97  |
| 6. | Conclusões   | 119 |
| 1. | Referências  | 123 |
|    | Anexo A: Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em experimentação Animal da UFMG. | 141 |
|    | Anexo B: Artigos Publicados  | 142 |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Trato Gastrointestinal.....  | 3  |
| Figura 2: Mecanismos indutores da tolerância oral.....   | 8  |
| Figura 3: O aumento da permeabilidade epitelial e seu papel no desenvolvimento do processo inflamatório mediado por células T do intestino. .... | 17 |
| Figura 4: Efeitos do envelhecimento na produção de linfócitos e na distribuição para os órgãos secundários. ....                                 | 23 |
| Figura 5: Análise de leucócitos do baço por citometria de fluxo. ....  | 43 |
| Protocolo 1 : Indução de Tolerância Oral em camundongos BALB/c idosos normais.....   | 47 |
| Figura 6: Efeito do envelhecimento na indução de imunidade e tolerância oral.....  | 49 |
| Figura 7: Efeito do envelhecimento na produção de IgG2a específica. ....   | 50 |
| Figura 8: Efeito do envelhecimento na produção de IgA secretória total e anti-Ova no muco intestinal. ....                                       | 52 |
| Figura 9: Efeito do envelhecimento na produção de anticorpos IgE séricos totais e anti-Ova. ....   | 54 |
| Figura 10: Efeito do envelhecimento na produção de IL-4 por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.....                      | 56 |
| Figura 11: Efeito do envelhecimento na produção de IL-10 por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.....                     | 58 |
| Figura 12: Efeito do envelhecimento na produção de TGF- $\beta$ por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.....              | 60 |
| Figura 13: Efeito do envelhecimento na produção de TNF- $\alpha$ por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.....             | 62 |
| Figura 14: Efeito do envelhecimento na produção de IL-2 por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.....                      | 64 |
| Figura 15: Efeito do envelhecimento no número de células CD4+CD25+FoxP3 após a indução de tolerância oral. ....                                  | 66 |
| Figura 16: Efeito do envelhecimento no número de células CD4+CD25+LAP+ após a indução de tolerância oral.....                                    | 68 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 17: Efeito do envelhecimento no número de células CD4+CD25-LAP+ após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento. ....   | 70 |
| Protocolo 2: Indução de tolerância oral e alergia alimentar em camundongos BALB/c idosos normais: .....   | 72 |
| Figura 18: O efeito do envelhecimento na produção de IgE anti-Ova. ....   | 74 |
| Figura 19: O efeito do envelhecimento no consumo de Ova durante a indução de alergia alimentar. ....  | 75 |
| Figura 20: O efeito do envelhecimento no peso corpóreo na tolerância oral e na indução de alergia alimentar. ....   | 77 |
| Figure 21: O efeito de envelhecimento na indução da tolerância oral. ....   | 79 |
| Figure 22: O efeito de envelhecimento na produção de IgAs anti-ova. ....  | 80 |
| Figure 23: Avaliação cinética da produção de citocinas no baço durante a tolerância oral em modelo de alergia alimentar. ....   | 83 |
| Figure 24: Avaliação cinética da produção de citocinas nos LnM durante a tolerância oral em modelo de alergia alimentar. ....   | 86 |
| Figura 25: Avaliação do número absoluto de células T reguladoras CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup> após a indução de alergia alimentar. ....                                   | 88 |
| Protocolo 3: Indução de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos DO.11.10 idosos: .....   | 89 |
| Figura 26: O Efeito do envelhecimento no número absoluto de células CD4+CD25+Foxp3, CD4+CD25+LAP, CD4+CD25-LAP e CD4+CD44+ no baço durante a indução de alergia alimentar. ....                       | 91 |
| Figura 27: O efeito do envelhecimento no número absoluto de células CD4+CD25+Foxp3, CD4+CD25+LAP, CD4+CD25-LAP e CD4+CD44+ nos linfonodos mesentéricos durante a indução de alergia alimentar. ....   | 93 |
| Figura 28: O efeito do envelhecimento no número absoluto de células CD4+CD25+Foxp3+, CD4+CD25+LAP+, CD4+CD25-LAP+ e CD4+CD44+ nas placas de Peyer e no processo de indução de alergia alimentar. .... | 95 |

## **LISTA DE TABELAS**

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabela 1: O efeito do envelhecimento nos mecanismos de indução de Tolerância Oral.....</b>                        | <b>120</b> |
| <b>Tabela 2: O efeito do envelhecimento nos mecanismos de indução da Alergia Alimentar.....</b>                      | <b>121</b> |
| <b>Tabela 3: O efeito do envelhecimento na indução da Alergia Alimentar em animais transgênicos para a Ova. ....</b> | <b>122</b> |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|                   |  |
|-------------------|--|
| $\mu\text{g}$     | micrograma   |
| $\mu\text{l}$     | microlitros  |
| $\mu\text{m}$     | micrômetros  |
| $\mu\text{l}$     | mililitros   |
| mg                | miligramas   |
| $\text{Al(OH)}_3$ | Hidróxido de Alumínio  |
| APCs              | Células apresentadoras de antígeno                           |
| BALT              | Tecido linfóide associado aos brônquios                      |
| BCR               | Receptor de células B  |
| CD                | Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> ) |
| CFA               | Adjuvante Completo de Freund                                 |
| Con A             | Concanavalina A  |
| DCs               | Células dendríticas  |
| EDTA              | Ácido etileno diamino tetraacético                           |
| ELISA             | Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima                      |
| FITC              | Isocianato de fluoresceína                                   |
| Foxp3             | Fator de transcrição forkhead box p3                         |
| GALT              | Tecido linfóide associado ao intestino                       |
| H.E               | Hematoxilina e Eosina  |
| HRP               | Antígeno <i>horseradish peroxidase</i>                       |
| iBALT             | Tecido linfóide associado aos brônquios induzido             |

|      |  |
|------|--|
| IELs | Linfócitos intraepiteliais                           |
| IFN  | Interferon   |
| i.p. | Intraperitoneal                                      |
| Ig   | Imunoglobulina                                       |
| IgAS | Imunoglobulina A secretória                          |
| IL   | Interleucina   |
| ILFs | Folículos linfóides isolados                         |
| LnMs | Linfonodos Mesentéricos                              |
| LAP  | <i>Latency-Associated Peptide</i>                    |
| NKT  | Célula T matadora natural (T <i>natural killer</i> ) |
| LP   | <i>Lamina propria</i>                                |
| LPS  | Lipopolissacarídeo                                   |
| MALT | Tecido linfóide associado às mucosas                 |
| MHC  | Complexo de histocompatibilidade principal           |
| NALT | Tecido linfóide associado á nasofaringe              |
| nm   | Nanômetros   |
| °C   | Grau centígrado                                      |
| OPD  | Ortofenileno-diamino                                 |
| Ova  | Ovalbumina   |
| PAS  | <i>Periodic Acid Shiff</i>                           |
| PBS  | Salina tamponada com fosfato                         |
| PE   | Ficoeritrina   |

|              |  |
|--------------|--|
| PP           | Placas de Peyer                              |
| RPM          | Rotações por minuto                          |
| s.c.         | Subcutâneo                                   |
| TGF- $\beta$ | Fator de transformação e crescimento $\beta$ |
| TCR          | Receptor de células T                        |
| Th           | Linfócito auxiliar (T helper)                |
| Th1          | Resposta celular do tipo 1                   |
| Th2          | Resposta celular do tipo 2                   |
| TNF          | Fator de necrose tumoral                     |
| Tregs        | Células T reguladoras                        |

## RESUMO

A tolerância oral tem sido classicamente definida como um estado de hiporeatividade para resposta celular e / ou humoral à um antígeno pela administração prévia do mesmo antígeno por via oral. Estudos do nosso grupo têm mostrado que a susceptibilidade à tolerância oral diminui com a idade. Desde que a tolerância oral é fundamental para manter a homeostase do intestino, o seu declínio com o envelhecimento pode resultar no aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de reações inflamatórias no intestino, como alergia alimentar em animais idosos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do envelhecimento na indução da tolerância oral e da alergia alimentar. Usamos camundongos BALB / c de 8, 28, 53 e 92 semanas de idade e analisamos a indução de tolerância oral por gavagem ou ingestão voluntária utilizando como antígeno a Ovalbumina (Ova). Observamos que o envelhecimento é seguido por uma diminuição na indução de tolerância oral por gavagem e de respostas imunes (Ig, IgG1, S-IgA e IgE) anti-Ova. A produção de IL-4 e IL-10 específicas, citocinas com atividade pró-inflamatórias / reguladoras, por células do baço estimuladas com Ova foi reduzida em camundongos idosos. Os efeitos do envelhecimento mais acentuados no baço do que nos sítios da mucosa intestinal (linfonodos mesentéricos e placas de Peyer). No entanto, no baço e nos linfonodos mesentéricos, o número de células T com fenótipo regulador (CD4+CD25+FoxP3+, CD4+CD25+LAP+, CD4+CD25-LAP+) aumentou nos camundongos tolerantes idosos. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos nos quais alguns mecanismos reguladores são preservados em camundongos tolerantes por ingestão voluntária. Ao observarmos que os animais idosos são menos susceptíveis à tolerância oral, nosso próximo estudo foi verificar se eles tendem a desenvolver reações inflamatórias no intestino. Para observármos o impacto do envelhecimento na inflamação intestinal, usamos um modelo de alergia alimentar induzido por Ova. Primeiramente, um aumento de vários componentes imunológicos (células T ativadas e citocinas) dos animais idosos que foi associada com a redução da eficiência respostas imune-específicas inflamatórias e reguladoras. Os níveis de IgG, IgA e IgE anti-Ova estavam

reduzidos em camundongos idosos alérgicos (53 a 92 semanas de idade). No que diz respeito à resposta de anticorpo local, a produção de S-IgA secretória total em camundongos não manipulados não foi afetada pelo envelhecimento. Entretanto, os níveis de SIgA anti-Ova em camundongos alérgicos estão diminuídos com o envelhecimento. Sugere-se que o acúmulo de células de memória e ativadas no sistema imune de animais idosos alérgicos levam a uma redução na habilidade de lidar com antígenos novos. Segundo, a habilidade reduzida dos camundongos idosos em responder imunologicamente, pode ser cineticamente monitorada no modelo de alergia alimentar utilizado. Camundongos alérgicos jovens (8 semanas de idade) produzem altos níveis de IgG1 e IgE séricas específicas tanto quanto S-IgA específica no muco intestinal; eles também apresentam altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  específicos produzidos por células do baço e dos LnM in vitro e uma significativa redução no consumo de solução de Ova (Aversão). Todos esses parâmetros estavam progressivamente aumentados após a imunização primária chegando ao pico de produção após o desafio oral nos animais jovens. A supressão de todos parâmetros foi obtida pelo consumo prévio de Ova. Camundongos de meia idade alérgicos (53 semanas de idade), entretanto, apresentaram baixos níveis de IgE e IgG1 séricas específicas e demonstraram aversão ao consumo de Ova com menor intensidade. Interessantemente, eles apresentaram nenhuma supressão aos parâmetros alérgicos quando ingerindo oralmente Ova por gavagem. A produção de citocinas específicas ( IL-4, IL-5, IL-10 e TGF-  $\beta$ ) pelas células do baço e dos LnMs apresentaram um platô com nenhuma variação em todos os pontos do experimento (sensibilização e reforço) e nós somente pudemos observar um pequeno pico na produção de citocinas após 7 dias de desafio oral com solução de clara de ovo. Para examinar variações pontuais no número de células reguladoras e ativadas durante a tolerância oral e indução de alergia alimentar, nos utilizamos camundongos transgênicos DO.11.10 com 53 semanas de idade, com TCR específico para Ova. Nós observamos que as células T CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+CD25+LAP+ tanto quanto as células T CD4+CD44+ estão reduzidas nos linfonodos mesentéricos e nos baços dos animais tolerantes. Portanto, nós podemos concluir que a suscetibilidade à tolerância oral e a indução de



respostas imunes inflamatórias declinam com o envelhecimento. A manutenção de alguns fatores reguladores ( como a IL-10) e algumas populações de células T reguladoras nos tecidos linfóides associados ao intestino em camundongos idosos pode ter um efeito de preservação da homeostase da mucosa e da indução da tolerância oral induzido por regimes orais naturais como a ingestão voluntária.

## ABSTRACT

Oral tolerance has been classically defined as a state of hyporesponsiveness of cellular and/or humoral response to an antigen by prior administration of the same antigen by oral route. Studies from our group have shown that susceptibility to oral tolerance decreases with age. Since oral tolerance is critical to maintain gut homeostasis, its decline with aging may result in increased susceptibility to develop gut inflammatory reactions such as food allergy in aged animals. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of aging in oral tolerance and food allergy induction. We used BALB/c mice at 8, 28, 53 and 92 weeks of age and analyzed oral tolerance induction by either gavage or continuous feeding of ovalbumin (Ova). We observed that aging is followed by a decreased in induction of both oral tolerance induction by gavage and immune responses (Ig, IgG1, S-IgA and IgE) to Ova. Production of specific IL-4 and IL-10, cytokines with proinflammatory/regulatory activity, by spleen cells stimulated with Ova was reduced in aged mice. The effects of aging were more accentuated in spleen than in mucosal sites (mesenteric lymph nodes and Peyer's patches). However, numbers of spleen and mesenteric lymph node CD4<sup>+</sup> T cells with regulatory phenotypes (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>) increased in tolerant aged mice. This result is in concert with our finding that some regulatory elements might be preserved in aged mice since they could still be rendered tolerant by a continuous feeding protocol. Since aged mice were less susceptible to oral tolerance, we next study whether they were prone to develop gut inflammatory reactions. To test the impact of aging in gut inflammation, we used a model of Ova-induced food allergy. First, the general increased availability of immune elements (activated T cells and cytokines) in aged mice was associated with a reduced efficiency in mounting specific immune responses of both classes, inflammatory and regulatory. Serum anti-ovalbumin (OVA) IgG, IgA and IgE levels were reduced in allergic aged mice (53- to 92-week-old). Oral tolerance induction to these parameters also declined with age. Regarding the local antibody response, production of total secretory IgA (S-IgA) in non-manipulated mice was unaffected by aging as we have previously reported. However, anti-

OVA SIgA levels in allergic mice diminished with aging. It seems that the accumulation of already experienced and committed cells in the immune system of aged animals lead to a reduced ability to deal with novel antigens. Second, the reduced ability of aged mice to mount an immune response could be kinetically monitored in the food allergy model. Young (8-week-old) allergic mice produced high levels of specific serum IgE and IgG1 as well as specific S-IgA in the intestinal mucus; they had elevated levels of specific IL-4, IL-5, IL-10 and TGF-beta produced by spleen and MLN cells *in vitro* and a significant reduction in the consumption of OVA solution (aversion). All these parameters were progressively increased after primary immunization, boost and peaked after oral challenge in young mice. Suppression of all parameters was obtained by OVA feeding. Allergic aged (53-week-old) mice, however, had lower levels of specific serum IgG1 and IgE, and showed less accentuated aversion. Interestingly, they showed no suppression of allergic parameters when fed OVA by gavage. Specific cytokine production (IL-4, IL-5, IL-10 and TGF-beta) by spleen and MLN cells showed a plateau with no variation throughout time points of the experiment (sensitization and boost) and we could only observed a small peak in cytokine production after 7 days of oral challenge with egg white solution. To examine putative variations in regulatory and activated T cells during oral tolerance and food allergy induction, we used DO.11.10 (Ova-TCR transgenic) mice. We observed that CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+CD25+LAP+ as well as CD4+CD44+ T cells were reduced in mesenteric lymph nodes and spleens of tolerant mice. Therefore, we concluded that both susceptibility to oral tolerance and induction of inflammatory immune responses declined with aging. Maintenance of some regulatory elements (namely IL-10 and some populations of regulatory T cells) in the gut lymphoid tissues of aged mice might have the effect of preserving mucosal homeostasis and oral tolerance induction by natural regimens such as continuous feeding.

# 1. Introdução

## ***O Tecido Linfóide associado às mucosas***

O termo “sistema imune das mucosas” foi criado por John Bienenstock há 40 anos atrás (Gill et al., 2010). Ele sugeriu o conceito quando descreveu o tecido linfóide associado aos brônquios e observou sua similaridade anatômica com o do trato gastrointestinal (Bienenstock and McDermott, 2005). Evidências sugerem que o sistema imune linfóide associado às mucosas constitui m único órgão, com grande extensão e em constante interação entre seus componentes distantes. Trabalhos já demonstraram que imunizações intranasais contra o vírus da Herpes podem gerar proteção vaginal contra infecções geradas pelo mesmo vírus (Gallichan et al., 2001). Outros estudos com pacientes com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) observaram altas concentrações de Imunoglobulina A (IgA) específica nas secreções vaginais, nasais e na saliva desses pacientes (Artenstein et al., 1997).

Entretanto, a maioria dos autores divide o tecido linfóide associado às mucosas (MALT) em termos morfológicos e funcionais, como formado pelo tecido linfóide associado ao intestino ou trato gastrointestinal (GALT), pelo tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) e pelo tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT) (Brandtzaeg, 1996)

O BALT, juntamente com o NALT, apresentam agregados linfocitários responsáveis pela resposta imune a antígenos inaláveis. Além disso, possuem organização estrutural semelhante à encontrada nas placas de Peyer do intestino, apresentando células M, linfócitos intraepiteliais, centros germinativos e células dendríticas (Bienenstock and McDermott, 2005). O BALT é pouco evidente em humanos e camundongos normais, mas durante infecções pulmonares apresenta um alto grau de desenvolvimento (iBALT) (Rangel-Moreno et al., 2006; Tschernig and Pabst, 2000).

## ***O Tecido Linfóide associado ao intestino***

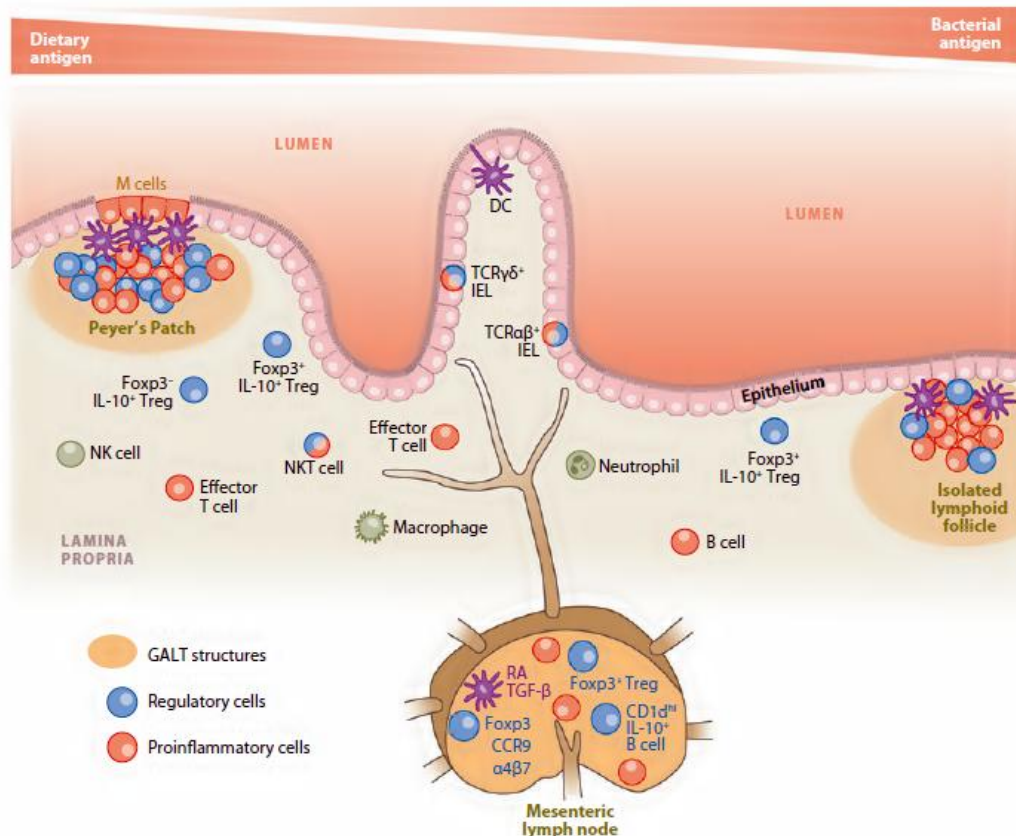
O tecido linfóide associado ao intestino ou ao trato gastrointestinal (GALT), como os demais tecidos associados à mucosa, está em constante interação com o meio externo. No intestino, a presença de células epiteliais e os elementos imunes aí presentes facilitam o reconhecimento e a absorção de nutrientes, induzindo respostas imuno-moduladoras e também respostas inflamatórias contra patógenos (Chahine and Bahna, 2010).

O GALT é formado por tecidos linfóides organizados e células imunocompetentes distribuídas na superfície da mucosa. As placas de Peyer (PPs) e os linfonodos mesentéricos (LnMs) formam as estruturas linfóides organizadas enquanto os linfócitos da *lamina propria* (LP) e os linfócitos intraepiteliais (IELs) representam as células imunocompetentes dispersas.

As placas de Peyer estão localizadas na região da submucosa do intestino delgado, são um dos sítios mais importantes de geração de plasmócitos produtores de IgA secretória (S-IgA) e não dependem da microbiota intestinal para sua geração (Mowat, 2003). Entretanto, seu papel indutor já foi motivo de discussão. Em camundongos deficientes de placas de Peyer, foram observados plasmócitos produtores de S-IgA na *lamina própria*, sugerindo a existência de locais alternativos para a indução da troca de isotipo para IgA secretória (Yamamoto e cols., 2000). De fato, Fagarasan e colaboradores mostraram mais tarde que pelo menos 50% da IgA secretória tem origem de linfócitos B1 da lamina própria onde eles fazem a troca de isotipo e se tornam plasmócitos secretores de IgA ( Fagarasan et al, 2001). Esses autores defendem a idéia que o microambiente da LP é suficiente para induzir troca de isotipo de células B IgM+ para plasmócitos produtores de S-IgA. Além disso, Rescigno e colaboradores demonstraram que as células dendríticas localizadas na *lamina própria* do intestino são capazes de captar bactérias do lúmen intestinal e realizar a apresentação de antígenos *in situ* (Rescigno and Borrow, 2001).

Os linfonodos mesentéricos (LnMs) são os maiores linfonodos do corpo humano, os primeiros a se formarem durante a embriogênese e

representam a conexão entre as vias periféricas e mucosas na recirculação linfática (Newberry & Lorenz, 2005). Alguns trabalhos sugerem que a ausência dos LnMs inibe a indução de tolerância oral e a produção de IgAS nas mucosas (Spahn et al., 2002; Yamamoto et al., 2000). Logo os linfonodos mesentéricos possuem um papel fundamental na reatividade imunológica das mucosas.



**Figura 1: Trato Gastrointestinal.**

As células do intestino são especializadas na captação e apresentação de antígeno, na indução de imunidade antimicrobiana e na manutenção de tolerância contra antígenos exógenos (Izcue et al., 2009).

Os folículos linfóides isolados (ILFs) também participam da ativação das respostas imunes no GALT. Morfologicamente, estes são agregados linfocitários localizados ao longo do intestino delgado (Hamada et al., 2002), apresentando centros germinativos e células M como as placas de Peyer; porém, sem regiões contendo linfócitos T e dependente da microbiota para seu desenvolvimento (Lorenz, 2003). Nos ILFs, os linfócitos e as células

apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam grande proximidade, o que possivelmente facilitaria a apresentação de antígenos e a indução da resposta imune (Astwood et al., 1996; Hamada et al., 2002; Lorenz, 2003).

Os sítios indutores das mucosas apresentam características comuns, como uma camada de células epiteliais interligadas por junções formando uma barreira impermeável entre o lúmen intestinal e o meio externo. Além disso, contêm grande quantidade de células M organizadas em folículos linfoides, que são essenciais na captação, transporte e processamento de antígenos provenientes do lúmen intestinal (Ogra, 2009). O GALT apresenta uma variedade de células efectoras presentes ao longo do lúmen intestinal, como células B e T, células dendríticas, macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) que participam ativamente desse complexo processo de manutenção da homeostase da mucosa intestinal (Faria and Weiner, 2005).

Desta forma, a mucosa intestinal é a maior área de contato natural dos antígenos com o organismo, representando assim, a maior fonte de perturbações na atividade do sistema imune.

A IgA secretória (S-IgA) é o anticorpo mais abundante nas secreções mucosas e possui diversos atributos funcionais, atuando como eficiente barreira imunológica contra agentes infecciosos no intestino.

A IgA é secretada principalmente na forma de dímeros associados por uma única cadeia J. Esses dímeros de IgA se ligam especificamente a receptores de imunoglobulinas poliméricas (pIgR), presentes nas superfícies basais das células epiteliais. Posteriormente, esse complexo é internalizado e transportado por transcitose (Apodaca et al., 1991). Na superfície apical das células epiteliais, o receptor pIgR é clivado, liberando a porção extracelular ainda aderida à IgA dimérica, denominada componente secretor (SC) (Brandtzaeg et al., 1999). Esse componente secretor possivelmente contribui na proteção da S-IgA contra clivagens proteolíticas.

Em camundongos, já foi observado o papel mucofílico da S-IgA, isto é, juntamente com seu componente secretor ela interage com a mucina presente no muco intestinal e captam o antígeno ou a bactéria do epitélio intestinal formando um biofilme (Bollinger et al., 2006). Além disso, já foi

observado também em camundongos deficientes em pIgR, a ausência de S-IgA e o aumento da permeabilidade da mucosa. Esse processo levaria a um conseqüente aumento desregulado da captação de antígenos da dieta e de bactérias da microbiota (Johansen et al., 1999).

Já 80% da IgA sérica dos primatas incluindo os humanos, é monomérica, resultante da síntese de células B provenientes da medula óssea. (Otten and van Egmond, 2004).

Através da mucosa intestinal, cerca de 130-190 gramas de proteínas circulam diariamente provenientes da dieta. Menezes e colaboradores demonstraram que as proteínas presentes na dieta têm um papel importante na maturação do GALT. Eles observaram que em camundongos tratados com dieta livre de proteínas há prejuízo do desenvolvimento morfológico do trato gastrointestinal, que apresenta baixos níveis de linfócitos, IgG, IgA e citocinas ativadas perante respostas do tipo Th2 (Menezes et al., 2003).

Além da estimulação por proteínas da dieta, as bactérias que colonizam o intestino grosso em humanos, chegando a  $10^{12}$  microorganismos /g de fezes que representam uma fonte de estimulação importante nesse sítio (Menezes et al., 2003). Na presença de antígenos, as bactérias comensais do intestino (microbiota) se ligam aos receptores do tipo Toll (TLRs) presentes nas células do sistema imune inato, como macrófagos, ativando-os. Em geral, a resposta imune resultante dessa ativação é não inflamatória em condições normais (Hooper and Macpherson, 2001; Neish et al., 2000).

Além disso, para a manutenção de condições propícias para a homeostase, a microbiota fornece energia através de nutrientes (como vitaminas K e B12) e proteção contra colonização de bactérias patogênicas ao intestino (Peterson et al., 2007; Tsuji et al., 2009).

Estudos com animais *germ-free* (isentos de germes) sugerem que o intestino normalmente possui um grau de ativação basal induzida pela microbiota. Na ausência dessas bactérias comensais, o GALT, o baço e outros tecidos linfóides apresentam-se pouco desenvolvidos. Essas anormalidades desaparecem quando se adicionam bactérias da microbiota ou ligantes de TLR na água ingerida pelos animais (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Sendo assim, a



microbiota intestinal é uma importante fonte de regulação e maturação do sistema imune no intestino.

A interação do epitélio intestinal (indução da produção de citocinas) com as células dendríticas, macrófagos e células T reguladoras presentes na lamina própria do intestino também parece ser importante para a manutenção da homeostase do intestino (Iliev et al., 2009; Rescigno et al., 2008).

## ***A Tolerância Oral***

A tolerância oral tem sido classicamente definida como um fenômeno de longa duração, no qual a exposição prévia de um determinado antígeno pela via oral resulta em uma diminuição da capacidade do organismo de montar respostas imunes após exposições parenterais subseqüentes a este mesmo antígeno, com ou sem a presença de adjuvantes (Thomas and Parrott, 1974; Vaz et al., 1977). 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 (Afuwape et al., 2004; Vaz et al., 1977); reação de hipersensibilidade tardia – DTH (Mowat et al., 1982) e produção de várias citocinas (Afuwape et al., 2004; Weiner, 1994).

Diversos fatores do sistema imune da mucosa favorecem o desenvolvimento da tolerância oral.

O processo digestivo do intestino altera estruturalmente as proteínas da dieta facilitando o desenvolvimento de tolerância oral. Já foi comprovado que a hidrólise de antígenos, tornando-os solúveis, deixa-os mais tolerogênicos que os antígenos particulados (Chehade and Mayer, 2005).

A microbiota também tem um papel importante na manutenção da tolerância oral. Em estudos com camundongos *germ-free*, foi demonstrado uma alta propensão à intolerância alimentar relacionada a alterações da imunidade inata e da ausência da estimulação de TLR-4 (Toll-like receptor 4) pelo LPS das bactérias (Bashir et al., 2004; Sudo et al., 1997).

Outros fatores também estão relacionados à indução da tolerância oral, como a idade (Faria et al., 1993; Hanson, 1981; Vaz et al., 1981), o estado nutricional (Lamont et al., 1987a; Lamont et al., 1987b) e o estado imunológico dos animais (Vaz et al., 1987); além da natureza, dose e via de administração do antígeno, bem como a frequência e o intervalo entre elas (Gaboriau-Routhiau and Moreau, 1996).

Strobel e colaboradores demonstraram que camundongos de linhagem susceptível à indução de tolerância por via oral (B6D2F1), quando tratados com Ova nas primeiras 48 horas de vida, não desenvolveram o estado de tolerância, apresentando altos níveis de anticorpos específicos anti-Ova. Somente após a segunda semana de vida, o estado de tolerância oral foi alcançado, com a obtenção de níveis significativos de supressão dos anticorpos anti-Ova (Strobel and Ferguson, 1984).

A suscetibilidade à indução de tolerância por via oral surge provavelmente por volta do 17º dia após o nascimento, posterior à organização do tecido linfóide da mucosa intestinal; principalmente das placas de Peyer; ao surgimento das enzimas proteolíticas, à migração dos linfócitos para o intestino e ao “fechamento” da mucosa intestinal com a conseqüente diminuição da absorção de moléculas (Vaz et al., 1981).

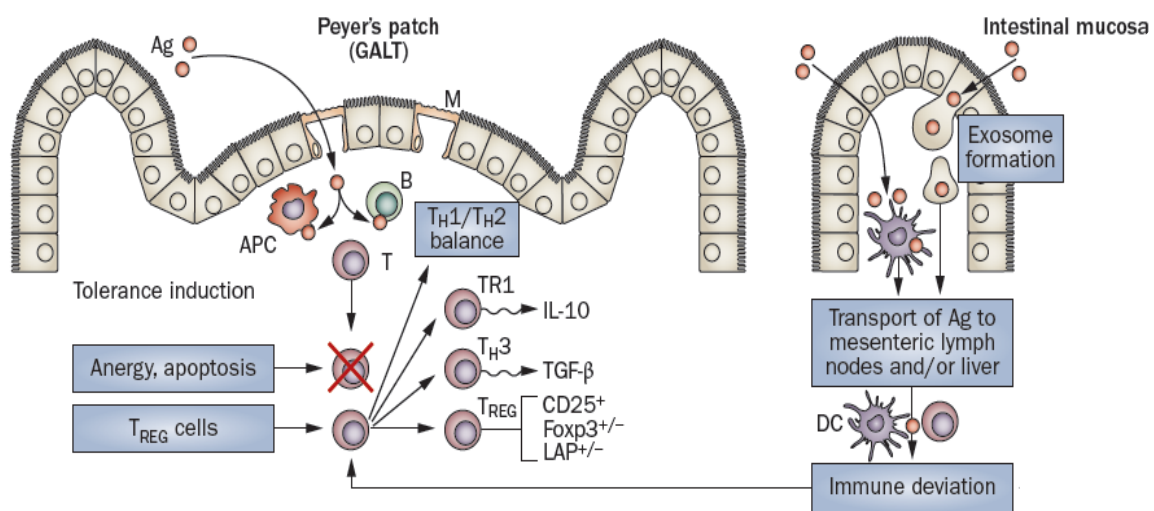
Os processos de envelhecimento e maturação do GALT também interferem na indução de tolerância oral. Camundongos de linhagens susceptíveis à tolerância por via oral (B6D2F1 e C3H/HeJ) com 8 semanas de idade, tornam-se refratários à tolerância induzida por gavagem quando adultos (24ª semana) ou de meia idade (40ª a 44ª semana de idade) (Faria et al., 1993; Rios et al., 1988).

A transferência de células do baço de animais B6D2F1 jovens tanto para animais neonatos como idosos aumenta a susceptibilidade à indução da tolerância oral nestes animais, em contraste, a transferência de células de camundongos idosos para jovens os tornam menos susceptíveis (Lahmann et al., 1992).

Entretanto, em nosso laboratório, trabalhos demonstraram que a administração de antígenos por ingestão voluntária é capaz de induzir tolerância oral em animais senis (70 semanas de idade), mostrando que o

envelhecimento está associado a uma diminuição na suscetibilidade à indução de tolerância oral, mas não a uma completa refratariedade (Faria et al., 1998).

Já foram descritos dois mecanismos para explicar o fenômeno da tolerância oral: anergia (ausência de função) ou deleção clonal (perda de função devido à apoptose) e regulação ativa (células T reguladoras). Estas idéias já foram estendidas pela demonstração que células T tolerizadas oralmente têm problemas na atividade locomotora, o qual restringe sua habilidade em atravessar o endotélio vascular ou a sua interação com DCs e células B *in vivo* (Strobel and Mowat, 2006).



**Figura 2: Mecanismos indutores da tolerância oral.**

A ausência de resposta a antígenos inócuos pode ser explicada por células T anérgicas, deleção clonal por apoptose ou ativação de subpopulações de células T reguladoras. Essa ativação de células T reguladoras pode ocorrer localmente ou em sítios distantes, como nos linfonodos mesentéricos ou no fígado após a disseminação de antígenos solúveis absorvidos ou transportados por APCs. As células reguladoras CD25<sup>+</sup> podem ser positivas ou negativas para Foxp3 e contém subpopulações de células Tr1, Th3 ou LAP<sup>+</sup>, que produzem citocinas supressivas como IL-10 e TGF-β. Essas células reguladoras são importantes no desenvolvimento do balanço de produção de células Th2 e Th1. (Per Brandtzaeg, 2010).

Segundo Weiner e colaboradores, o fator determinante de qual forma de tolerância periférica se desenvolverá seria a dose de antígeno utilizada. Uma dose única e alta de antígeno levaria a anergia ou a deleção de células T por apoptose (Weiner, 1994; Weiner et al., 1994), conseqüência da inibição da ligação do CD80 presente nas células T ao CD86 das APCs (Mellman and Steinman, 2001). Já doses baixas e múltiplas de antígeno

estariam associadas a geração de células T reguladoras (Weiner, 1994), como as células T reguladoras das subpopulações Tr1 (produtoras de IL-10), Tr3 (produtoras de TGF- $\beta$ ) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (produtoras de TGF- $\beta$ ) (Chahine and Bahna, 2010).

Já foi observado em humanos que baixas doses de proteínas administradas via leite materno para bebês é uma maneira eficiente de torná-los tolerantes a essas proteínas (Verhasselt et al., 2008). Os primeiros testes experimentais foram em camundongos utilizando modelos de asma induzida por ovalbumina. Os antígenos inalados pela mãe aparecem no leite materno e protegem a prole dos efeitos da asma com a produção de células T reguladoras (Verhasselt et al., 2008).

A relação da dose administrada e a indução de tolerância também foi observada em neonatos sensibilizados com PN e desenvolveram alergia com produção de IgG1, que pode ser prevenida parcialmente por inibidor de PAF e pelo consumo materno de baixa dose de PN durante a gestação e lactação (a proteção foi associada a baixa razão IgG2/IgG1 e baixa produção de IgE) (Lopez-Exposito et al., 2009).

Algumas evidências têm sido mostradas de que as formas de tolerância, anergia ou deleção e regulação não são independentes e podem se sobrepor.

Um fator em comum desses mecanismos está a secreção de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor Beta*). O TGF- $\beta$  é uma citocina reguladora, que pode ser induzida através do tratamento de células T com anticorpo anti-CTLA-4 (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos), embora esta molécula tenha sido primeiramente descrita na indução de anergia *in vivo* (Nakamura et al., 2001). Além disso, alguns estudos sobre propriedades de células reguladoras as descrevem como anérgicas e os eventos de deleção clonal ocorridos na mucosa intestinal parecem criar condições para secreção local de TGF- $\beta$  (Takahashi et al., 1998).

Portanto, anergia/deleção e supressão ativa possivelmente são diferentes aspectos de um mesmo processo tolerogênico, sendo conectados pelo contato com o antígeno no intestino (Faria and Weiner, 2005).

Inicialmente, a atividade reguladora das células T CD4<sup>+</sup> foi ligada à produção de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, e associada à supressão da produção de citocinas Th1, como IL-2 e INF- $\gamma$ . No entanto, vários estudos demonstraram 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 (Faria and Weiner, 2006a; Faria and Weiner, 2006b; Melamed et al., 1996).

Atualmente o papel das células T reguladoras na tolerância oral e seu mecanismo de ação têm sido bastante discutidos.

As células T reguladoras foram descritas primeiramente por Gershon e colaboradores em 1970 e eram tidas como células T CD8<sup>+</sup> supressoras (Gershon and Kondo, 1970). No entanto, Sakaguchi e colaboradores em 1995 caracterizaram as células T regulatórias como células T CD4<sup>+</sup> expressando o receptor de alta afinidade para IL-2 (IL-2Ra ou CD25), que é essencial para a sua função reguladora (Sakaguchi et al., 1995a; Sakaguchi et al., 1995b). Outros estudos, realizados em camundongos deficientes para a expressão de CD8<sup>+</sup>, confirmaram que a indução da tolerância oral ocorria independentemente de células T CD8<sup>+</sup>, mas era dependente de células T CD4<sup>+</sup> (Garside et al., 1995; Hornquist et al., 1996).

As células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> são células anérgicas, ou seja, não proliferam bem e não secretam IL-2, apresentam propriedades supressoras, e têm sido descritas como responsáveis pela regulação dos mecanismos de doenças autoimunes e alergias (Sakaguchi et al., 2004; Sakaguchi, 2004; Takahashi et al., 1998). Além disso, 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 et al., 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.

Vários marcadores já foram descritos para as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, como o CD45RB<sup>low</sup>, CD25, CTLA-4, receptor de TNF induzido por glicocorticóide (GITR), fator de transcrição FoxP3 (*Forkhead box p3*), LAP (peptídeo associado à latência) e TGF- $\beta$  de membrana (Hori et al., 2003;

McHugh and Shevach, 2002; McHugh et al., 2002; Nakamura et al., 2001; Oida et al., 2003). O CTLA-4 tem papel inibidor da proliferação de linfócitos T e possui um papel importante durante a indução da tolerância oral. Camundongos tratados oralmente com anti-CTLA-4 apresentam proliferação de células T específicas acelerada, prejudicando a indução da tolerância (Chen and Ma, 2002). O GITR é um marcador constitutivo expresso em células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CTLA-4 intracelular (McHugh et al., 2002). O FoxP3 é um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento e função das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nativas, e está relacionado na supressão de doenças autoimunes e alergias alimentares (Sakaguchi et al., 2006).

Uma forma de TGF- $\beta$  expressa na membrana celular está associada com a atividade regulatória das células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Nakamura et al., 2001). O TGF- $\beta$  de membrana das células T reguladoras é produzido na forma inativa e ligado ao peptídeo associado à latência (LAP). Assim, a atividade biológica dessas células depende da dissociação da TGF- $\beta$  madura do complexo latente. *In vivo*, são ativadas por proteases que clivam o complexo latente, e a plasmina é uma das proteases envolvidas no processo de ativação (Oida et al., 2003). Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> também já foram descritas como imuno-moduladoras em modelos experimentais de colite (Oida et al., 2003).

O CD45RB é uma fosfatase expressa em altos níveis na superfície celular de linfócitos virgens. A expressão de CD45RB diminui após a ativação dos linfócitos T sendo que células CD45RB<sup>low</sup> são consideradas células T de memória (Lee and Vitetta, 1990; Lee et al., 1990).

Alguns estudos indicam que o intestino é um importante local de desenvolvimento de Tregs Foxp3<sup>+</sup> e que células dendríticas (DCs) intestinais especializadas promovem a expressão de Foxp3 através de um mecanismo que é dependente de TGF- $\beta$  local tendo como cofator o ácido retinóico, um metabólito da vitamina A (Coombes et al., 2007; Mucida et al., 2007; Sun et al., 2007). Sendo assim, o desenvolvimento periférico de Tregs Foxp3<sup>+</sup> representa um mecanismo de auxílio para amplificar o repertório de Tregs em locais anatomicamente especializados, como na mucosa intestinal.

Trabalhos também mostram uma reciprocidade entre o desenvolvimento de Tregs Foxp3<sup>+</sup> e células T efetoras, sendo que células T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em Tregs Foxp3<sup>+</sup> na presença de TGF-β ou em células Th17, que secretam IL-17, uma citocina pro-inflamatória potente, na presença de TGF-β e IL-6. Deste modo, o TGF-β tem um efeito paradoxal, pois estimula distintas subpopulações de células T com efeitos opostos na resposta imune (Bettelli et al., 2006; Veldhoen and Stockinger, 2006).

Mucida e colaboradores, utilizando modelo experimental de asma, demonstraram que camundongos deficientes em Tregs naturais (nTregs), produzidas no timo como resultado da seleção por autoantígenos, 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, sugerindo que a indução da tolerância oral não requer nTregs e que Tregs com características similares são induzidas pela administração oral de antígeno. Entretanto, essa tolerância é reduzida quando TGF-β é bloqueado. Esse trabalho é consistente com a idéia de que a administração oral de antígeno gera Tregs antígeno-específicas num processo que requer TGF-β para indução de Foxp3 (Mucida et al., 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 et al., 2005). Essas células mostraram ter 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-β, com um pequeno papel para IL-10. Isto condiz com evidências de que Tregs que produzem TGF-β ou expressam essa molécula em sua superfície são responsáveis pela prevenção de várias formas de doenças inflamatórias como a colite (Strobel and Mowat, 2006).

Como mencionado anteriormente, vários trabalhos apontam a citocina TGF-β como fator de ligação entre os dois mecanismos de indução de tolerância oral (Faria and Weiner, 2006b). TGF-β pertence à família de polipeptídios envolvidos no controle do crescimento e desenvolvimento celular. Em mamíferos, existem três isoformas de TGF-β: TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3.

O TGF- $\beta$ 1 é abundante no intestino, tendo efeito estimulador na diferenciação das células epiteliais, troca de isotipo de S-IgA possuindo, além disso, propriedades imunossupressoras sobre linfócitos (Kim and Kagnoff, 1990).

O envolvimento do TGF- $\beta$  na tolerância oral foi descrito inicialmente por Miller e colaboradores demonstrando a capacidade de células T CD8+ tolerantes de migrar para órgãos linfóides suprimindo respostas imunes (Miller et al., 1992). Após a administração oral de proteína básica de mielina (MBP), essa supressão foi relacionada com a liberação de TGF- $\beta$  que resultava na inibição de células efetoras e liberação de citocinas não-específicas (“*bystander suppression*”-supressão do espectador inocente) (Miller et al., 1992).

Posteriormente, foi observado que camundongos geneticamente modificados (receptores TCR-Ova específicos), após serem tratados oralmente com altas doses de Ova, produziam TGF- $\beta$  e apresentavam deleção de células T (Chen et al., 1995; Chen et al., 1997). Sendo assim, o surgimento de TGF- $\beta$  poderia estar relacionado com eventos apoptóticos, justificando a deleção dessas células T específicas.

A capacidade do TGF- $\beta$  em induzir troca de isotipos para IgA pode justificar estudos clássicos que sugeriram que a tolerância oral estava interligada com um aumento da síntese de S-IgA na mucosa intestinal (Challacombe and Tomasi, 1980). Entretanto, a relação entre a indução de tolerância oral e a produção de S-IgA no intestino ainda não está esclarecida. Alguns trabalhos sugerem que ocorre um aumento na produção de S-IgA durante a indução de tolerância oral (Fujihashi et al., 1996), já outros acreditam que os níveis de S-IgA diminuem durante a indução da tolerância (Grdic et al., 1998; Kato et al., 2001).

Vários estudos já comprovaram o papel regulador do TGF- $\beta$ , demonstrando que, em camundongos geneticamente deficientes para a via de sinalização de TGF- $\beta$  em células T, ocorre o desenvolvimento espontâneo de doença autoimune com secreção de autoanticorpos e ocorrência de infiltrado inflamatório em vários órgãos (Gorelik and Flavell, 2000).

Simioni e colaboradores examinaram o papel das células dendríticas na indução de tolerância oral à Ovalbumina (Ova) em camundongos normais e transgênicos (DO.11.10) para Ova (contendo alta frequência de linfócitos T



expressando o transgene que codifica o TCR específico para um peptídeo da Ova) (Simioni et al., 2004). Esses autores observaram que a administração de Ova por gavagem ou por ingestão voluntária induzia tolerância oral dose dependente em camundongos normais jovens e senis, mas nos camundongos DO.11.10 a tolerância não ocorria. A produção de TGF- $\beta$  foi maior em culturas de células T de camundongos normais e geneticamente modificados quando estimuladas por células dendríticas de camundongos normais tolerantes (Simioni et al., 2004). Esses resultados sugerem a importância das células dendríticas na estimulação de células produtoras de TGF- $\beta$  durante a indução de tolerância oral específica em modelo murino.

Entretanto, o aumento da produção de TGF- $\beta$  não é uma consequência comum em todos os modelos de indução de tolerância oral (Baggi et al., 1999; Gonnella et al., 2001; Hirahara et al., 1995). Baggi e colaboradores, utilizando modelo experimental para miastenia grave, observaram que, após administração oral de epitopos de células T específicos (TACHR) em camundongos, a produção de TGF- $\beta$  não sofria alterações (Baggi et al., 1999). Husby e colaboradores demonstraram que, em humanos, o aumento de TGF- $\beta$  não é observado durante a indução da tolerância específica para KLH ("*keihole limpet hemocyanin*") (Husby et al., 1994).

Portanto, apesar de em alguns modelos experimentais já estarem estabelecidos mecanismos responsáveis pela indução de tolerância oral, incluindo as células moduladoras envolvidas, existem outros mecanismos de indução de tolerância oral ainda não explorados.

## ***A Alergia Alimentar***

Como já foi dito, o trato gastrointestinal é um órgão linfóide importante na reatividade imune devido a sua constante interação com a microbiota e com antígenos provenientes da dieta alimentar. Em circunstâncias normais, essa interação induziria tolerância oral, entretanto, qualquer falha na ativação ou manutenção da homeostase intestinal resultaria em reações inflamatórias, tanto locais como sistêmicas (Paschoal et al., 2009).

A alergia alimentar é uma dessas reações, definida como um tipo de aversão imune a proteínas da alimentação sendo ou não dependente da produção específica de imunoglobulinas de classe IgE (Sampson, 1999).

As alergias alimentares têm sido consideradas um dos maiores problemas de saúde das Américas (Mansueto et al., 2006). Em 2007, foi observado um aumento de 18% de incidência de alergia alimentar em crianças, comparado à década anterior (Fleischer et al., 2011).

A prevalência de reações alérgicas em humanos é maior nos primeiros cinco anos de vida, sendo mais frequentes em crianças com menos de quatro anos de idade (Sicherer and Sampson, 2006). Os alimentos mais comuns causadores de alergia alimentar na infância são leite de vaca, ovos, amendoim, trigo, soja, castanha, peixe e frutos do mar (Sicherer, 2011).

Entretanto, a maioria das alergias alimentares infantis é curada espontaneamente com o avançar da idade do indivíduo e somente 2% dos adultos sofrem dessa doença (Sampson, 1999). Em adultos, os alimentos mais comuns causadores da alergia são frutos do mar, amendoim, castanha e peixe (Sicherer, 2002). As reações alérgicas alimentares podem afetar diversos órgãos e conseqüentemente induzir uma diversidade de sintomas (Sicherer and Sampson, 2010). De acordo com um trabalho publicado em 2001 pela Academia Européia de Alergia e Imunologia Clínica (EAACI), existem dois tipos de reações alimentares; as tóxicas e as não-tóxicas (Johansson et al., 2001).

As não-tóxicas, também conhecidas como intolerância alimentar, são reações fisiológicas desencadeadas por agentes tóxicos ao organismo (ex: venenos) ou responsáveis pela geração de doenças metabólicas (ex: deficiência à lactose) (Mansueto e cols., 2006).

Por outro lado, as reações alimentares tóxicas ou as consideradas como “verdadeiras” são mediadas por respostas imunológicas dependentes ou não da produção da Imunoglobulina E (IgE) (Sicherer, 2002).

No processo alérgico dependente da produção de IgE, as proteínas da dieta alimentar, quando ingeridas, atravessam a camada de células epiteliais do intestino e entram em contato com o tecido linfóide associado à mucosa intestinal. Os fragmentos protéicos são processados por células apresentadoras de antígenos (APCs), expostos na membrana dessas células e

reconhecidos por receptores de células T específicos. Na presença de interleucina-4 (IL-4), a indução da reação alérgica é iniciada com a diferenciação de células T virgens auxiliares (Th) em células Th2 efectoras. Geralmente, células Th2 quando estimuladas, produzem uma diversidade de citocinas, incluído IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que, entre outras funções, têm o papel de indução da diferenciação de células B em plasmócitos produtores de IgE (van Wijk and Knippels, 2007).

Os anticorpos IgE específicos apresentam alta afinidade para os receptores de mastócitos e basófilos. Após uma segunda exposição ao mesmo alérgeno, a ligação de anticorpos IgE estimula a degranulação de mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas, citocinas e proteases.

Esses mediadores desencadeiam uma série de reações alérgicas cutâneas (urticárias, equizemas), gastrointestinais (náuseas, diarréias, dores abdominais, vômitos), respiratórias (tosse, rinites) e sistêmicas (colapsos) (Sampson, 2004).

De acordo com alguns estudos, 4% da população mundial apresenta reações alérgicas alimentares mediadas pela produção de IgE (Kanny, 2001).

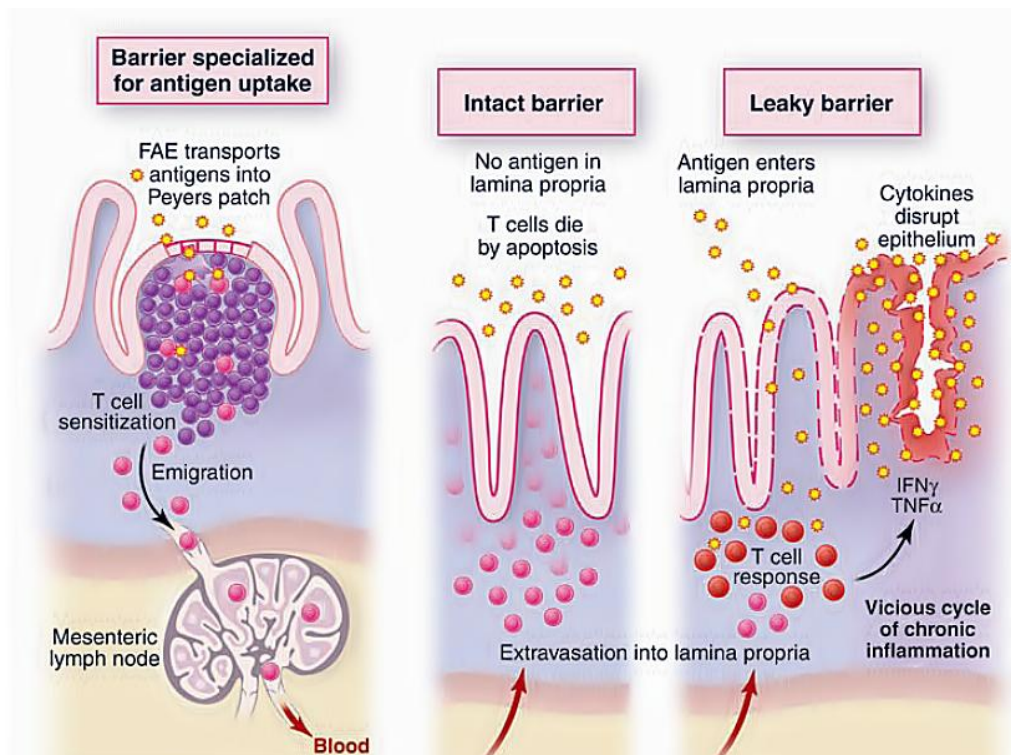
Curiosamente, 50% das crianças alérgicas ao leite de vaca não apresentam reações IgE-dependentes. Testes diagnósticos para alergia alimentar foram realizados para detectar na pele desses indivíduos anticorpos IgE ligados a mastócitos na pele, e isso não foi observado. Alega-se que as reações imunológicas que ocorrem são devido à ativação de células T efectoras ou de anticorpos da classe IgG (Bischoff et al., 2000; Majamaa et al., 1999; Veres et al., 2003).

Entretanto, é importante lembrar que embora anticorpos da classe IgE induzam a degranulação de mastócitos, os reais mecanismos efetores que acontecem nas lesões intestinais dos pacientes alérgicos são difíceis de identificar usando somente testes clínicos ou biopsias de mucosa (Bengtsson et al., 1997; Knutson et al., 1993; Lim et al., 2001).

Estudos em camundongos já demonstraram que a permeabilidade intestinal é alterada por consequência de numerosos fatores, como apoptose de células epiteliais, presença de patógenos, respostas celulares inflamatórias

com liberação de citocinas ou ingestão oral de etanol (Andrade et al., 2003; Hogan and Rothenberg, 2008).

Nas placas de Peyer, as células T CD4+ são ativadas por antígenos do intestino e migram para a *lamina própria*. Em indivíduos saudáveis, essas células morrem por apoptose, mas, na alergia alimentar, o aumento da permeabilidade pode levar a entrada exacerbada de antígenos para a *lamina própria* ativando mais que o normal as células T, quebrando a tolerância mediada pelas citocinas imunossupressoras e células T reguladoras. As citocinas pró-inflamatórias logo estimulam o aumento da permeabilidade epitelial, gerando um ciclo contínuo de inflamação (Macdonald and Monteleone, 2005)(Figura 3).



**Figura 3: O aumento da permeabilidade epitelial e seu papel no desenvolvimento do processo inflamatório mediado por células T do intestino.**

(Macdonald and Monteleone, 2005)

O colostro humano é rico em S-IgA materna. Estudos já comprovaram que bebês com amamentação exclusiva, apresentam baixa incidência de alergia alimentar (Zeiger and Heller, 1995). A presença no leite materno de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10 podem contribuir para o

desenvolvimento da tolerância oral, pelo fato de terem efeitos supressivos e por induzirem a produção de IgAS na mucosa (Brandtzaeg, 2010).

Outros estudos também já comprovaram que mães que apresentam baixos níveis de S-IgA específicas para proteínas do leite de vaca têm maior probabilidade de terem bebês alérgicos ao antígeno (Jarvinen et al., 2000; Savilahti et al., 1991).

O grupo de Sicherer observou que humanos alérgicos ao amendoim apresentam HLA (antígeno leucocitário humano) distintos dos indivíduos alérgicos ao leite de vaca (Sicherer, 2002). Ambos os grupos respondem preferencialmente às reações do tipo Th2 e cada um ao seu alérgeno específico, apresentando níveis séricos muito altos de IgE específica com subsequente desenvolvimento da alergia (Sicherer, 2002).

Como mencionado anteriormente, os antígenos solúveis são menos imunogênicos que os particulados. Estudos já demonstraram que bebês alimentados via mamadeira com introdução precoce de dieta sólida apresentam uma tendência a desenvolverem respostas tipo Th2 e conseqüente incidência de alergia alimentar (Anderson, 1997). A causa provável desse fato seria a complexidade das proteínas do leite contrapondo com a imaturidade do trato gastrointestinal dos bebês (Anderson, 1997).

As células epiteliais intestinais são importantes para o desenvolvimento da tolerância oral ou indução da alergia alimentar. Já foi demonstrado que enterócitos expressando MHC de classe II atuam como células apresentadoras de antígenos na mucosa intestinal (Blumberg et al., 1999; Yu and Perdue, 2001).

Além disso, outros trabalhos observaram que, em camundongos, após sensibilização com "*horseradish peroxidase*" (HRP), ocorre um transporte acelerado através do epitélio intestinal de complexos formados por alérgenos-IgE ligados ao receptor CD23 dos enterócitos com subsequente transferência aos mastócitos da mucosa (Yu & Perdue, 2001). Logo, essa via mediada pelo receptor CD23 dos enterócitos provavelmente facilita o transporte de antígenos específicos no epitélio intestinal de camundongos (Tu et al., 2005).

As células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas e macrófagos, também possuem função importante durante o

processo alérgico (Bilsborough and Viney, 2004). Essas APCs apresentam receptores do tipo Toll (“*Toll-like receptors*”-TLRs) que estão envolvidos no reconhecimento de alérgenos em mastócitos humanos estimulando a produção de citocinas, como IL-9 e IL-13 (Stassen et al., 2001). A IL-13 tem um papel importante na troca de isotipo para IgE e a IL-9 provavelmente está envolvida na diferenciação de células Th específicas, juntamente com a IL-4, auxiliando nas respostas alérgicas dependentes de IgE (Takeda et al., 2003).

Outra característica importante nas reações alérgicas é a acumulação de eosinófilos no sangue periférico e nos tecidos (Bischoff et al., 1997). A atuação dos eosinófilos como APCs promove uma expansão de células Th2 nos tecidos inflamados, amplificando as respostas imunes do tipo Th2 (Shi et al., 2004). Os eosinófilos expressam uma série de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD28, CD86, B7-1 e B7-2) (Woerly e cols., 1999; Rothenberg, 2001), algumas citocinas estimulatórias ( IL-2, IL-6, IL-12, IL-4, IL-10) (Kita and Gleich, 1996; Lacy et al., 1998; Lucey et al., 1989; Ohkawara et al., 1996) e podem induzir a expressão de MHC de classe II (Lucey et al., 1989) (Lucey e cols., 1989). Shi e colaboradores demonstraram que a transferência de eosinófilos ativados induz resposta antígeno-específica *in vivo* (Shi et al., 2004).

A ativação e o recrutamento dos eosinófilos para as áreas inflamatórias são dependentes da estimulação de eotaxina e IL-5 (Coeffier et al., 1994; Yamaguchi et al., 1988).

A IL-5 estimula a diferenciação e proliferação dos eosinófilos na medula óssea além de regular o recrutamento dos eosinófilos para os tecidos inflamados (Coeffier e cols., 1991; Rothenberg e cols., 1995). Já a eotaxina tem efeito quimiotático estimulando a acumulação de eosinófilos para os sítios inflamatórios (Coeffier et al., 1994; Rothenberg et al., 2001).

A utilização de modelos experimentais animais para a compreensão da patofisiologia de alergias alimentares tem aumentado gradativamente nos últimos anos (Knippels et al., 1999; McCabe et al., 2001), principalmente quando os órgãos em estudo são de difícil acesso, como o trato gastrointestinal (Untersmayr and Jensen-Jarolim, 2006).

Nos modelos de indução de alergia alimentar aplicados em roedores, a variedade de linhagens existentes, a utilização de animais geneticamente modificados e a possibilidade de análises experimentais com muitas amostras, são algumas das vantagens da aplicação freqüente desses modelos em trabalhos experimentais (Knippels et al., 1999; Noverr and Huffnagle, 2005).

Cara e colaboradores utilizaram modelo murino de alergia alimentar para analisar a indução de tolerância oral e a produção de IgE-específica (Cara, 1995). Observaram que, em animais tolerantes a alergia não era detectada e conseqüentemente a produção de IgE era baixa. Já os imunizados previamente com Ova, quando desafiados oralmente com o antígeno, apresentavam aversão ao mesmo e a produção de IgE era maior, o que caracteriza uma reação alimentar alérgica (Andrade, 1999; Cara, 1995).

Nesse trabalho, utilizaremos como antígeno a ovalbumina (Ova) e como adjuvante o hidróxido de alumínio (Al (OH)<sub>3</sub>), analisando a produção IgE, IgA secretória e de outras imunoglobulinas totais e específicas. Além disso, vamos avaliar as alterações ocorridas no intestino após o processo de envelhecimento em um modelo experimental de alergia alimentar murino anteriormente descrito por Saldanha e colaboradores (Saldanha e cols., 2004).

## ***O Envelhecimento***

Devido aos avanços da medicina, das políticas públicas de saúde e do desenvolvimento socioeconômico, estamos vivendo mais do que antigamente e em ritmo acelerado. Em 2009, havia cerca de 21 milhões de idosos no país e, entre 1999 e 2009, o percentual das pessoas com 60 anos ou mais de idade no conjunto da população passou de 9,1% para 11,3% (IBGE, 2010).

Segundo os dados do perfil dos idosos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1940, a média de vida do brasileiro (expectativa de vida ao nascer) era de 45,5 anos e em 2008, passou-se para 72,7 anos, ou seja, mais 27,2 anos de vida. De acordo com projeções, o país

continuará adicionando anos na vida média de sua população, alcançando em 2050 o patamar de 81,29 anos, basicamente o mesmo nível atual da Islândia (81,80), Hong Kong, China (82,20) e Japão (82,60). Em escala mundial, a esperança de vida ao nascer foi estimada, no período 2005-2010 em 67,2 anos e, para 2045-2050, a ONU projeta uma vida média de 75,40 anos (IBGE, 2010).

Entretanto, apesar do aumento do tempo de vida ser um fator positivo, também representa novos desafios para os indivíduos e para a sociedade. O avanço da idade é acompanhado pelo surgimento de doenças decorrentes do aumento da susceptibilidade a infecções.

Nos mamíferos, o desenvolvimento, a diversificação estrutural e a maturação funcional do repertório imune são marcadas por um processo contínuo e dinâmico. Esse processo, denominado senescência, se inicia na vida fetal e culmina com a senescência (Ogra, 2010).

Apesar do grande progresso nos últimos anos da caracterização do sistema imune da mucosa, ainda não está claro quais são as reais alterações que ocorrem nesse sistema com o envelhecimento (Fujihashi and Kiyono, 2009).

De acordo com alguns trabalhos, o envelhecimento afeta tanto a resposta imune adaptativa quanto inata. A ativação de macrófagos, migração e fagocitose de células dendríticas, ativação mediada por receptores Toll, síntese de intermediários reativos de oxigênio e a eficiência de fagocitose dos neutrófilos demonstram estar enfraquecidas ou desreguladas em algum grau durante o processo de senescência (Nikolich-Zugich, 2005; Pfister and Savino, 2008).

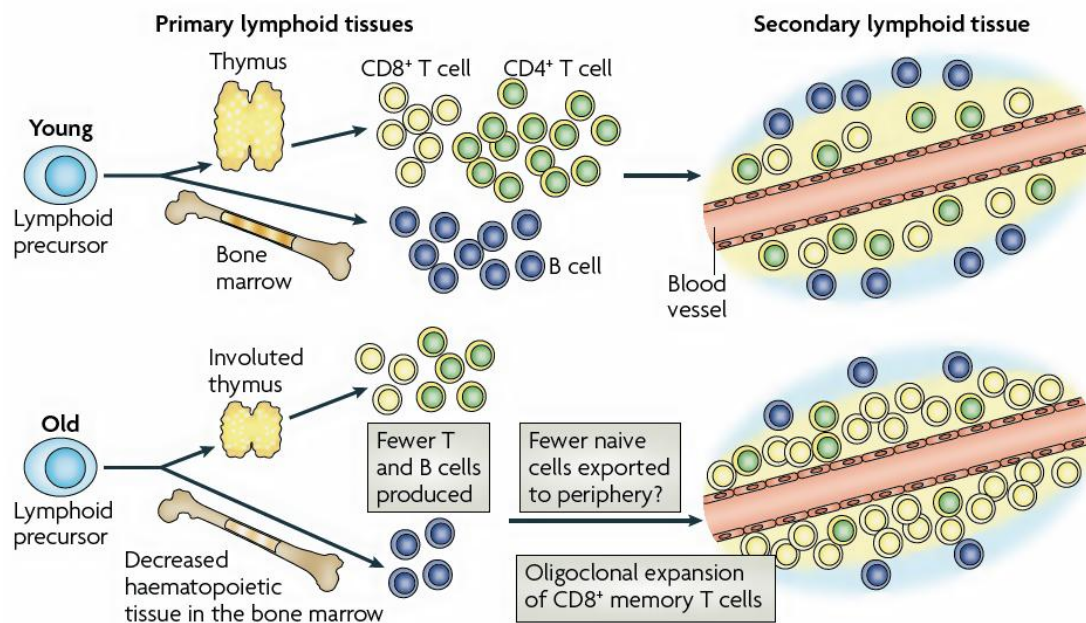
Em humanos idosos, observamos a proliferação de células NK maduras, porém, a citotoxicidade e a produção de citocinas por essas células estão reduzidas devido aos efeitos do envelhecimento (Solana and Mariani, 2000).



Na imunidade adaptativa, os efeitos do envelhecimento são drásticos nas propriedades das células B e T. No entanto, as células T têm se mostrado mais susceptíveis aos efeitos do envelhecimento (Listi et al., 2006; Taub and Longo, 2005). Essa maior susceptibilidade se dá pelo fato das células T serem produzidas no timo, o qual involui com o avançar da idade, diminuindo assim, a produção de timócitos tanto em humanos quanto em camundongos. Acreditava-se que a perda de timócitos e de massa tímica estava diretamente relacionada ao declínio da função imune mediada por células T, assim como a resistência reduzida a infecções e a incidência aumentada de câncer e doenças autoimunes no idoso. Entretanto, vários trabalhos mostram que, apesar da atrofia significativa, o timo do idoso ainda tem capacidade, ainda que reduzida, de promover diferenciação de células T e de produzir células T virgens (Taub and Longo, 2005).

Durante o processo de envelhecimento, distúrbios na sinalização das células T supressoras podem estar associados com a relativa abundância de células T *helper*. As respostas imunes funcionais e reguladoras alteradas do GALT podem explicar o aumento da incidência de infecções e neoplasias no trato gastrointestinal com a o avançar da idade ( Schmucker ET AL,2003; Thoreux,2007).

No processo de envelhecimento, células T CD4<sup>+</sup> virgens secretam níveis mais baixos de IL-2 levando a uma diminuição na expressão de CD25 (IL-2R). Além disso, elas apresentam uma proliferação reduzida e diferenciação incompleta para células T efectoras Th1 ou Th2 (Linton and Dorshkind, 2004).



(Dorshkind et al., 2009)

#### Figura 4: Efeitos do envelhecimento na produção de linfócitos e na distribuição para os órgãos secundários.

Muitos eventos contribuem para o declínio do número e da função das células do sistema imune adaptativo com o avanço da idade. A geração de células T diminui como resultado da involução tímica (que envolve o decréscimo das massas medulares e corticais tímicas e aumento de gordura). A produção de células B provavelmente também diminui com o envelhecimento devido ao declínio de medula óssea hematopoiética. Logo, poucas células T virgens e possivelmente poucas células B são exportadas para a periferia. A expansão oligoclonal da população de células T CD8+ se inicia por volta dos 60 anos de idade, o que resulta no declínio do repertório de células T virgens e o aumento de células T CD8+ de memória na periferia.

Estudos em camundongos demonstram que o perfil de produção de citocinas por células T ativadas também é alterado durante o processo de senescência. Observa-se uma redução de IL-2, TNF- $\alpha$ , e GM-CSF e um aumento de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 por células T CD4<sup>+</sup> (de Faria et al., 1998; Kang et al., 2004). Entretanto, em humanos, alguns autores relatam que a produção de IL-2 por células T CD4<sup>+</sup> virgens é relativamente normal e essas células se diferenciam em células T efetoras de maneira similar àquela ocorrida em indivíduos jovens (Gomez and Cabrini, 2004).

A redução substancial de linfócitos T virgens e o aumento concomitante de linfócitos T de memória pode ser uma das razões pela qual a imunidade mediada por célula esteja prejudicada no idoso (Linton and Dorshkind, 2004). Essa troca de populações parece ser uma consequência da

proliferação homeostática compensatória em resposta ao número reduzido de linfócitos T naive, assim como, à influência da exposição acumulativa a antígenos (Linton and Dorshkind, 2004). O efeito dessa redução de células T virgens no “pool” periférico seria uma contração do repertório de células T que levaria a uma baixa capacidade de responder a novos antígenos. Outra possível razão para essa baixa capacidade de resposta seria a ativação alterada das células T de memória que se acumulam no envelhecimento (Linton and Dorshkind, 2004).

Alguns trabalhos demonstram que a frequência aumentada de doenças autoimunes na senescência pode ser devida a uma transdução de sinais alterada em células T e B (Hasler and Zouali, 2005). 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 sinais de transdução no receptor de células B (BCR) e outros receptores (Hasler and Zouali, 2005).

Concomitantemente com a produção tímica reduzida de células T não reguladoras é concebível que também haja uma redução na produção de células T reguladoras (Tregs) ao longo do envelhecimento. Sendo assim, caminhos alternativos para a geração periférica de Tregs são necessários para compensar esse déficit e para 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 et al., 2006).

Outra alteração comum de células T no envelhecimento é a expansão clonal de células T CD8+, sendo que um único clone pode ocupar uma proporção significativa do total no “pool” de células T CD8+. Embora também possa ocorrer expansão clonal de células T CD4+, a expansão de células T CD8+ é mais proeminente (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2008). Ainda é questionável se as Tregs mantêm seu repertório policlonal no envelhecimento. Um estímulo recorrente antigênico poderia reduzir a diversidade dessas células.

Em relação ao repertório de células B, observou-se que a produção de células B pela medula óssea declina significativamente com a idade (Min et al., 2006). Em humanos senescentes, a afinidade dos anticorpos pelo antígeno é baixa e a troca de isotipo das células B é deficiente quando comparadas às células jovens (Frasca et al., 2008). Trabalhos na literatura relatam um declínio na produção de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA em linfonodos periféricos e de IgA secretória no muco intestinal de animais idosos (Fujihashi and McGhee, 2004). Entretanto, outros estudos observaram um aumento de IgM e IgG no soro e de IgA na saliva de humanos idosos (Arranz et al., 1992).

Em trabalho recente do nosso grupo, mostramos que vários elementos reguladores presentes na mucosa intestinal, tais como linfócitos intraepiteliais com TCR $\gamma\delta$ , a produção local de TGF- $\beta$  e IL-10 assim como a frequência de células Treg com o fenótipo CD4+LAP+, estão reduzidos durante do processo de envelhecimento em camundongos. No entanto, alguns outros elementos como as células Treg CD4+CD25+Foxp3+ da mucosa intestinal são particularmente resistentes aos efeitos do envelhecimento e a preservação dessas células pode estar relacionada à manutenção da homeostase intestinal em animais idosos (Santiago et al, 2011).

Deste modo, podemos observar que, no envelhecimento, ocorrem alterações de vários mecanismos e células do sistema imune em geral e do tecido linfóide associado ao intestino em particular, dos quais grande parte está envolvida na indução da tolerância oral. Sendo assim, provavelmente o fenômeno do envelhecimento atue de alguma forma no processo de indução da tolerância oral.

Neste trabalho, analisaremos os efeitos do processo de envelhecimento na indução de tolerância oral e da alergia alimentar. Trabalhos anteriores do nosso laboratório demonstraram que camundongos idosos exibem um decréscimo na susceptibilidade à indução de tolerância oral. Várias linhagens de camundongos foram testadas e observou-se que a partir de 20<sup>o</sup> semana de idade a indução de tolerância oral e seus efeitos sistêmicos são alterados pelo processo de senescência (Faria et al., 1993).

Sendo assim, utilizamos neste trabalho camundongos jovens (8 semanas de idade), de 28 semanas ( $\pm$  6 meses), 53 semanas (se um

camundongo tem tempo de vida estimado por volta de dois anos, 53 semanas seria a metade do seu tempo de vida) e camundongos de 92 semanas de idade, com quase 2 anos de idade.

## 2. Objetivo Geral

Estudar os efeitos do envelhecimento na indução de tolerância oral e no processo de alergia alimentar.

### *Objetivos Específicos*

1. Avaliar a susceptibilidade de camundongos fêmeas BALB/c quanto à:
  - Indução de tolerância oral, utilizando como adjuvante hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) durante o processo de envelhecimento;
  - Produção de anticorpos totais e específicos, séricos e fecais contra ovalbumina (Ova).
2. Analisar, em camundongos fêmeas BALB/c, como as mudanças ocorridas durante o envelhecimento interferem na indução de tolerância oral avaliando:
  - Frequência e função de células T reguladoras (LAP+, CD4+CD25+FoxP3+) em linfonodos mesentéricos, placas de Peyer e baço de animais senis comparados com animais jovens, após a administração oral da Ova;
  - Produção de citocinas (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-2, IL-5, TNF- $\alpha$ ) por células isoladas de baço, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de animais senis comparados com animais jovens, após a administração oral de Ova;
3. Avaliar a susceptibilidade de camundongos fêmeas BALB/c jovens e idosos quanto à:
  - Indução de alergia alimentar através da análise da aversão ao consumo da Ova e peso dos animais;

- Características fenotípicas das subpopulações de linfócitos (utilizando os marcadores CD4, CD25, CD45RBlow) isoladas do baço, linfonodos mesentéricos;
4. Avaliar a susceptibilidade de camundongos DO11.10 BALB/c de 53 semanas quanto à:
- Indução de alergia alimentar;
  - Frequência de células T reguladoras das subpopulações CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP; CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> na indução da tolerância oral e na alergia alimentar.

### **3. Materiais e Métodos**

#### ***A. Animais***

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c com idade de 8 a 92 semanas de idade que foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG e mantidos no Biotério Experimental do Laboratório de Imunobiologia.

Também foram utilizados camundongos DO.11.10 (transgênicos para o TCR reativo com o peptídeo 323-339 da ovalbumina) (Haskins et al., 1983; Kearney et al., 1994).

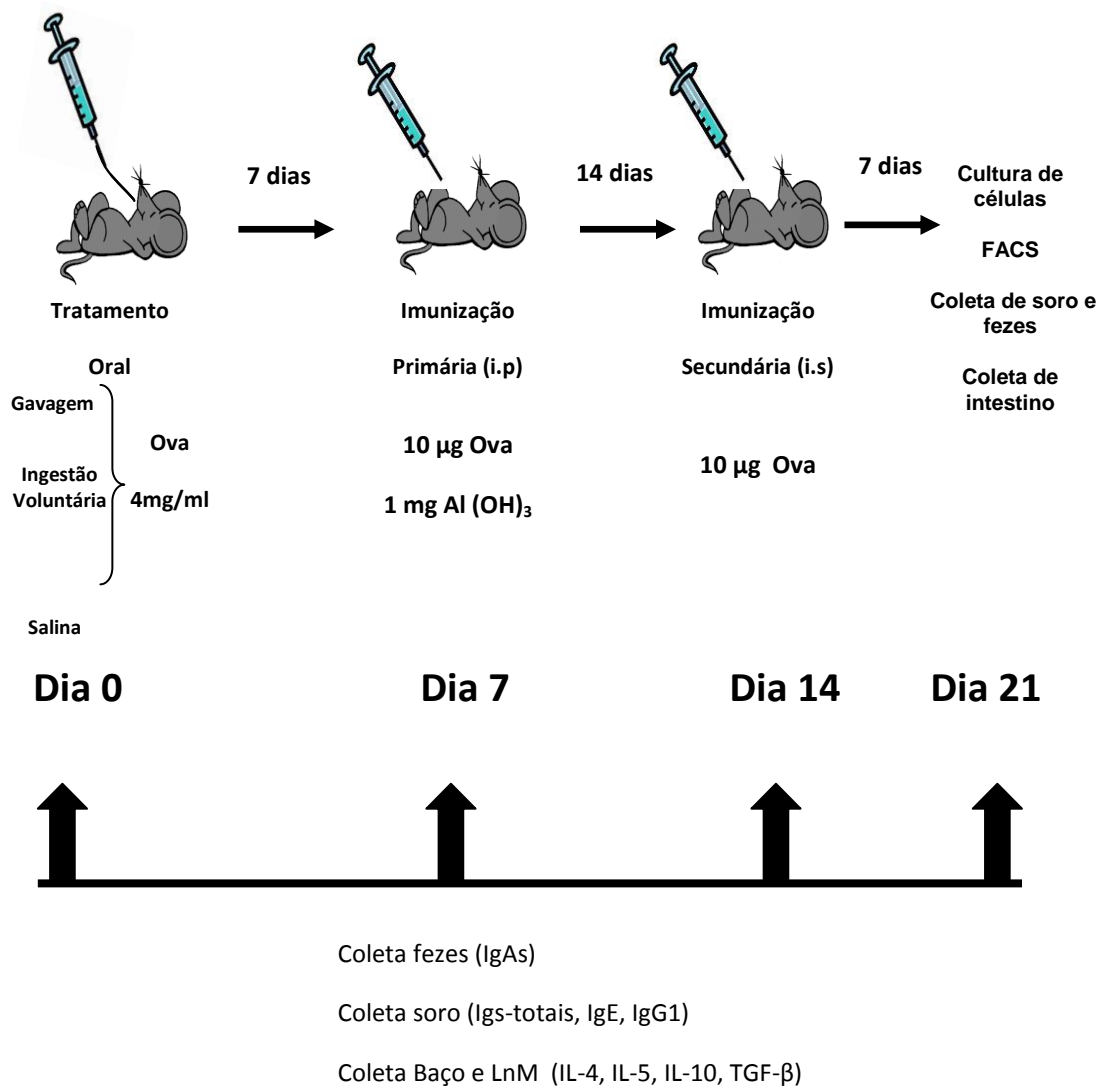
Os camundongos DO.11.10 possuem o fundo genético BALB/c e, na nossa colônia, contam com 60-85% dos linfócitos T circulantes positivos para o anticorpos KJ.17 (reativo com o TCR transgênico). Esses animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. Os animais permaneceram em ambiente com controle de iluminação, ventilação e temperatura, e também receberam água e comida sem restrições durante todo o tempo do experimento.

#### ***B. Protocolo Experimental para Indução de Tolerância Oral em camundongos BALB/c idosos:***

Animais de 8, 28, 53 e 92 semanas de idade foram tratados por via oral com Ova (grupos gavagem e ingestão voluntária) ou salina (grupo imune). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção de 10 µg de OVA e 1 mg 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 reforço com Ova, os animais foram sacrificados para obtenção do soro, fezes e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo: 5

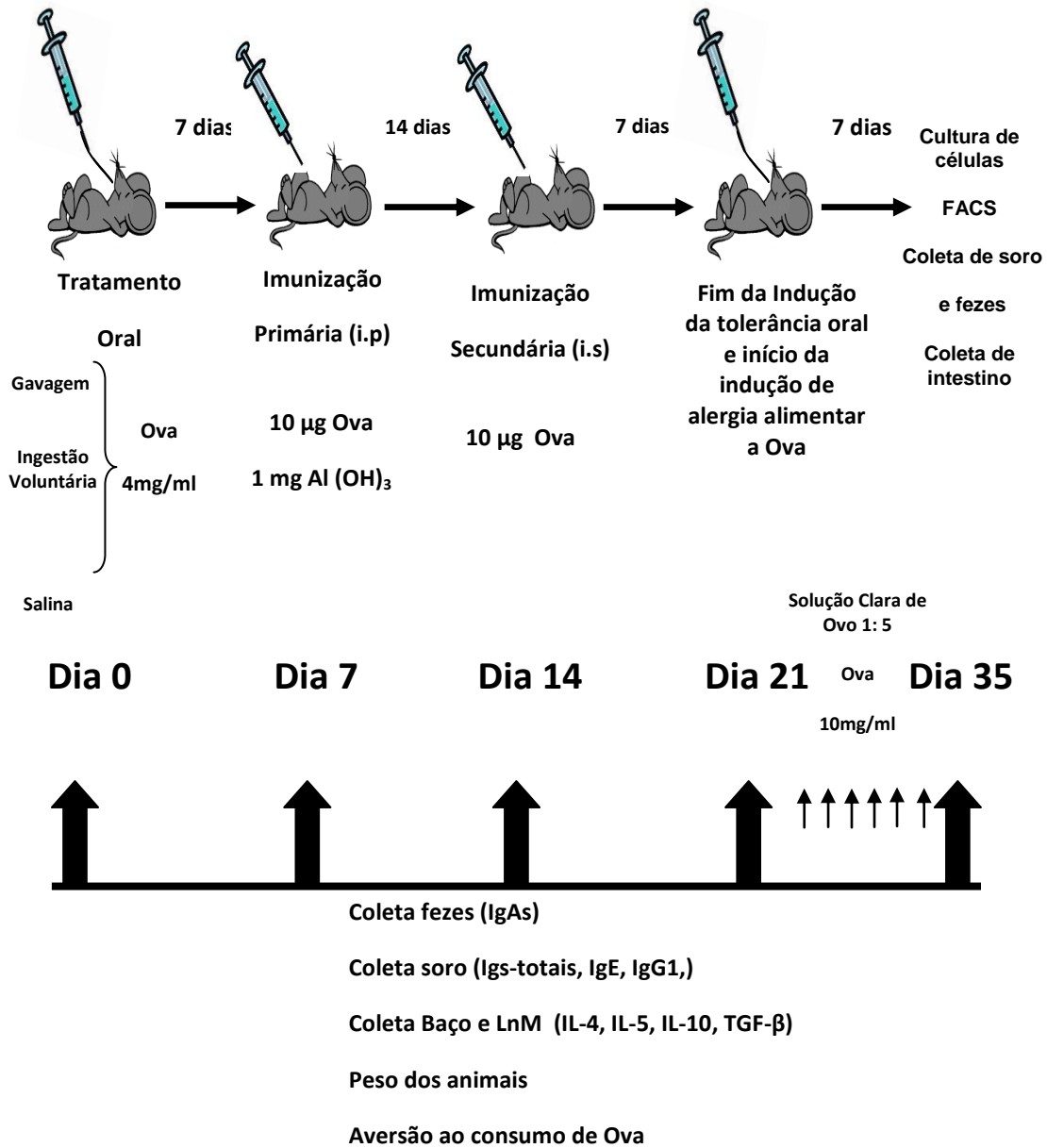




### ***C. Protocolo Experimental para Indução de alergia alimentar em camundongos BALB/c idosos:***

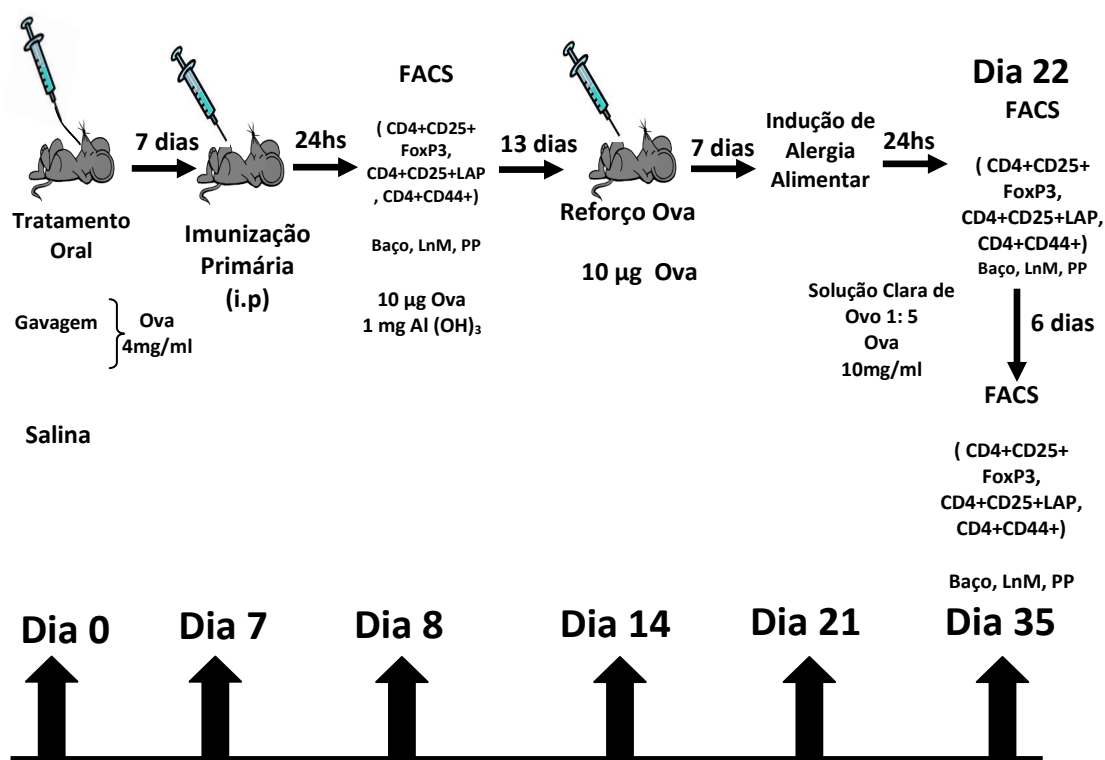
Animais de 8 e 53 semanas de idade foram tratados por via oral com Ova por gavagem (grupo tolerante) ou salina (alérgico). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção de 10 µg de OVA e 1 mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M) 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, fezes e órgãos para suspensão de células. Sete dias após a imunização secundária iniciou-se a indução de alergia alimentar com solução de clara de ovo diluída 1:5 em água, contendo aproximadamente

10 mg/ml de Ova e após sete dias consecutivos os animais foram sacrificados e os mesmos órgãos já descritos coletados. Número de animais/grupo: 5



#### ***D. Protocolo Experimental para Indução de alergia alimentar em camundongos idosos DO. 11.10:***

Animais transgênicos DO.11.10 de 53 semanas de idade foram tratados oralmente com Ova por gavagem (GRUPO TOLERANTE) ou salina (GRUPO IMUNE). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção de 10 µg de OVA e 1 mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M) na cavidade peritoneal. Após 24hs, analisamos a produção de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+, CD4+CD25+LAP+, CD4+CD25-LAP+ e CD4+CD44+ no baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer dos animais por citometria de fluxo. Após 13 dias, foi realizada a imunização secundária que consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Sete dias após a imunização secundária iniciou-se a indução de alergia alimentar com solução de clara de ovo diluída 1:5 em água, contendo aproximadamente 10 mg/ml de Ova. Após 24hs, analisamos novamente a produção de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3, CD4+CD25+LAP, CD4+CD25-LAP, CD4+CD44+ no baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer dos animais por citometria de fluxo e após seis dias consecutivos avaliamos novamente a produção das células T reguladoras acima citadas dos mesmos órgãos já descritos. Número de animais/grupo:5



### E. Indução de Tolerância Oral

O protocolo para a indução de tolerância oral já descrito em trabalhos anteriores do laboratório (Faria, 1993; Faria, 1998) que consiste inicialmente em tratar os animais por via oral com 20mg de ovalbumina (Ova), 3 vezes cristalizada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em salina (NaCl 0,15M). Cada animal recebe 20mg de Ova em 0,2 ml de solução aquosa por administração intragástrica (gavagem) utilizando-se uma agulha com ponta arredondada ou por ingestão voluntária de uma solução contendo 4mg/ml de Ova (cada animal bebe média 5 ml por dia) por um período de 24 horas. Sete dias após o tratamento oral, os animais foram imunizados por via intraperitoneal (i.p.) com 10 µg de Ova e 1mg de Al (OH)<sub>3</sub>. Logo após 14 dias, é realizada uma imunização secundária com 10 µg de Ova diluídos em 0,2 ml de salina (NaCl 0,15M). Sete dias após o *booster* com Ova, os animais são sacrificados e os parâmetros desejados avaliados.

## ***F. Indução de alergia alimentar***

O modelo para indução de alergia alimentar já foi descrito por Saldanha e colaboradores (Saldanha e cols. 2004). Sete dias após a imunização secundária, os camundongos foram expostos por via oral a uma solução de clara de ovo (1:5) diluída em água durante sete dias como única fonte de líquido. De acordo com Saldanha e colaboradores, essa solução de clara de ovo contém aproximadamente 10 mg Ova/ml (Saldanha e cols.,2004)

As mamadeiras com essa solução foram pesadas e trocadas diariamente para avaliação do consumo. O consumo foi medido através da comparação da quantidade ingerida por cada grupo experimental com o grupo controle composto de animais normais. Deste modo, padronizamos que o líquido ingerido pelo grupo controle equivalia a 100%; logo, os valores dos grupos experimentais foram obtidos calculando-se a porcentagem correspondente desse valor.

## ***G. Obtenção dos soros***

Antes de cada experimento, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,1ml de uma solução contendo 1,7mg do anestésico cloridrato de ketamina misturado a 0,33mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) em tampão fisiológico. Logo após anestesiados, foi feita uma incisão na veia axilar de cada animal e o sangue foi coletado em tubos eppendorfs. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os órgãos e o intestino foram coletados e processados. Os soros foram obtidos após coagulação por centrifugação a 2500 rpm e estocados a -20°C para posteriores análises.

## ***H. Obtenção do muco intestinal***

Os camundongos foram separados em gaiolas individuais e as fezes de cada animal coletadas preferencialmente no período da manhã. As fezes de cada camundongo foram pesadas e para cada 100 mg de fezes usou-se 1ml

PBS gelado. A mistura foi agitada por 5 minutos; centrifugada por 30 minutos a 2000 rpm; e o sobrenadante coletado. Em todos experimentos, a dosagem da produção de IgAs secretória foi feita no mesmo dia do sacrifício dos animais, para evitar eventual degradação da imunoglobulina.

### ***I. Medida de anticorpos séricos totais anti-Ova por ELISA***

Microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com a solução de Ova (2µg/poço) em tampão carbonato pH 9,6 (100µl/poço) e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com salina contendo 0,05% Tween-20 (solução salina-Tween) (SIGMA Chemical Co.), e bloqueadas com 200 µL/ poço de 0,25% caseína diluída em PBS (PBS-caseína), por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween e, em seguida, foram incubadas com o soro dos camundongos em diluição seriada (1:100 a 1:12800) em PBS-caseína durante uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes e incubadas com 100 µL/ poço da solução do anticorpo anti-Igs totais conjugado à peroxidase de camundongo (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. Após esse tempo, as placas foram lavadas novamente com salina-Tween por seis vezes e foram reveladas através da incubação com 100 µL/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 20 µL/ poço da solução de ácido sulfúrico 2N. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm. Todas as placas tiveram como controle positivo, um soro imune e como controle negativo, um soro normal em diluições seriadas.

### ***J. Medida de IgG1 e IgG2a anti-Ova por ELISA***

Esse protocolo foi realizado como o descrito no item 6 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, foi feito o bloqueio com 200 µL/ poço de PBS-caseína, por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Após essa etapa, foi adicionado o soro diluído a 1:10, realizadas diluições seriadas e as placas foram incubadas a 37°C durante uma hora. Após lavagem, foram adicionados os anticorpos anti-isotipos marcados com peroxidase (*Goat anti-mouse IgG1-HRP* Southern Biotechnology Associate Inc. ou *Goat anti-mouse IgG2a UNLB*) na diluição de 1:15.000. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase foi requerida para *IgG2a UNLB*, incubando-as com na diluição de 1:15000 por 45 minutos. Após incubação durante a 37°C, foi usado o sistema de revelação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD já descrito anteriormente.

### ***K. Obtenção das Fezes e Preparo para dosagem de S-IgA***

Os camundongos foram separados individualmente por gaiola um dia antes da coleta de fezes. As fezes de cada animal foram recolhidas com pinça para microtubos de centrifuga de 1,5 ml e mantidas no gelo (para não reduzir os níveis de S-IgAs). As fezes foram pesadas e para cada 0,1g de fezes foi adicionado 1mL de PBS 1X gelado. A seguir, o conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 600g a 4°C. O nível de S-IgAs foi dosado por *ELISA* no dia da coleta.

### ***L. Medida de IgA secretória anti-ova por ELISA***

Em resumo, microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) são sensibilizadas (100µL/poço) com uma solução contendo Ova (4µg/poço) diluídas em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas são lavadas salina-Tween por três vezes e bloqueadas com 200 µL/ poço de PBS-caseína, por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Foi adicionado 200 µL/ poço do muco intestinal total e mantidos durante uma hora a 37°C. Para controle positivo padrão, foram utilizados anticorpos IgA purificados de camundongos (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro (branco). Em seguida,

as placas foram incubadas com 100 µL/ poço da solução de anticorpo anti-IgA conjugado à peroxidase (*Goat anti-mouse IgA – HRP* Southern Biotechnology Associate Inc,) na diluição de 1:2000 durante uma hora a 37°C. As placas foram reveladas através da adição de 100 µL/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 20 µL/poço da solução de ácido sulfúrico 2N. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

### ***M. Medida de IgA secretória total por ELISA***

Esta medida foi realizada conforme descrito anteriormente com algumas modificações. Microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 100 µL/ poço com anticorpos policlonais de cabra anti-imunoglobulinas de camundongo (1:2000) (Southern Biotechnology Associate Inc.), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com salina contendo 0,05% Tween-20 (solução salina-Tween) (SIGMA Chemical Co.), e bloqueadas com 200 µL/ poço de 0,25% caseína diluída em PBS (PBS-caseína), por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween e, em seguida, os mucos foram adicionados (100 µL/poço) em diluições seriadas (fator 0.5) a partir de 1:20 para IgA do lavabo intestinal. Em seguida, as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 100 µL/ poço da solução do anticorpo policlonais de cabra específicos para as cadeias α de camundongos (Southern Biotechnology Associate Inc.) conjugados com biotina (1:10000) durante uma hora a 37°C. Novamente as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 100 µL/ poço de uma solução de streptavidina conjugada à peroxidase (1:15000) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. Em seguida as placas foram lavadas com salina-Tween e foram reveladas através da incubação com 100 µL/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 20 µL/ poço da solução de ácido sulfúrico 2N. Ao final, a reação foi detectada através



de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

### ***N. Medida de IgE sérica anti-Ova por ELISA***

Microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 50 µL/ poço com anticorpos de rato anti-IgE de camundongo (*rat anti-mouse IgE-UNLB*, Southern Biotechnology Associate Inc.) na diluição 1:250 e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram bloqueadas com 200 µL/ poço de PBS-caseína, por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Foram adicionados em seguida 50 µL/ poço do soro total e mantidos durante duas horas a temperatura ambiente. Em seguida, após cinco lavagens com salina-Tween, foi adicionada uma solução de Ova biotinizada (50 µL/poço) diluída em PBS-caseína (1:200) e as placas foram incubadas durante uma hora em temperatura ambiente. Após esse período, uma solução adicional de detecção contendo estreptoavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology Associate Inc.) na diluição de 1:15.000 (50 µL/ poço) foi adicionada e as placas incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação.

### ***O. Medida de IgE sérica total por ELISA***

Em resumo, microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) são sensibilizadas com 50 µL/ poço com anticorpos de cabra anti-IgE totais de camundongo (1:250) (Southern Biotechnology Associate Inc.), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram bloqueadas com 200 µL/ poço de PBS-caseína, por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Foram adicionados 50 µL/ poço do soro total e mantidas durante uma hora a 37°C. Para controle positivo padrão, foram utilizados anticorpos IgE purificados de camundongos (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro (branco). Em seguida, as imunoglobulinas ligadas foram detectadas utilizando 50 µL/ poço da solução do anticorpo anti-IgE marcada com biotina (1:500)

(Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. As placas foram incubadas com 50 µL/ poço de uma solução de streptavidina conjugada à peroxidase (1:5000) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. Para revelação, foi adicionado 100 µL/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 20 µL/ poço da solução de ácido sulfúrico 2N. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

## ***P. Preparação de suspensão das células linfóides***

### **a) Meio de cultura**

Foi utilizado meio RPMI 1640 como meio incompleto e, como meio de cultura, RPMI 1640 enriquecido com 2 nM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercaptoetanol, 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.

### **b) Preparação de suspensões celulares**

As suspensões de células do baço, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos (LnM) foram preparadas de acordo com a seguinte técnica, padronizada em nosso laboratório:

- Retirar os órgãos e mantê-los em meio incompleto;
- Colocar o baço em um macerador de vidro e pressionar em meio incompleto. No caso dos LnM, placas de Peyer macerá-los utilizando as extremidades ásperas de lâminas de vidro;
- Transferir a suspensão de células para um tubo de 15 mL;
- Centrifugar a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C;
- Desprezar o sobrenadante e ressuspender as células em meio completo e contar as células viáveis;

Obs: no caso do baço, desprezar o sobrenadante e acrescentar 9 mL de água destilada para lisar as hemácias, e imediatamente após, adicionar 1 mL

de PBS 10X concentrado. Centrifugar novamente a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Ressuspender as células em meio completo e contar as células viáveis.

### **c) Contagem das células viáveis**

Para a contagem das células viáveis, foi utilizado o corante eritrocina. Misturar 50 µl da suspensão celular em volume igual de eritrocina e colocar na Câmara de Neubauer. Após a contagem das células não-coradas (viáveis), o número de células é expresso de acordo com a fórmula: n° de células / ml = (células viáveis x diluição x 10<sup>4</sup>)/n° campos contados na Câmara de Neubauer.

## ***Q. Cultura de células e coleta do sobrenadante***

Foi colocado 125 µl/ poço da suspensão de células, com concentração igual a 5 x 10<sup>6</sup> (para cultura celular) – 1 x 10<sup>7</sup> células/ ml (para citometria de fluxo) em uma placa de 96 poços. Foram adicionados 125 µl/ poço da solução do mitógeno Concanavalina A (Con A) 2 µg/ml como controle positivo de ativação (SIGMA), solução de Ova (60mg/ml) (100 µl/ poço) e de meio (100 µl/ poço) para controle negativo de ativação. As culturas estimuladas com Con A foram utilizadas como controle positivo do ensaio e aquelas não estimuladas com meio foram utilizadas como controle negativo. Os dados de estimulação específica são obtidos pela subtração do controle negativo no valor encontrado na cultura estimulada com Ova. As células foram mantidas em cultura em uma estufa umidificada com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 24h e 72h, foi coletado 200 µl de sobrenadante para dosagem de citocinas.

## ***R. Medida da concentração de citocinas no sobrenadante da cultura celular por ELISA***

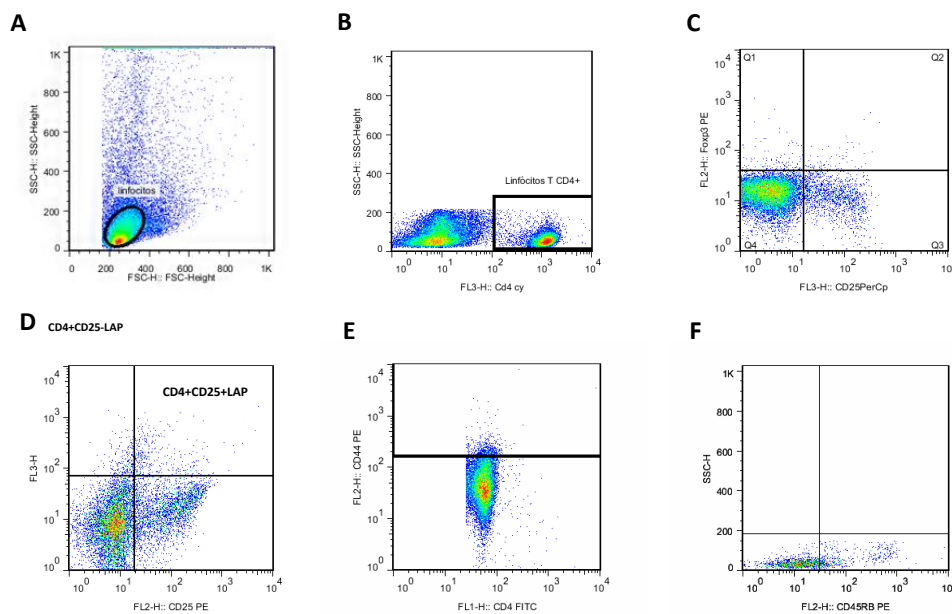
As placas foram sensibilizadas com 50 µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra IL-5, IL-10, TNF-α, IL-2, IL-4, e TGF-β, 1 µg/ml (R&D SYSTEMS), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina tween e bloqueadas 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 50 µl/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para IL-5, IL-10, TNF-α, IL-2, IL-4 (BD Pharmingen) e TGF-β (R&D SYSTEMS) marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/ml. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (50 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 (λ = 490 nm) de cada poço foi obtida pelo leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

### ***S. Obtenção dos dados no citômetro de fluxo e análise dos resultados***

Em uma placa de 96 poços de fundo em U foram colocados 25 µl de suspensão celular (250.000 – 500.000 células/well) e 10 µl de anticorpos (na diluição padronizada) conjugados com fluorocromos – PE(ficoeritrina), FITC(fluoresceína) ou CyChrome (Cy) – que se ligam às moléculas de interesse (CD4, CD25, Foxp3, CD44, CD45RB e LAP), expressas nas células de camundongos. As placas foram então encubadas a 4°C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foi então acrescentados 200 µl 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 ressuspendido em 200 µl de paraformaldeído 1% e as suspensões armazenadas a 4 °C e protegidas de luz até aquisição em FACScan. No caso de anticorpos que não estavam marcados diretamente com fluorocromo (ex: conjugados a biotina), após a primeira lavagem as células foram incubadas com 10µl 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 paraformaldeído 1% para aquisição. Para marcação intracelular de Foxp3 as amostras foram permeabilizadas com PBS-saponina após fixação e então incubadas com o anticorpo anti-Foxp3 PE por 30 minutos a 4 °C. Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com PBS-saponina e uma vez com PBS azida. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µl de paraformaldeído 1% e as suspensões armazenadas a 4 °C e protegidas de luz até aquisição em FACScan. Em todos os órgãos foram utilizados os anticorpos IgG1 ou IgG2 FITC, PE ou CyChrome para controle negativo. A aquisição dos dados foi realizada utilizando um FACScan de três cores (Becton Dickison, Mountain View, Califórnia). O número absoluto de células foi calculado a partir da contagem do número de células total de cada órgão isolado e analisados através do software FlowJo Three Stars.



### Figura 5: Análise de leucócitos do baço por citometria de fluxo.

A figura 4A representa um perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de linfócitos. A figura 4B representa SSC versus a população CD4+ (CY ou PE). As figuras 4 C-F representam as populações FL2 vs FL3 CD25+(FITC)Foxp3+(PE), CD25+(FITC)LAP+(CY), CD25-(FITC)LAP+(CY) CD4(FITC) vs CD44(PE), CD45RB(PE) vs SSC dentro do gate de linfócitos.

## ***T. Análise Estatística***

A análise foi realizada entre os grupos em um mesmo tempo por ANOVA para testar a hipótese de que os valores entre grupos experimentais são diferentes em um mesmo tempo e teste t de *Student* bi-caudal entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes para testar a hipótese de que o valor médio de um grupo experimental é diferente entre diferentes tempos. Foi utilizado grau de significância  $p < 0,05$ .

## ***U. 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 ( $C_6H_8O_7$ ) 0,1M

Solução de ácido sulfúrico

$H_2SO_4$  2N

Solução do substrato (por placa)

OPD: 4 mg

$H_2O_2$  2 $\mu$ 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

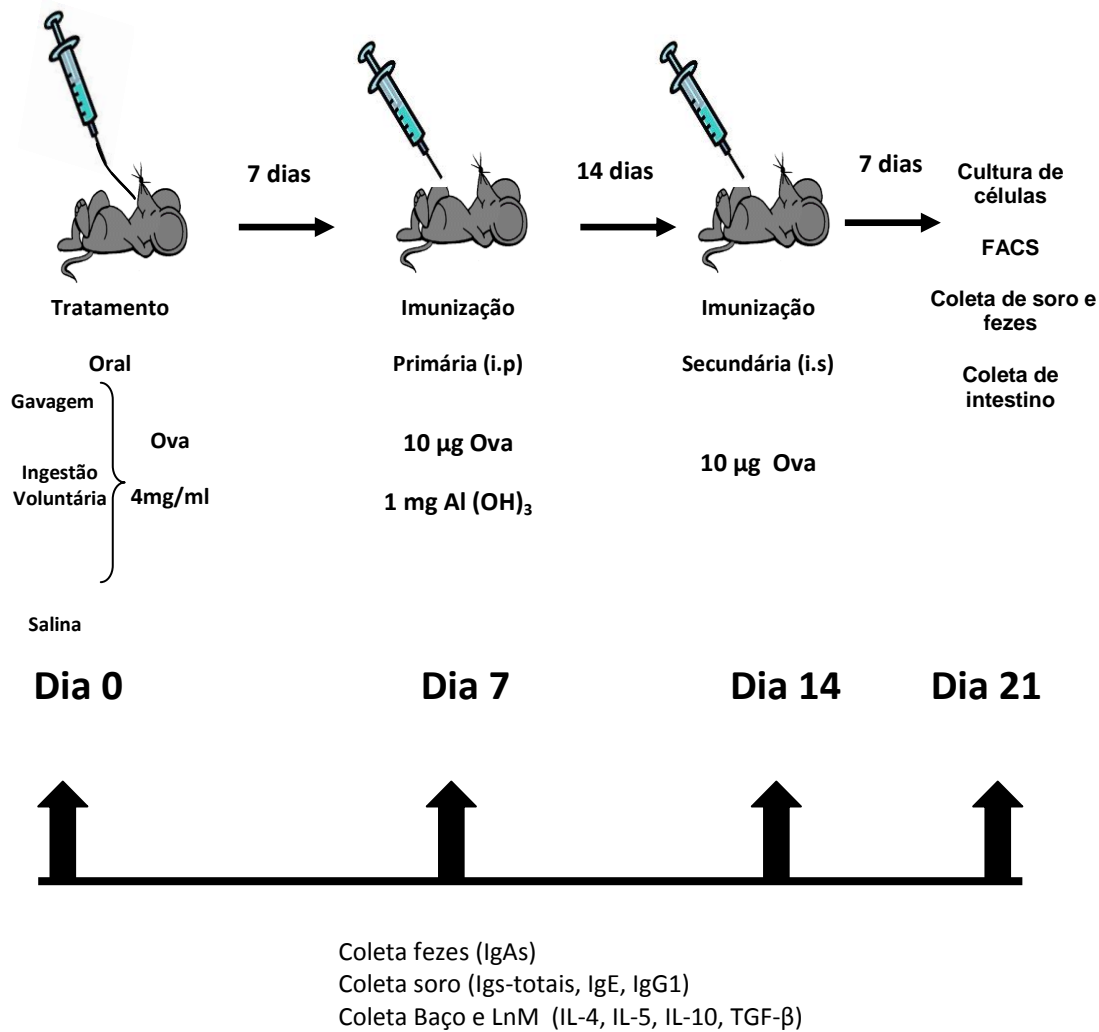
Paraformaldeído 1%

## **4. Resultados**

### **Parte I:**

## **O Processo de Envelhecimento e a Indução da Tolerância Oral**





**Protocolo 1 : Indução de Tolerância Oral em camundongos BALB/c idosos normais.**

**A. Avaliação da Indução da tolerância oral durante o processo de envelhecimento.**

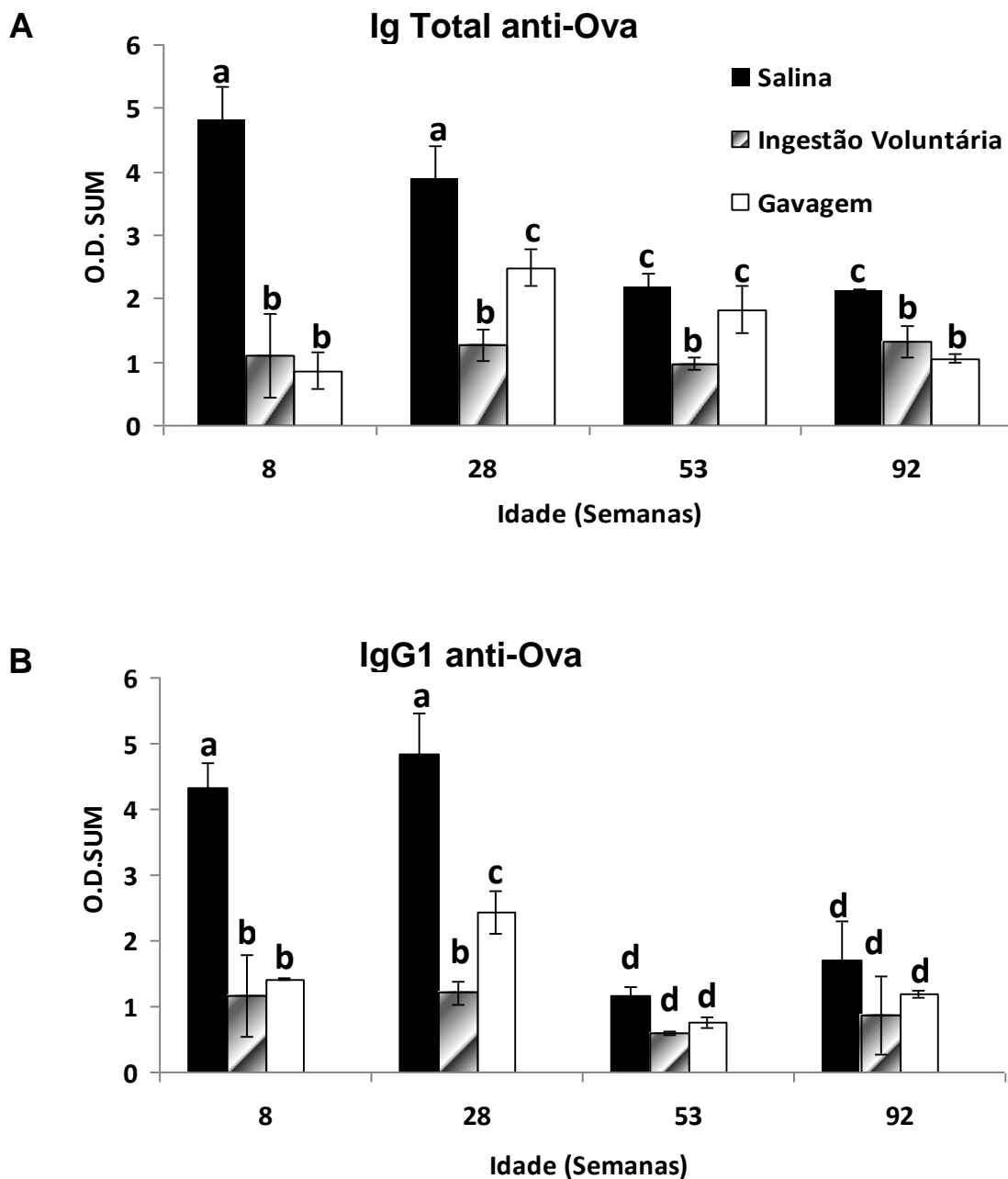
Inicialmente, analisamos os efeitos do envelhecimento na indução de tolerância oral, utilizando como antígeno a ovalbumina (Ova) e hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) como adjuvante, conforme mostrado no Protocolo 1. Para tal, foram analisados os níveis de imunoglobulinas totais anti-Ova (IgTotal anti-Ova) e de IgG1 (Fig.6 A e B respectivamente) e IgG2a anti-Ova (Fig.7) .Os animais do grupo salina serão denominados “imunes” e aqueles do grupo gavagem e ingestão voluntária serão denominados tolerantes.

Inicialmente, observamos que o processo de envelhecimento afetou a produção de imunoglobulinas específicas nos grupos controle imunes. Ocorreu redução desses níveis a partir de 53 semanas de idade (Figura 6 A e B). A produção de IgG2a anti-Ova não foi afetada, mas os níveis dessa classe de anticorpos foram muito baixos em todos os grupos (Figura 7).

Observamos que de 8 semanas de idade até 92 semanas, os animais tratados previamente com 20mg de Ova administrada por gavagem ou por ingestão voluntária, mantêm os níveis de anticorpos séricos totais anti-Ova mais baixos quando comparados aos níveis de anticorpos obtidos dos animais do grupo imune tratados com salina (Fig.6A). Apesar da redução significativa na produção de anticorpos específicos à medida que os animais envelheceram, entretanto, até 28 semanas, a tolerância oral foi mantida.

Observamos que a baixa produção de anticorpos séricos totais anti-Ova é mantida pelos grupos de animais tratados por via oral com Ova. Entretanto, apenas o grupo tratado por ingestão voluntária mantém a supressão significativa da resposta imune de anticorpos em todas as faixas etárias (Fig.6A).

Quando analisamos os níveis de anticorpos séricos IgG1 anti-Ova, observamos que, a partir de 53 semanas, a produção de anticorpos é muito reduzida em todos os grupos e em consequência, a diferença significativa entre o grupo salina e os tolerantes desaparece (Fig.6B).

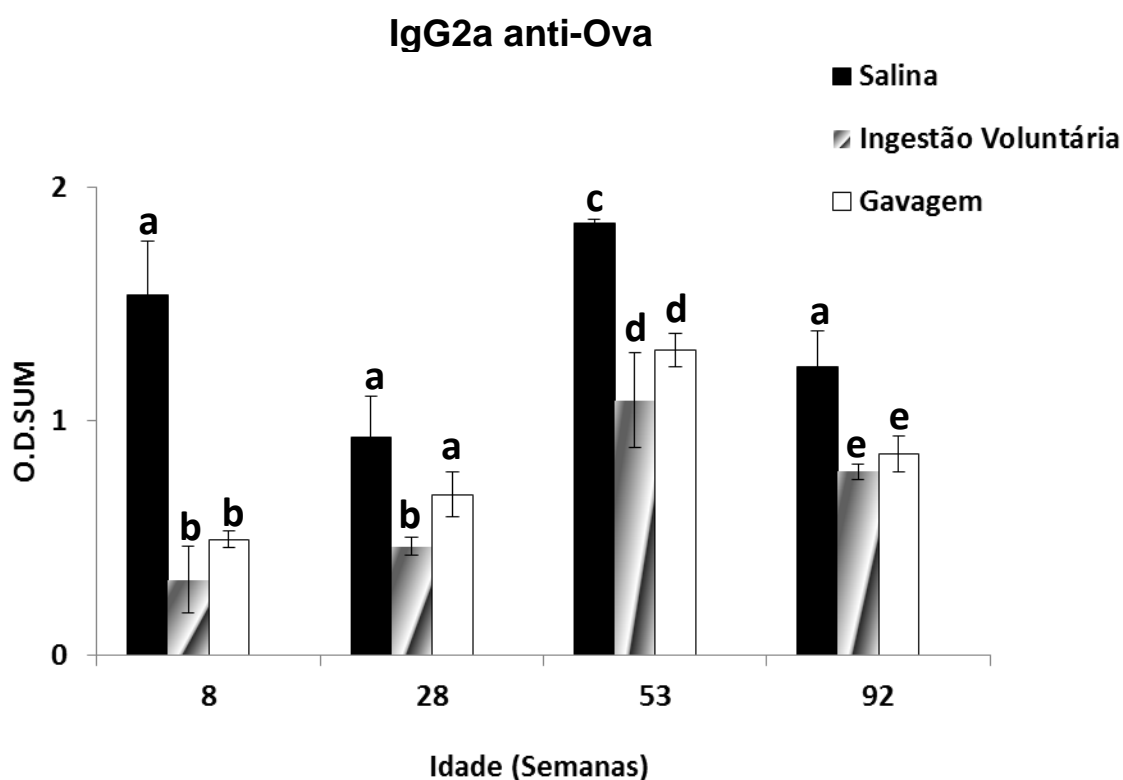


**Figura 6: Efeito do envelhecimento na indução de imunidade e tolerância oral.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), foram tratados oralmente com salina ou 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária. Sete dias após tratamento oral, os grupos Salina, Ingestão Voluntária e Gavagem foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de Ova e 3 mg de Al (OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina (imunização primária). Quatorze dias após a imunização primária, esses mesmos animais receberam uma nova imunização intraperitoneal contendo 10µg de Ova diluída em salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram sacrificados e os soros coletados. Os anticorpos séricos Ig total (A) e IgG1(B) anti-Ova foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética ± erro da somatória das médias das absorbâncias obtidas com os soros de cada grupo diluídos a partir de 1:10. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes (p<0,05) (Test t Student bicaudal).

Com relação aos níveis de anticorpos IgG2a anti-Ova analisados, notamos que somente nos grupos tolerantes tratados por ingestão voluntária, houve uma baixa produção de anticorpos específicos em todos os intervalos de idades analisados quando comparados aos grupos tratados com salina (Fig.7).

Deste modo, observamos que a susceptibilidade à indução de tolerância oral se manteve ao longo do envelhecimento, quando analisamos os anticorpos totais e IgG2a anti-Ova, mas não os anticorpos IgG1 anti-Ova. Além disto, o regime de ingestão voluntária mostrou-se mais eficaz na indução de tolerância oral.



**Figura 7: Efeito do envelhecimento na produção de IgG2a específica.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), foram tratados oralmente com salina ou 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária. Sete dias após tratamento oral, os grupos Salina, Ingestão Voluntária e Gavagem foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de Ova e 3 mg de Al (OH)3 diluídos em 0,2 ml de salina (imunização primária). Quatorze dias após a imunização primária, esses mesmos animais receberam uma nova imunização intraperitoneal contendo 10µg de Ova diluída em salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram sacrificados e os soros coletados. Os anticorpos séricos IgG2a anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética ± erro da somatória das médias da absorbância obtida com os soros de cada grupo diluídos a partir de 1:10. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes (p<0,05) ( Test t Student bicaudal).

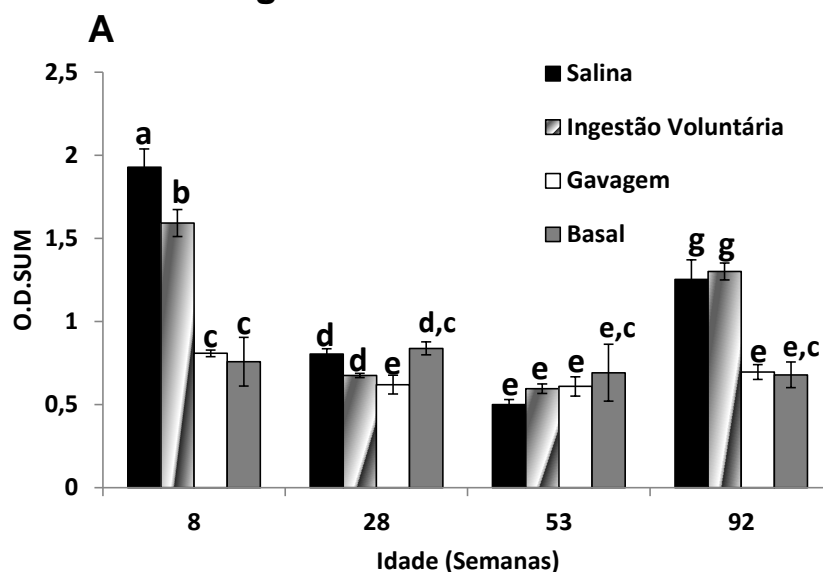
## **B. Análise da produção de IgA secretória no muco intestinal após a indução de tolerância oral e durante o desenvolvimento do processo de envelhecimento.**

Após a confirmação da possibilidade de indução de tolerância oral no processo de envelhecimento (Fig.6 e 7), a produção de IgA secretória total e específica na mucosa intestinal foi avaliada (Fig.8).

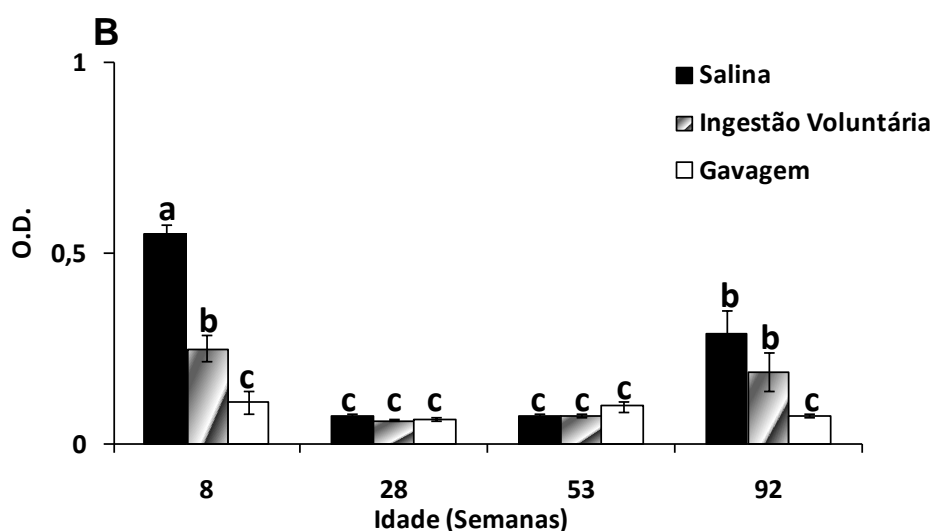
Observamos uma redução na produção de IgA secretória total nos animais tolerantes por Gavagem quando comparados aos tratados com salina nas idades de 8, 28 e 92 semanas (Fig.8A). Curiosamente, com 28 semanas de idade, o nível basal de IgA secretória total é maior significativamente que nos demais grupos tratados(Fig.8A).

Com relação à produção de IgA secretória anti-Ova, notamos uma diferença significativa entre os grupos tolerantes e os tratados com salina somente com 8 e 92 semanas de idade (Fig.8B). A medida que os animais envelheceram, observamos uma redução de IgA específica em todos os grupos, tolerantes e imune, o que condiz com resultados recentes do nosso laboratório (Speziali et al., 2009).

## IgAs intestinal Total



## IgAs intestinal anti-Ova



**Figura 8: Efeito do envelhecimento na produção de IgA secretória total e anti-Ova no muco intestinal.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), foram tratados oralmente com salina ou 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária. Sete dias após tratamento oral, todos os animais foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de Ova e 1 mg de Al (OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina (imunização primária). Quatorze dias após a imunização primária, os animais receberam uma nova imunização intraperitoneal contendo 10µg de Ova diluída em salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram sacrificados e as fezes coletadas. Os anticorpos das classe IgA Total (A) e anti-Ova (B) presentes nas fezes foram dosados por ELISA. Os resultados foram expressos como a média aritmética ± erro da absorbância obtida com a somatória das médias da absorbância obtida com os mucos dos camundongos de cada grupo diluídos 1:20 (A) e com o muco total dos camundongos de cada grupo (B). As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes (p<0,05) (Test t Student bicaudal).

### **C. Análise da produção de IgE sérica após a indução de tolerância oral e durante o processo de envelhecimento.**

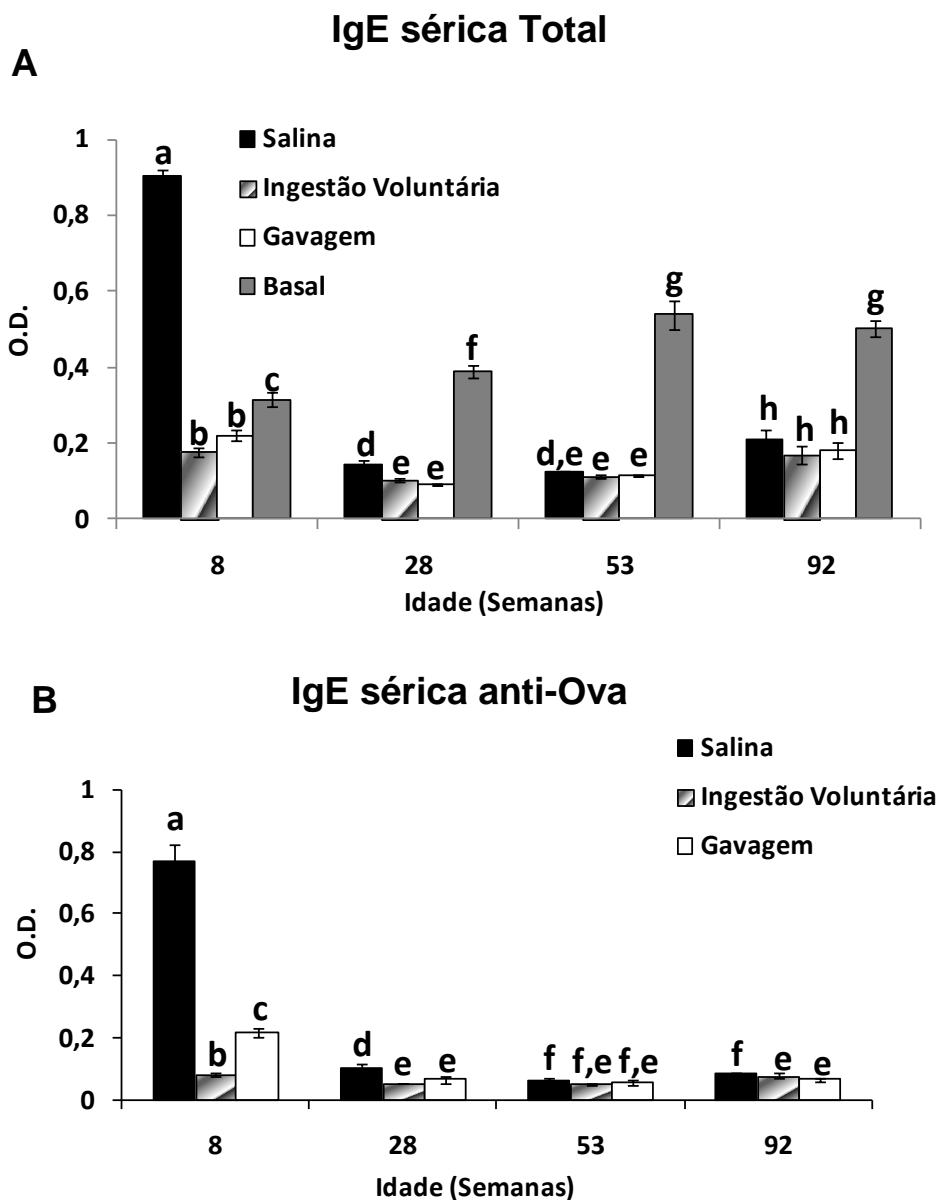
Após verificarmos que a produção de IgA secretória total e específica apresenta oscilações durante o envelhecimento, resolvemos analisar os níveis de IgE, uma classe de imunoglobulina induzida pela imunização com hidróxido de alumínio e muito sensível ao processo de indução de tolerância oral.

Observamos diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IgE séricos totais e anti-Ova somente nos grupos tolerantes por ingestão voluntária e gavagem nas idades de 8 e 28 semanas, quando comparados aos grupos tratados com salina (Fig.9A). Entretanto, não observamos diferenças significativas na produção de IgE total sérica entre os grupos tratados por ingestão voluntária e gavagem com o avanço da idade. Outro achado interessante foi o aumento do nível basal de IgE total durante o envelhecimento (Fig.9A).

Com relação à produção de IgE sérica anti-ova, podemos notar uma redução estatisticamente significativa entre os grupos tolerantes e imune nas idades 8, 28 e 92 semanas de idade, ou seja, a indução de tolerância foi mantida (Fig.9B).

De 8 para 28 semanas, observamos uma drástica redução na produção de IgE anti-Ova nos grupo tratados com salina, porém, os grupos tolerantes das mesmas idades também tiveram seus níveis de IgE específica reduzidos (Fig.9B).

Além disso, observamos também que a produção de IgE sérica anti-Ova se reduz com o envelhecimento dos animais (Fig.9B).



**Figura 9: Efeito do envelhecimento na produção de anticorpos IgE séricos totais e anti-Ova.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), foram tratados oralmente com salina ou 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária. Sete dias após tratamento oral, todos os animais foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de Ova e 3 mg de Al (OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina (imunização primária). Quatorze dias após a imunização primária, os animais receberam uma nova imunização intraperitoneal contendo 10µg de Ova diluída em salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram sacrificados e os soros coletados. Os anticorpos séricos IgE foram medidos por ELISA e os resultados foram expressos como a média aritmética ± erro das absorbâncias obtidas dos soros totais dos camundongos de cada grupo. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes (p<0,05) (Test t Student bicaudal).



#### **D. Análise da produção de IL-4 após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

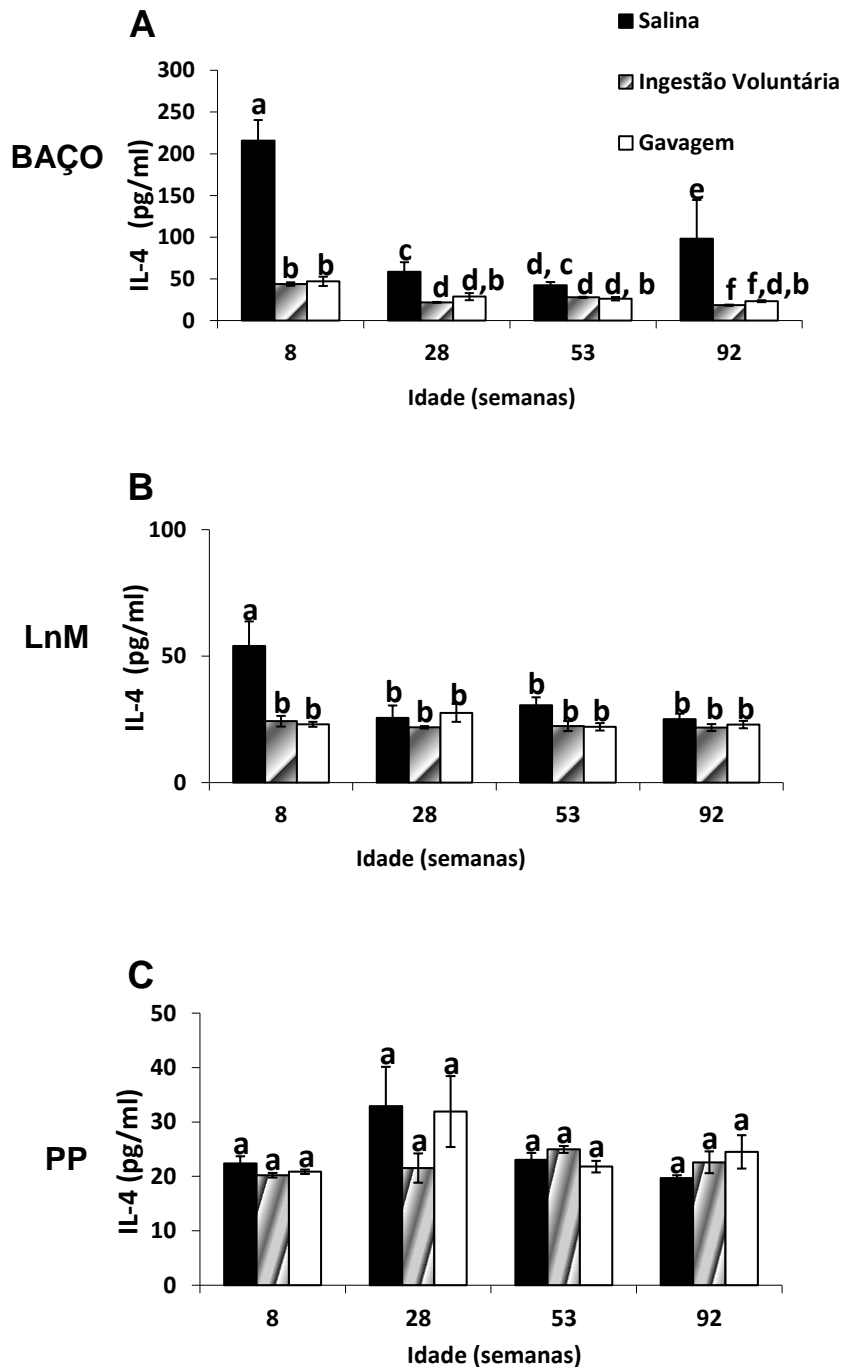
De acordo com a literatura, a citocina IL-4 participa do processo de troca de isotipo para IgE e IgG-1 nas reações inflamatórias induzidas pelo adjuvante hidróxido de alumínio. Ela pode também auxiliar na manutenção da tolerância oral. Sendo assim, analisamos a produção de IL-4 por células do baço, linfonodos mesentéricos (LnM) e placas de Peyer (PP) em todos os grupos após a indução de tolerância oral e durante o processo de envelhecimento (Fig.10).

Observamos que, no baço a produção de IL-4 nos grupos tolerantes (ingestão voluntária e gavagem) estava significativamente reduzida em camundongos de 8, 28 e 92 semanas quando comparados aos grupos tratados com salina (Fig.10A). Com o avançar da idade, até 53 semanas de idade, notamos uma significativa redução da produção de IL-4 principalmente no grupo imune, essa redução também ocorre no grupo ingestão voluntária nas idades de 8, 28 e 92 semanas (Fig.10A).

Nos linfonodos mesentéricos, somente os animais com 8 semanas apresentaram uma menor produção de IL-4 nos grupos tolerantes em comparação ao grupo imune (Fig.10B). A partir de 28 semanas de idade, não notamos diferenças significativas na produção de IL-4 entre os grupos tolerantes e imune (Fig.10B). Entretanto, de 8 para 28 semanas de idade, os animais tratados com salina apresentaram uma redução nos níveis de IL-4 quando comparados aos grupos tolerantes, que não apresentaram alterações (Fig.10B).

Quando analisamos as placas de Peyer, não notamos diferenças significativas entre os grupos tolerantes e imune e nem entre as diferentes idades (Fig.10C).

A observação mais significativa, então, foi a redução na produção de IL-4 mediante estímulo específico pelas células do baço e linfonodos mesentéricos a partir de 28 semanas de idade (Figuras 10 A e B).



**Figura 10: Efeito do envelhecimento na produção de IL-4 por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e os baços(A), LnM (linfonodos mesentéricos)(B) e PP (Placas de Peyer) (C) coletados. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram incubadas e estimuladas *in vitro* com Ova durante 72 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado após 72 horas para dosagem de IL-4 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração encontrada no sobrenadante das células estimuladas subtraído o valor encontrado no sobrenadante das células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  erro dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes ( $p < 0,05$ ) (Test t Student bicaudal).

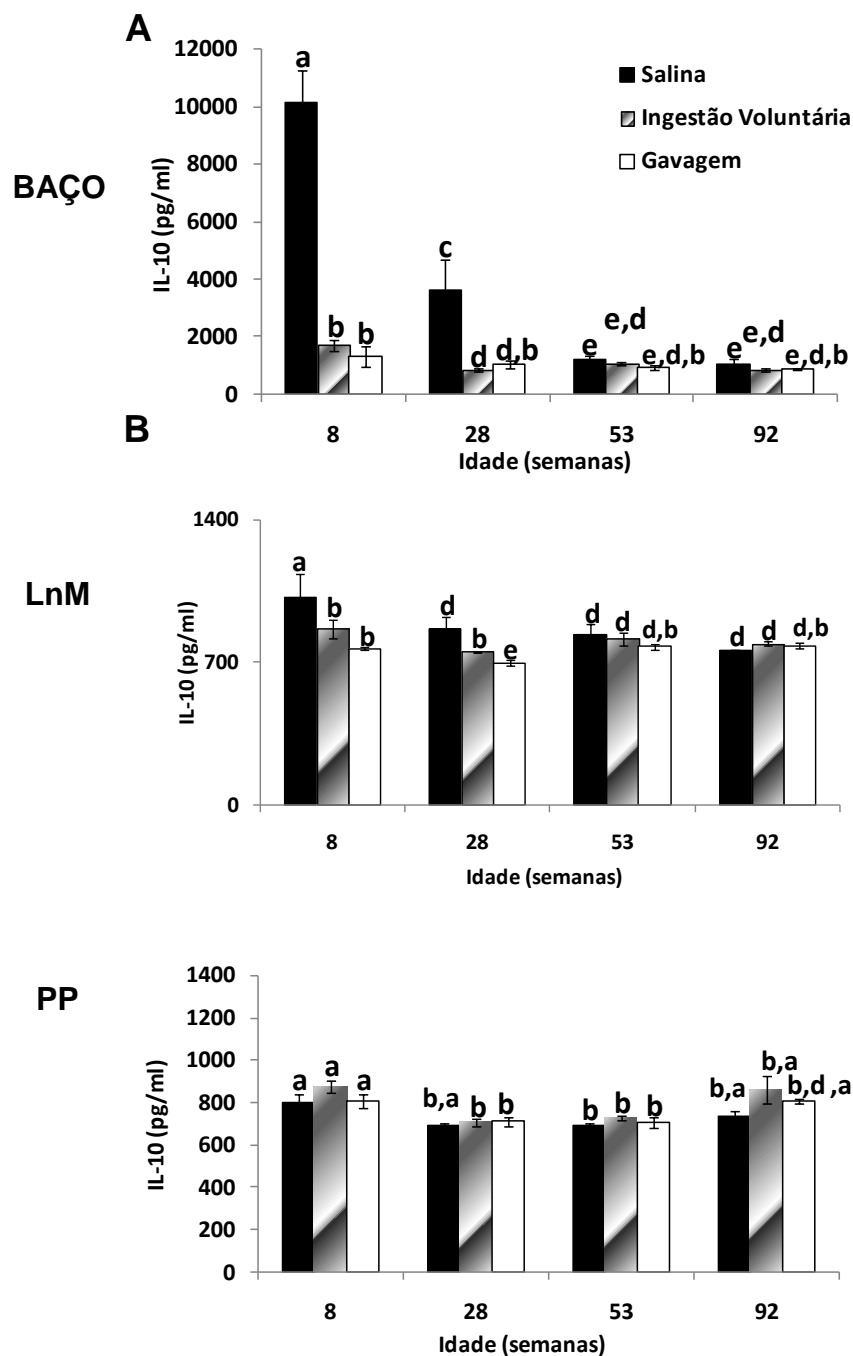
## **E. Avaliação da produção de IL-10 após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

A citocina IL-10 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de estar relacionada com a modulação da tolerância oral. Deste modo, avaliamos sua produção pelas células do baço, LnM( linfonodos mesentéricos) e PP (Placas de Peyer) em todos os grupos após a indução de tolerância oral e durante o processo de envelhecimento (Fig.11).

Observamos que no baço, a produção de IL-10 estava reduzida nos grupos tolerantes (ingestão voluntária e gavagem) quando comparados aos animais do grupo imune com 8 e 28 semanas de idade (Fig.11A). Também notamos que a produção de IL-10 no grupo imune diminuiu significativamente à medida que os animais envelhecem (Fig.11A).

Nos linfonodos mesentéricos, notamos diferenças significativas na produção de IL-10 entre o grupo salina e tolerantes somente em camundongos com 8 e 28 de idade (Fig.11B). A produção de IL-10 se reduz nos grupos tolerantes por ingestão voluntária de 8 para 28 semanas quando comparados aos grupos salina e gavagem (Fig. 11B). A partir de 53 semanas de idade, produção de IL-10 não se altera tanto no grupo imune nem nos grupos tolerantes (Fig.9B). De modo geral, podemos observar que de 8 para 92 semanas de idade, nos grupos imune e tolerante por ingestão voluntária, a produção de IL-10 nos linfonodos mesentéricos diminuiu significativamente em comparação ao grupo tolerante por gavagem, que não se alterou(Fig.11B).

Nas placas de Peyer, observamos redução da produção de IL-10 nos grupos tolerantes de 8 para 28 semanas de idade, entretanto, no grupo imune essa produção não se alterou (Fig.11C). Não observamos diferenças significativas entre os grupos tolerantes e imune, em todas as faixas etárias analisadas na produção de IL-10 (Fig.11C).



**Figura 11: Efeito do envelhecimento na produção de IL-10 por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.**

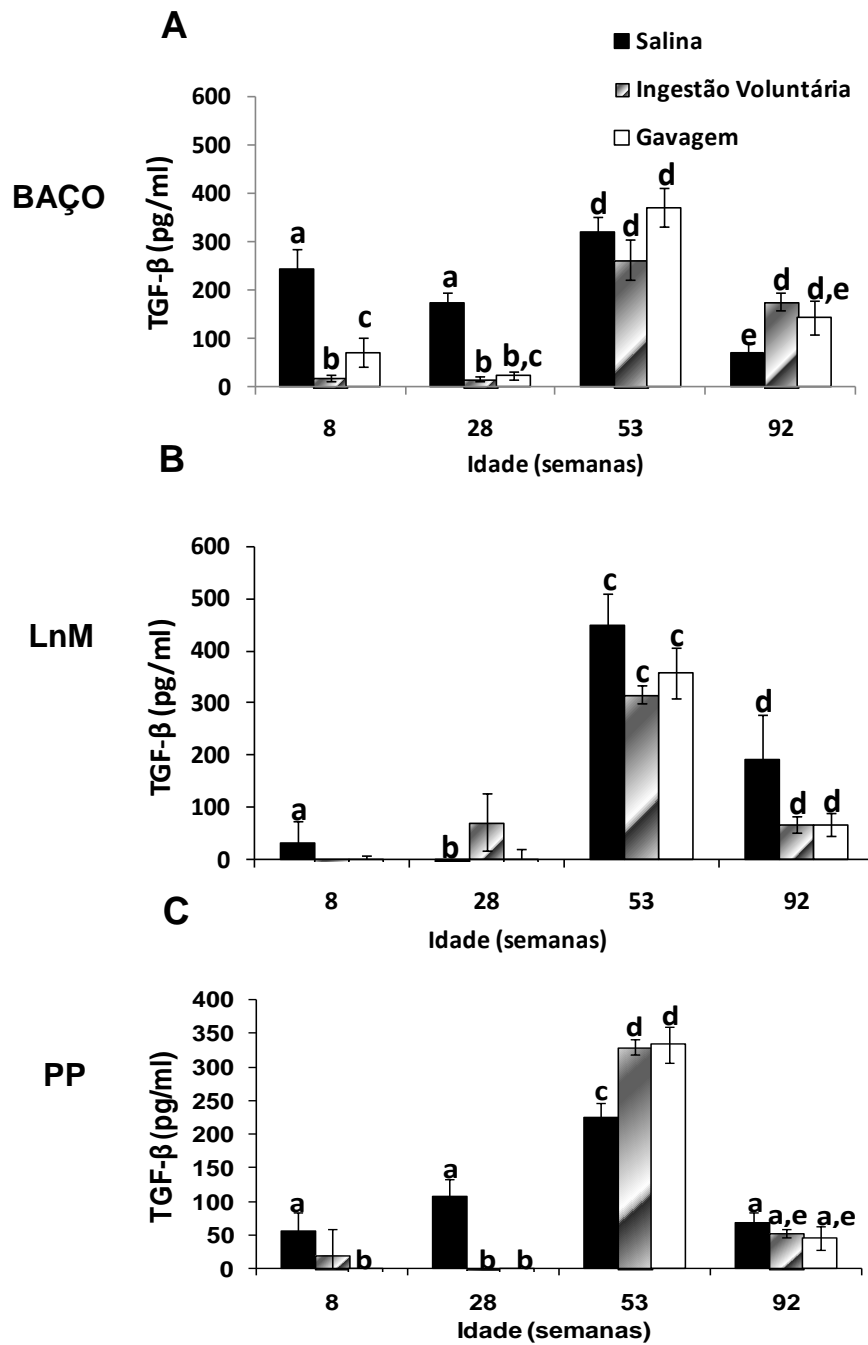
Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e os baços (A), LnM (B) e PP (C) coletados. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram incubadas e estimuladas *in vitro* com Ova durante 72 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado após 72 horas para dosagem de IL-10 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração encontrada no sobrenadante das células estimuladas subtraído o valor encontrado no sobrenadante das células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  erro dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes ( $p < 0,05$ ) (Test t Student bicaudal).

## **F. Análise da produção de TGF- $\beta$ após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

Como já dito, a citocina TGF- $\beta$  possui papel importante na indução da tolerância oral. Assim, analisamos sua produção no baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer em todos os grupos após a indução da tolerância oral e ao longo do processo de envelhecimento (Fig.12).

Observamos que, nos baços, dos animais de 8 semanas de idade, a produção de TGF- $\beta$  no grupo tolerante ingestão voluntária foi menor significativamente quando comparada a observada no grupo imune e no grupo tolerante por gavagem (Fig.12A). Já com 28 semanas, a diferença nos níveis de TGF- $\beta$  entre os grupos tolerantes desaparece em comparação com o grupo imune (Fig.12A). Surpreendentemente, com 53 semanas de idade, os animais de todos os grupos apresentaram um aumento significativo na produção de TGF- $\beta$  em comparação com os animais de 8 e 28 semanas (Fig.12A). Entretanto, com 92 semanas de idade, esse aumento permaneceu (Fig.12A).

Nos linfonodos mesentéricos e nas placas de Peyer, notamos um perfil na produção de TGF- $\beta$  semelhante ao encontrado no baço (Fig.12B e C, respectivamente). Nos dois órgãos, a produção de TGF- $\beta$  foi suprimida nos grupos tolerantes na idade de 8 semanas. Com 28 semanas de idade, notamos diferenças entre os grupos tolerantes e imune somente nas placas de Peyer (Fig.12C). Entretanto, o pico de produção de TGF- $\beta$  nos animais com 53 semanas de idade ocorreu nos dois órgãos, tornando-se reduzido na idade de 92 semanas em todos os grupos (Fig.12B e C, respectivamente).



**Figura 12: Efeito do envelhecimento na produção de TGF-β por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.**

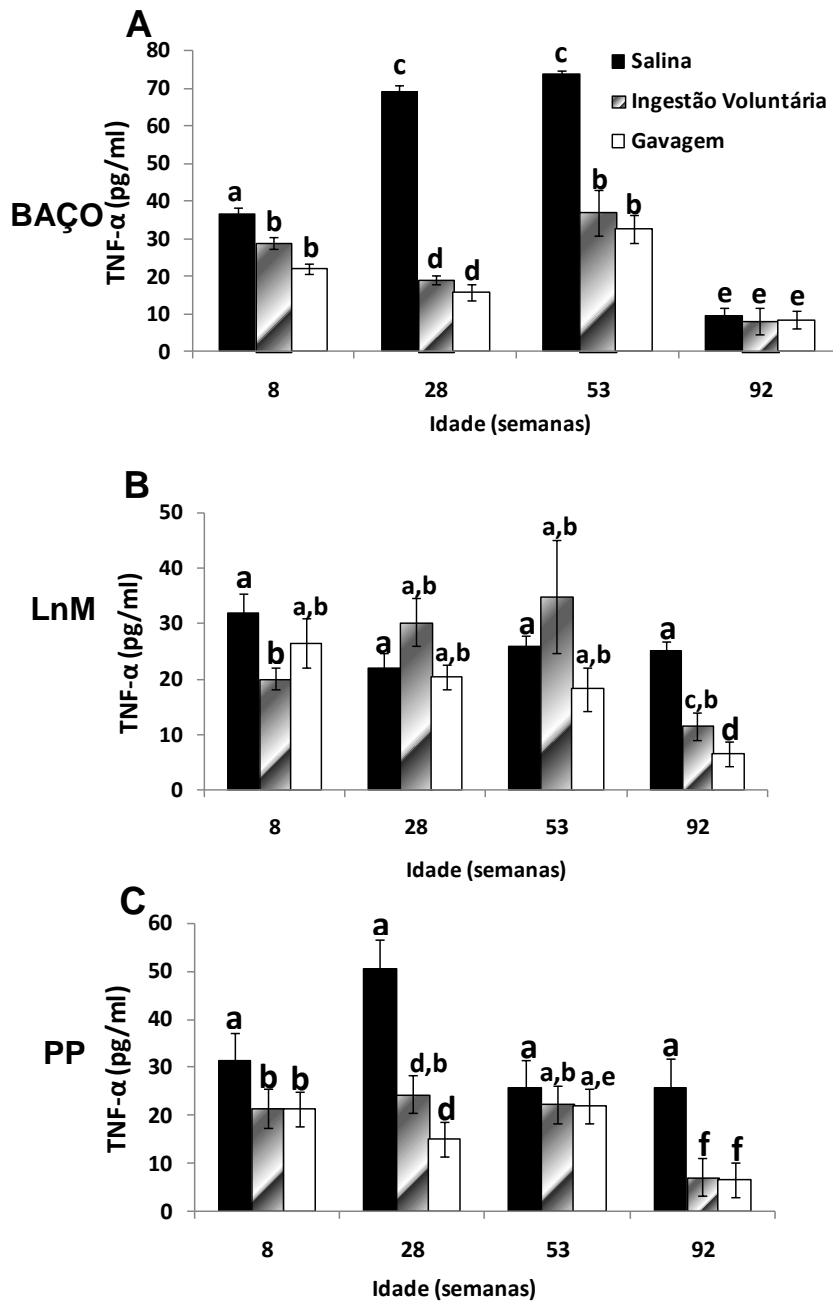
Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e os baços (A), LnM (B) e PP (C) coletados. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram incubadas e estimuladas *in vitro* com Ova durante 72 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado após 72 horas para dosagem de TGF-β por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração encontrada no sobrenadante das células estimuladas subtraído o valor encontrado no sobrenadante das células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética ± erro dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes (p<0,05) (Test t Student bicaudal).

## **G. Análise da produção de TNF- $\alpha$ após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

TNF- $\alpha$  é uma das citocinas liberadas pelas células T durante as respostas imune-específicas inflamatórias, sendo assim, avaliamos suas concentrações após a indução de tolerância oral e durante o processo de envelhecimento (Fig.13). Observamos que nos baços, nos animais de 8 até 53 semanas de idade, a produção de TNF- $\alpha$  nos animais tolerantes foi menor significativamente quando comparada àquela dos animais no grupo imune (Fig.13A). Com 92 semanas de idade essa diferença significativa entre os grupos desapareceu, sendo que a redução nos níveis de TNF- $\alpha$  nos animais imunes foi responsável por eliminar essa diferença (Fig.13A). Além disso, nas faixas etárias analisadas notamos oscilações na produção de TNF- $\alpha$  em todos os grupos, porém, de modo geral, comparando as idades de 8 e 92 semanas, produção de TNF- $\alpha$  é menor nos animais idosos (Fig.13A).

Nos linfonodos mesentéricos (LnM), nos animais de 8 semanas de idade, a produção de TNF- $\alpha$  no grupos tolerante por ingestão voluntária foi significativamente menor quando comparada àquela observada no grupo imune e ao grupo tolerante por gavagem (Fig.13B). Essa diferença entre os grupos não foi observada nas idades de 28 e 53 semanas (Fig.13B). Curiosamente, a diferença na produção de TNF- $\alpha$  entre os grupos tolerantes e imune foi restaurada nos animais com 92 semanas de idade (Fig.13B). Entretanto, em comparação aos animais com 8 semanas de idade, a produção de TNF- $\alpha$  foi significativamente a mesma nos grupos salina e tolerante por ingestão voluntária, ocorrendo uma significativa redução no grupo tolerante por gavagem (Fig.13B).

Nas placas de Peyer, observamos que, nos animais de 8 até 28 semanas de idade, a produção de TNF- $\alpha$  nos grupos tolerantes foi menor significativamente quando comparada a observada no grupo imune (Fig.13C). Essa diferença não é detectada nos animais com 53 semanas de idade, porém é novamente restaurada com 92 semanas de idade (Fig.13C). De modo geral, podemos observar que, nos animais de 8 para 92 semanas de idade, nos grupos tolerantes, a produção de TNF- $\alpha$  diminuiu significativamente em comparação ao grupo imune, que não se alterou (Fig.13C).



**Figura 13: Efeito do envelhecimento na produção de TNF- $\alpha$  por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e os baços (A), LnM (B) e PP (C) coletados. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram incubadas e estimuladas in vitro com Ova durante 72 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado após 24 horas para dosagem de TNF- $\alpha$  por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração encontrada no sobrenadante das células estimuladas subtraído o valor encontrado no sobrenadante das células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  erro dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes ( $p < 0,05$ ) (Test t Student bicaudal).



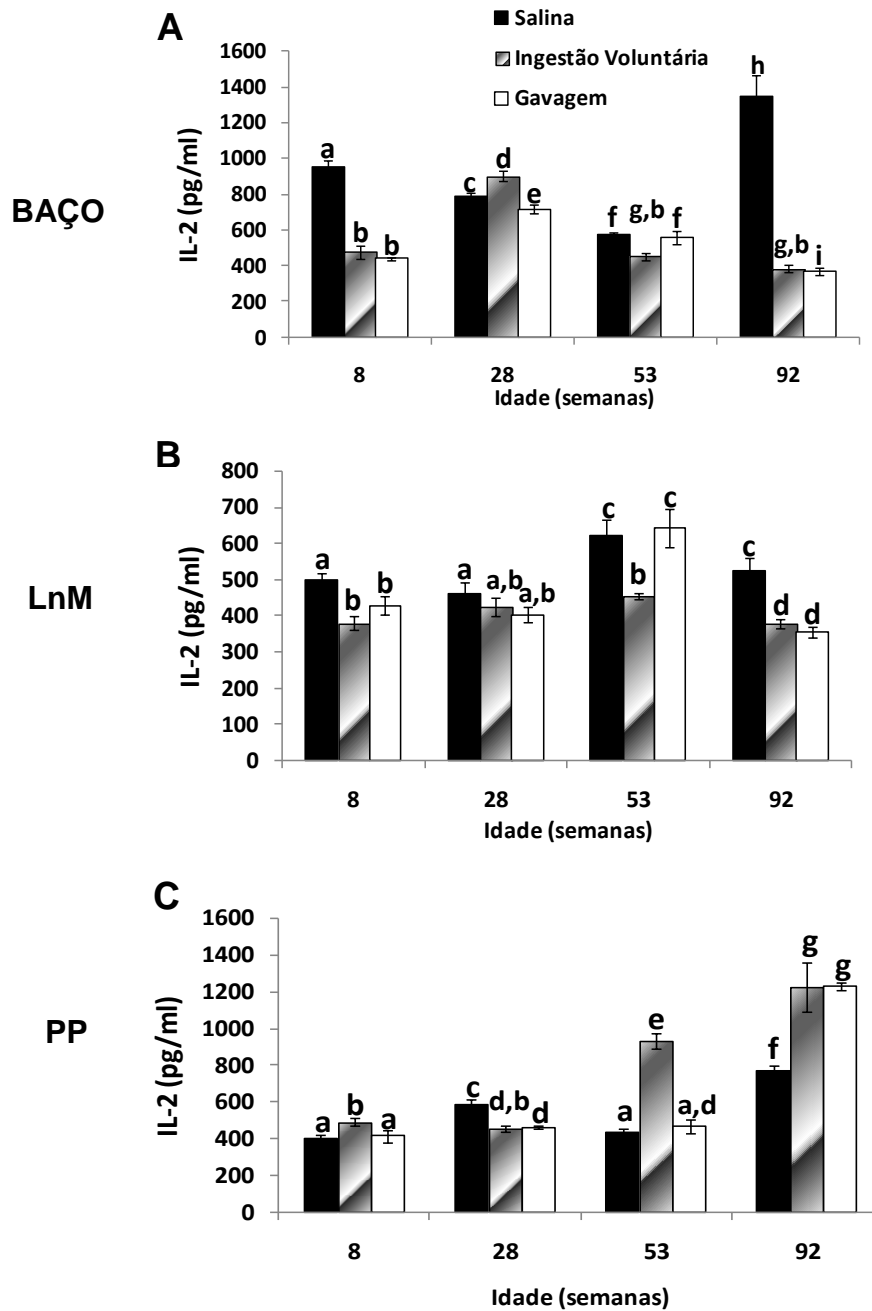
## **H. Análise da produção de IL-2 após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

De acordo com a literatura, a produção de citocina IL-2 se torna deficiente durante o processo de envelhecimento em camundongos. Deste modo, avaliamos sua síntese após a indução de tolerância oral e durante o processo de envelhecimento (Fig.14).

Observamos que, no baço dos animais de 8 semanas, os grupos tolerantes (ingestão voluntária e gavagem), apresentam menor produção de IL-2 quando comparados ao grupo imune (Fig.14). Resultados semelhantes foram também observados nos animais de 92 semanas de idade (Fig.14A). Além disso, nas faixas etárias analisadas notamos oscilações na produção de IL-2 em todos os grupos, mas, de modo geral, comparando as idades de 8 e 92 semanas, a produção de IL-2 é menor nos animais do grupo tolerante por gavagem (Fig.14A).

Nos linfonodos mesentéricos (LnM), observamos variações na produção de IL-2 significativas entre os grupos tolerantes e imune apenas nos animais com 8 e 92 semanas de idade, sendo que os grupos tolerantes apresentaram menor produção de IL-2 quando comparado ao grupo salina (Fig.14B). Observamos um aumento na produção de IL-2 nos animais de 53 semanas dos grupos imune e tolerante por gavagem (Fig.12B). Entretanto, a produção de IL-2 estava significativamente reduzida nos animais de 92 semanas grupos tolerantes, o que não aconteceu no grupo imune, que se mostrou estável (Fig.14B).

Nas placas de Peyer (PP), observamos oscilações na produção de IL-2 entre os grupos com o avanço da idade, mas nos animais de 8 a 92 semanas de idade, essa produção aumentou significativamente (Fig.14C).



**Figura 14: Efeito do envelhecimento na produção de IL-2 por células do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e os baços (A), LnM (B) e PP (C) coletados. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram incubadas e estimuladas in vitro com Ova durante 72 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado após 24 horas para dosagem de IL-2 por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração encontrada no sobrenadante das células estimuladas subtraído o valor encontrado no sobrenadante das células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  erro dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes ( $p < 0,05$ ) (Test t Student bicaudal).

## **I. Análise do número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

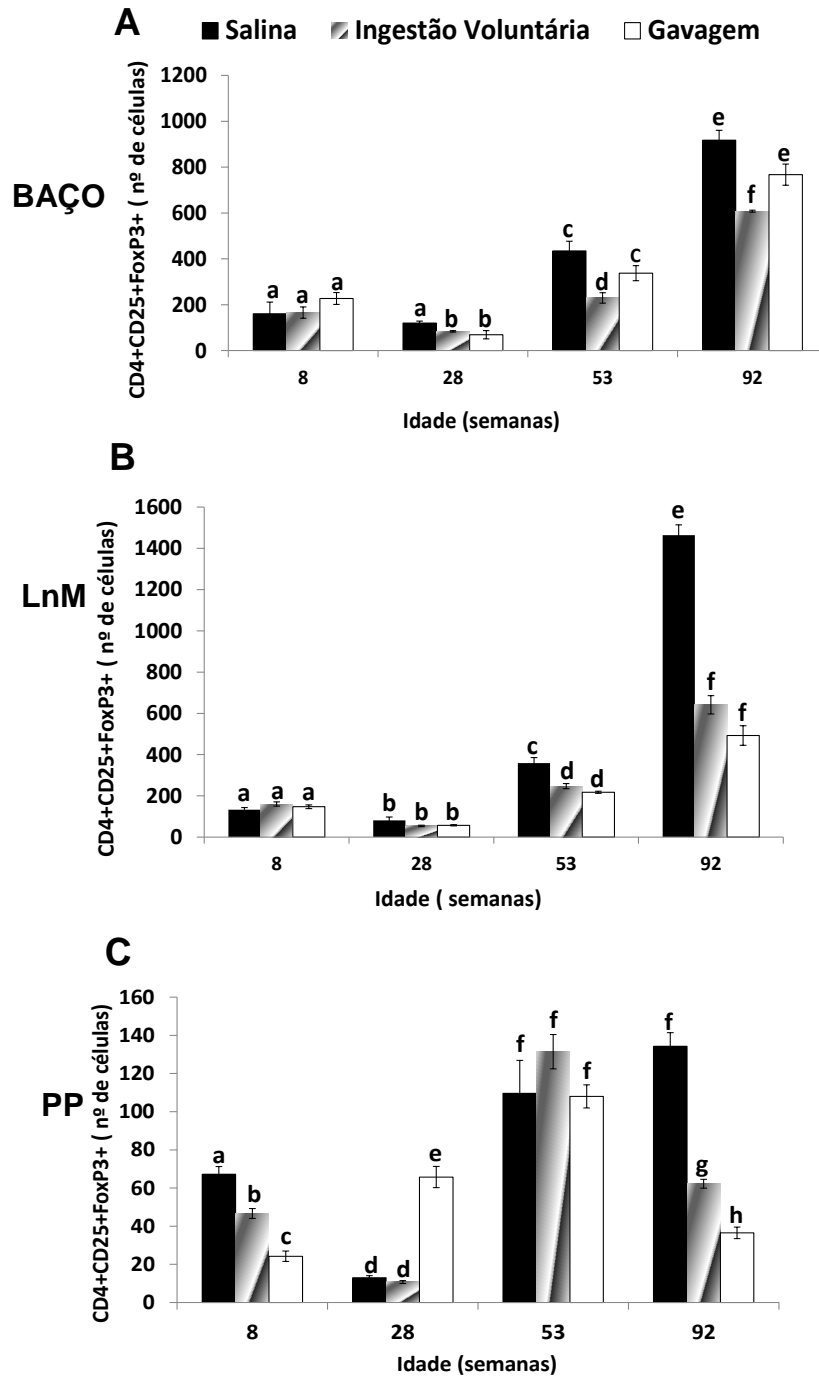
Como já mencionado anteriormente, baixas doses de antígeno administradas oralmente induzem a tolerância oral através da estimulação de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) suprimindo a resposta imune. De acordo com alguns trabalhos, o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> se altera durante o processo de envelhecimento. Sendo assim, nosso próximo passo foi avaliar a produção dessas células após a indução de tolerância oral e durante o processo de envelhecimento (Fig.15).

No baço, observamos que o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> nos animais com 53 e 92 semanas é reduzida no grupo tolerante por ingestão voluntária quando comparado ao grupo salina (Fig.15A). Similarmente ao observado na produção de TGF-β, com 53 semanas de idade, os animais de todos os grupos apresentaram um aumento significativo na porcentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em comparação com os animais de 28 e 92 semanas (Fig.15A). Entretanto, com 92 semanas de idade, o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> se reduz em todos os grupos (Fig.15A).

Nos linfonodos mesentéricos, observamos um aumento na no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> somente a partir de 53 semanas de idade (Fig.15B). Entretanto, com 53 semanas o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> nos grupos tolerantes é menor quando comparado ao grupo imune (Fig.15B).

Essa situação fica mais evidente com 92 semanas de idade, na qual os grupos tolerantes apresentam significativamente menor número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> que o grupo imune (Fig.15B).

Nas placas de Peyer, observamos variações no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em todos os grupos com o avançar da idade (Fig.15C). Com 92 semanas de idade, o grupo gavagem apresentou maior número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> que os demais grupos (Fig.15C). Já com 53 semana de idade, todos os grupos apresentaram aumento no número de células. Entretanto, com 92 semanas de idade, somente o grupo imune manteve esse aumento (Fig.15C).



**Figura 15: Efeito do envelhecimento no número de células CD4+CD25+FoxP3 após a indução de tolerância oral.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e o baço (A), LnM (B) e PP (C) coletados. As células desses órgãos foram marcadas com anticorpos específicos ligados à moléculas de Cycrome, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As barras representam a média aritmética  $\pm$  erro do número de células  $\times 10^6$  analisadas em cada grupo de 5 camundongos. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes ( $p < 0,05$ ) (Test t Student bicaudal).

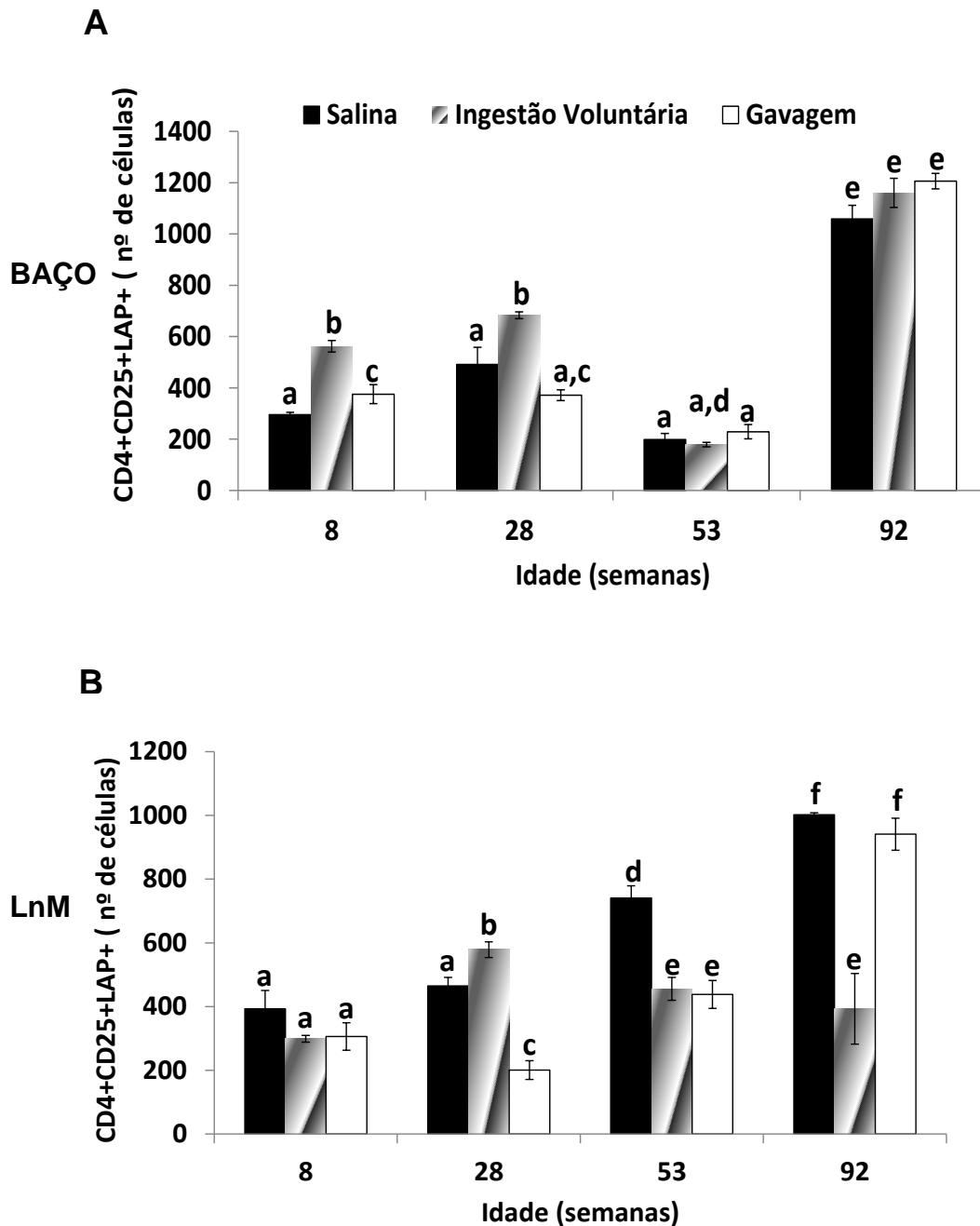
## **J. Análise do número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

Outra subpopulação de linfócitos T com fenótipo regulador já descrita como importante na indução de imunossupressão via mucosa oral são as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando a molécula de TGF- $\beta$  na forma precursora (contendo LAP). Deste modo, analisamos a produção de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Fig.16) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> (Fig.17) no baço e linfonodos mesentéricos após a indução de tolerância oral e durante o desenvolvimento do processo de envelhecimento.

Na Fig.16A, observamos que no baço, ocorreram variações no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> em todas as faixas etárias. Entretanto analisando as idades 8 e 92 semanas observamos um aumento dessas células em todos os grupos, sendo que com 92 semanas de idade não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Fig.16A ).

Nos linfonodos mesentéricos, observamos que a partir de 53 semanas de idade, os animais do grupo imune apresentaram um aumento no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> quando comparados aos grupos tolerantes (Fig.16B).

Entretanto, animais tolerantes com 92 semanas de idade apresentaram um aumento significativo do número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> nos grupo tolerante por gavagem chegando a se igualar ao número de células observados no grupo imune (Fig.16B).



**Figura 16: Efeito do envelhecimento no número de células CD4+CD25+LAP+ após a indução de tolerância oral.**

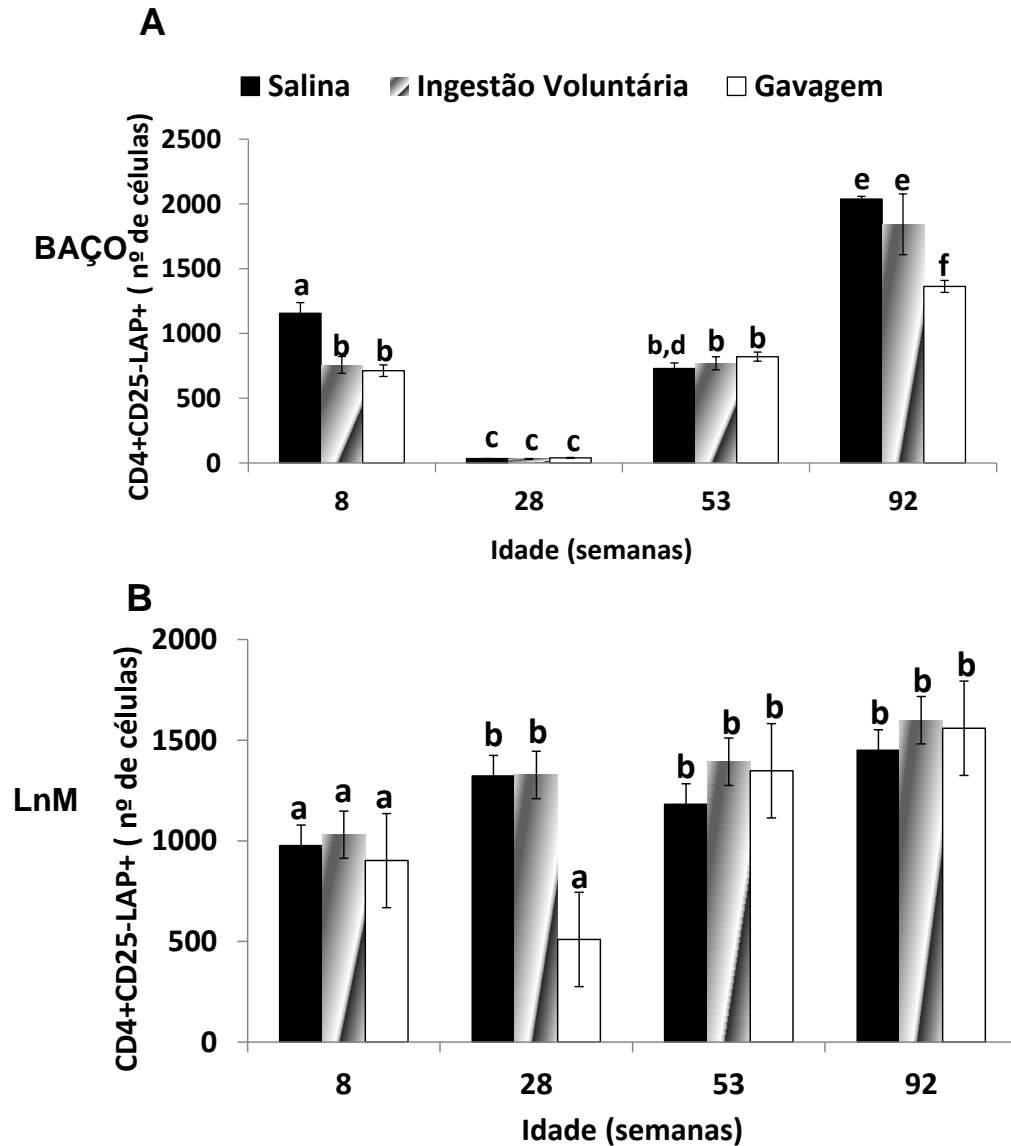
Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e o baço (A) e LnM (B) coletados. As células desses órgãos foram marcadas com anticorpos específicos ligados à moléculas de Cycrome, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As barras representam a média aritmética  $\pm$  erro da porcentagem de células analisadas em cada grupo de 5 camundongos. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes ( $p < 0,05$ ) (Test t Student bicaudal).

## **K. Análise do número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

Na Fig.17, observamos que o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> no baço nos animais de 8 e 92 semanas de idade reduz significativamente nos grupos tolerantes comparados ao imune.(Fig.17A).

Com 28 semanas de idade, observamos uma redução significativa em todos os grupos quando comparados com as idades 8 e 53 semanas (Fig.17A). Entretanto, com 92 semanas de idade, o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> aumenta significativamente em todos os grupos quando comparados aos animais de 53 semanas de idade (Fig. 17A). Os animais dos grupos tolerantes com 92 semanas de idade apresentam semelhante número de células comparados àqueles com 8 semanas de idade(Fig. 17A).

Já nos linfonodos mesentéricos, observamos que nos animais com 28 semanas de idade e tolerantes por ingestão voluntária apresentaram maior número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> quando comparado ao grupo tolerante por gavagem e ao grupo imune da mesma idade (Fig. 17B). A partir de 53 semanas, observamos um aumento significativo no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> em todos os grupos e que se mantêm com 92 semanas de idade (Fig. 17B). Entretanto, não foi verificada diferenças significativas entre os grupos nas idades acima citadas (Fig. 17B).



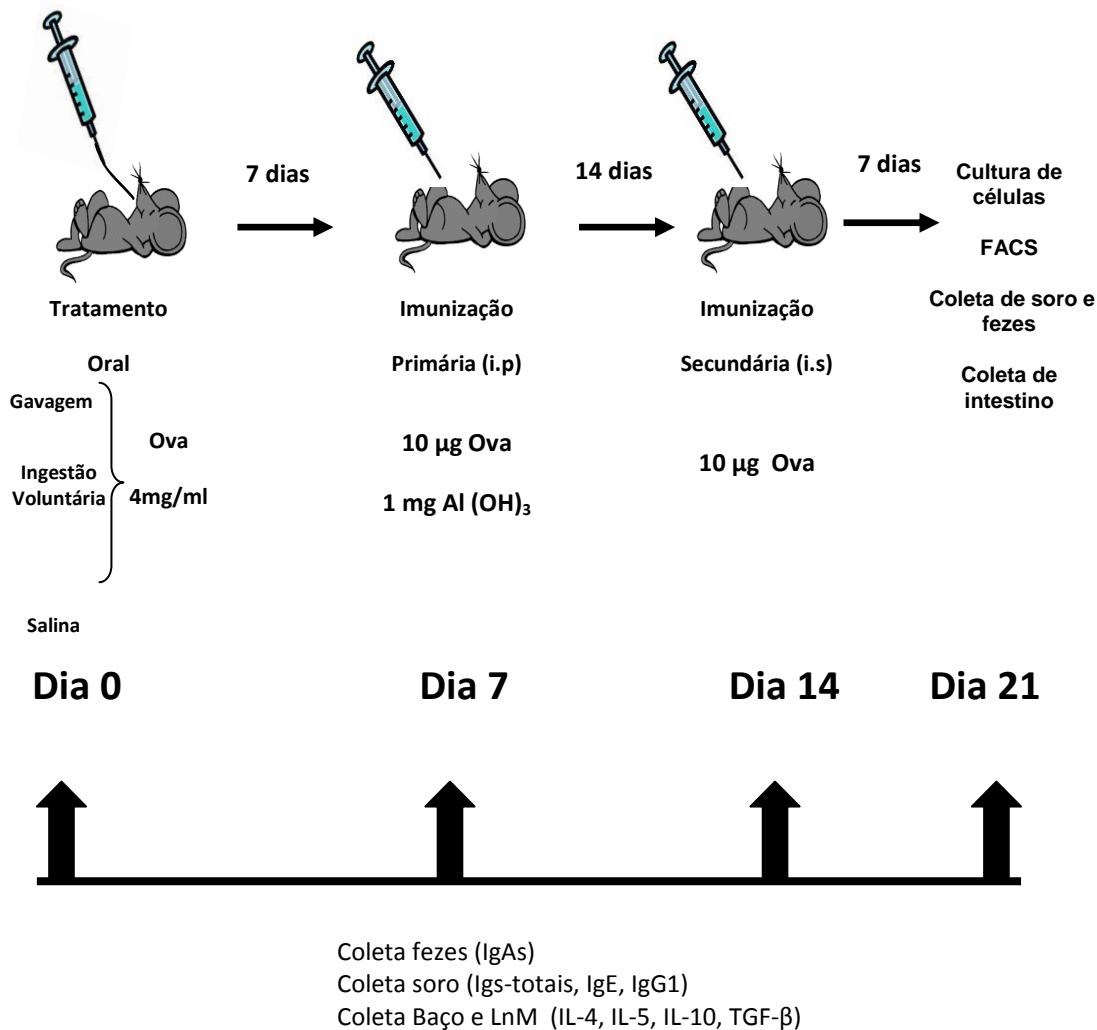
**Figura 17: Efeito do envelhecimento no número de células CD4+CD25-LAP+ após a indução de tolerância oral e durante o envelhecimento.**

Camundongos fêmeas BALB/c de 8, 28, 53 e 92 semanas (n=5), após a imunização secundária, foram sacrificados e baço (A) e LnM (B) coletados. As células desses órgãos foram marcadas com anticorpos específicos ligados à moléculas de Cyrome, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As barras representam a média aritmética  $\pm$  erro da porcentagem de células analisadas em cada grupo de 5 camundongos. As letras representam a diferença estatística entre os grupos em um mesmo tempo (ANOVA) e entre o mesmo grupo em dois tempos diferentes ( $p < 0,05$ ) (Test t Student bicaudal).



## **Parte II:**

# **O Processo de Envelhecimento e a Indução da Alergia Alimentar**



**Protocolo 2: Indução de tolerância oral e alergia alimentar em camundongos BALB/c idosos normais:**

O modelo de indução de alergia alimentar utilizado nesse trabalho foi adaptado de Saldanha e colaboradores e consiste na administração oral de ovalbumina (Ova) a animais previamente imunizados com o mesmo antígeno (Saldanha et al, 2004).

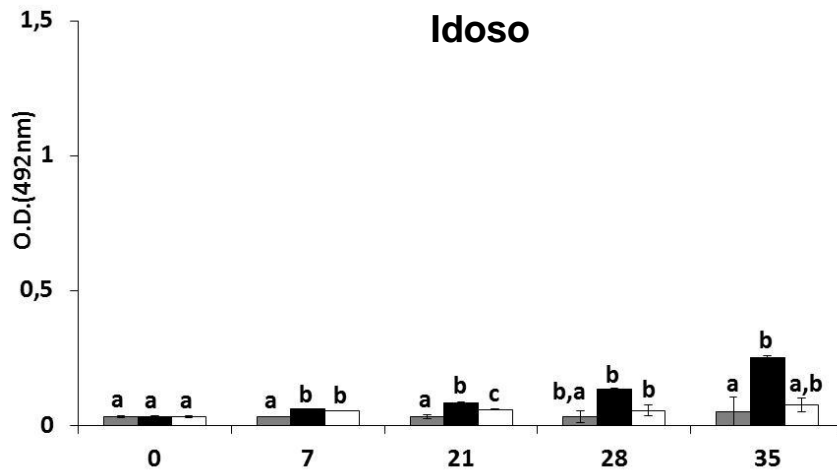
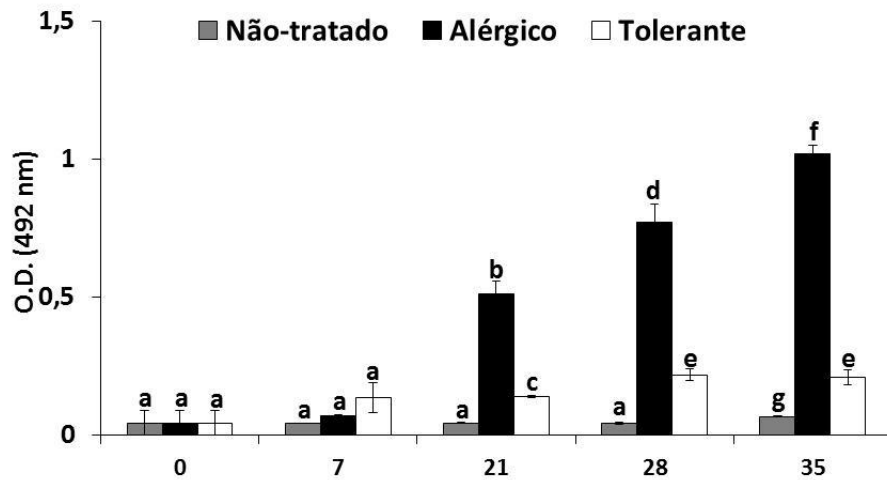
Esse modelo foi escolhido devido ao fato de propormos investigar quais seriam os efeitos do envelhecimento no processo de tolerância oral e da indução de alergia alimentar que está demonstrado no protocolo 2.

## **L. O envelhecimento inibe a indução da alergia alimentar.**

Primeiramente, foi avaliada a indução de alergia alimentar em camundongos de 8 e 53 semanas tratados com solução salina (grupo Alérgico) e solução de Ova por gavagem (grupo Tolerante) (Fig.18). Foram analisados os níveis séricos de IgE anti-OVA, um anticorpo produzido em altas concentrações durante os processos inflamatórios, tais como alergia alimentar (Fig.18A).

Observamos que, os níveis séricos de IgE anti-Ova aumentaram gradualmente nos animais jovens do grupo alérgico após a imunização primária (Dia 21). O mesmo não ocorre no grupo tolerante (Fig.18A). Por outro lado, em camundongos idosos, esse aumento gradual de anticorpos IgE anti-Ova no soro não é observado. A produção de IgE sérica anti-Ova nos idosos foi suprimida no grupo tolerante em relação ao grupo salina (Fig.18A).

## Jovem

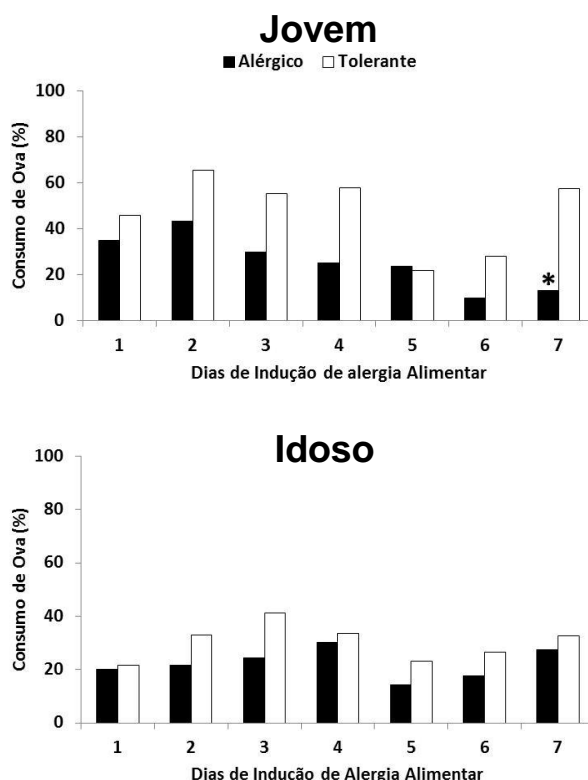


**Figura 18: O efeito do envelhecimento na produção de IgE anti-Ova.**

Camundongos BALB / c de 8 e 53 semanas de idade foram tratados por via oral com salina (grupo Alérgico (Al)); 20 Ova mg por gavagem (grupo Tolerante (T)) ou não-tratados (grupo controle) (NT) (Dia 0). Após 7 dias, os animais foram imunizados ip com 10 mg Ova e 1mg de Hidróxido de Alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (Dia 7), e receberam um reforço de sc de 10µg de Ova após 14 dias (dia 21). Para a indução de alergia alimentar (Dia 28), os camundongos foram desafiados oralmente com uma solução de clara de ovo contendo aproximadamente 10 Ova mg / ml, durante sete dias consecutivos (dia 28-35). Após a indução de alergia alimentar, os animais foram sacrificados (dia 35). Em cada etapa da indução de tolerância oral, bem como após a indução da alergia alimentar, foram analisados os níveis de citocinas e anticorpos de produção (em soro e intestino). Análise de OVA IgE específica medida por ELISA. Barras representam a média ± SEM de 5 camundongos BALB / c por grupo (\* p <0,05). As primeiras letras representam as diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo tempo (ANOVA) e as letras segundo do mesmo grupo entre diferentes épocas (Student T) (p <0,05).

A aversão à ingestão do antígeno é característica de reações alérgicas. Ela foi relacionada com a produção de IgE sérica específica (Cara, 1997) e está relacionada à perda de peso (Dourado, 2006)

Conforme observado na figura 19, avaliamos a aversão à ingestão de solução contendo Ova na indução de alergia alimentar em animais jovens e idosos. Em animais jovens, observamos que, após o terceiro dia de indução de alergia alimentar, o grupo alérgico apresentou aversão o consumo espontâneo de solução clara de ovo com relação ao grupo tolerante (Fig.19). Em contraste, o consumo de solução de clara de ovo não apresentou alterações significativas nos animais tolerantes (Fig.19). Essa característica não foi observada entre os animais idosos, os grupos salina e tolerante não apresentaram diferenças significativas quanto ao consumo de solução de clara de ovo durante a indução de alergia alimentar em comparação com os animais não-tratados (Fig.19).

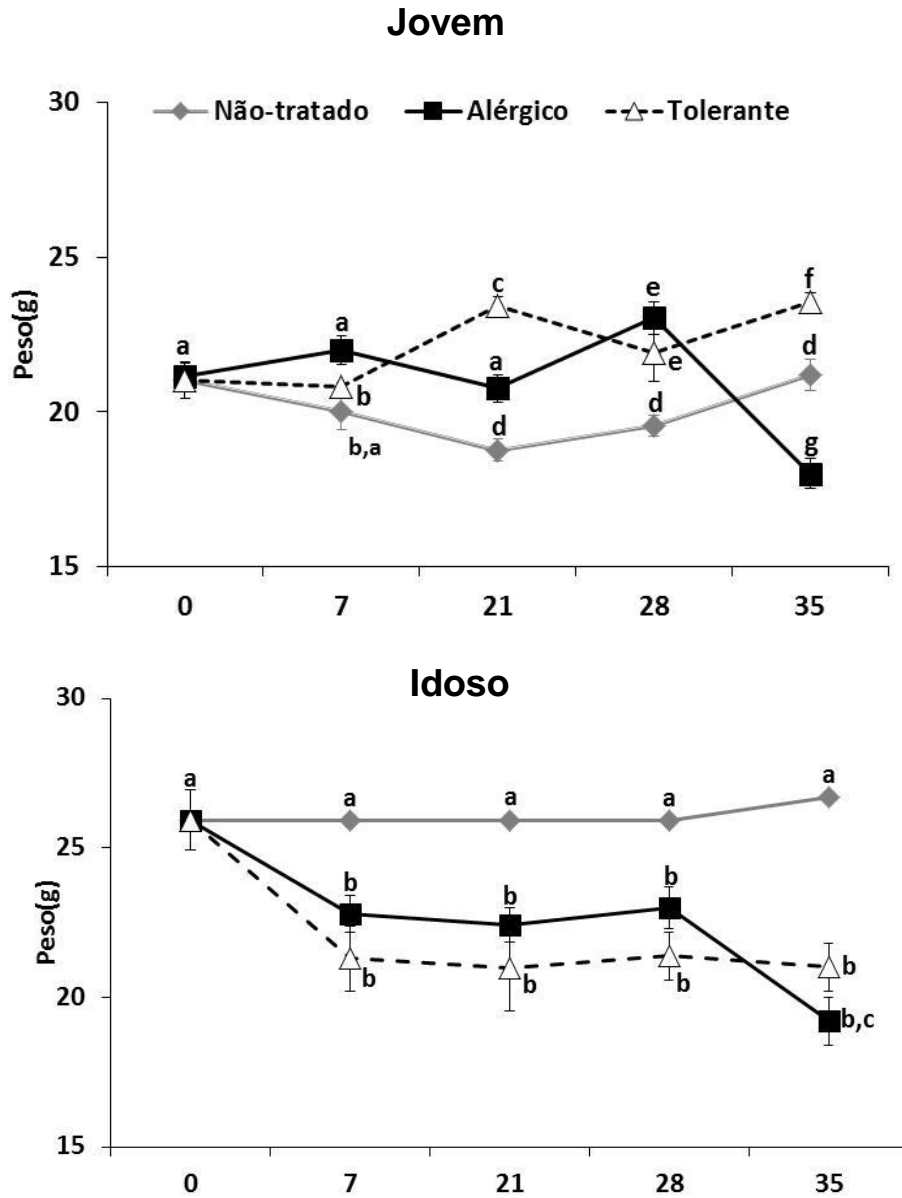


**Figura 19: O efeito do envelhecimento no consumo de Ova durante a indução de alergia alimentar.**

Durante a indução de alergia alimentar foi avaliado o consumo de clara de ovo, contendo 10 mg/ml de Ova em animais de 8 e 53 semanas de idade baseando-se no consumo de animais não tratados que no gráfico seriam a porcentagem 100%. (\*  $p < 0,05$ )

Alguns trabalhos demonstraram que a indução de alergia alimentar em camundongos BALB/c os induz a perderem peso. (Dourado, 2006; Saldanha et al., 2004).

Na Figura 20, analisamos o peso corpóreo dos animais durante a indução de tolerância oral e após a indução de alergia alimentar à Ova em ambas as idades (Fig.20). Em animais jovens, observou-se que após a indução de alergia alimentar à Ova (dia 35), o grupo alérgico perdeu cerca de 25% do seu peso corpóreo em comparação ao grupo tolerante (Fig.20). No entanto, em camundongos idosos, observou-se a perda de peso em ambos os grupos, alérgico e tolerante, quando comparados com o grupo não-tratado (Fig.20). Em animais idosos, que apresentam maior peso inicialmente quando comparados aos jovens, a perda corporal também foi ao longo da indução de alergia alimentar (Fig.20).



**Figura 20: O efeito do envelhecimento no peso corpóreo na tolerância oral e na indução de alergia alimentar.**

Durante a tolerância oral e a indução de alergia alimentar foi avaliado o peso corpóreo dos animais de 8 e 53 semanas de idade. As primeiras letras representam as diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo tempo (ANOVA) e as segundas letras o mesmo grupo entre diferentes tempos (Student T) ( $p < 0,05$ ).

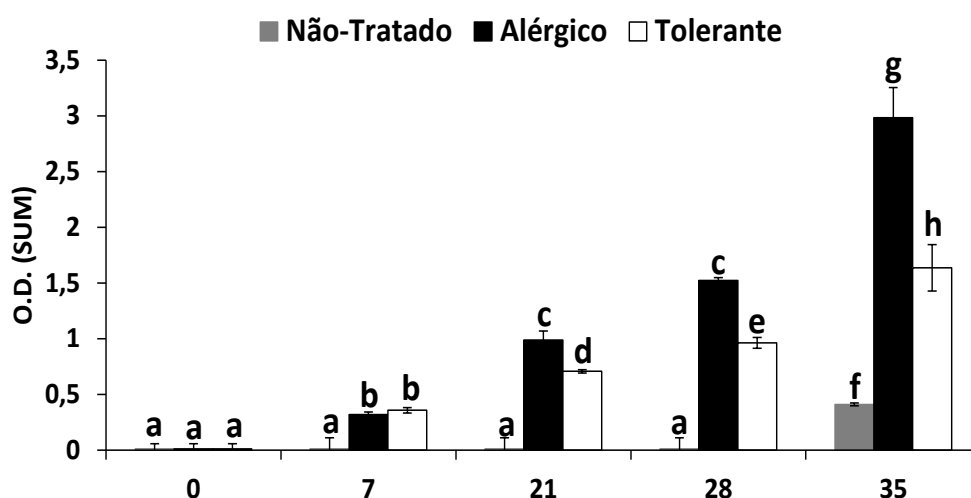
## **M. O envelhecimento afeta a produção de anticorpos durante a indução de Tolerância Oral e de Alergia Alimentar.**

Para estudar a indução da tolerância oral no modelo de alergia alimentar utilizado, avaliamos a cinética de produção de IgG1 anti-Ova nos animais jovens (8 semanas) e idosos (53 semanas) (Fig. 21). Observamos que, a indução de tolerância oral reduziu os níveis de IgG1 anti-Ova nos animais idosos tanto quanto nos jovens (Fig. 21). Entretanto, após a indução de alergia alimentar (Dia 35), notamos que, nos animais idosos, a tolerância induzida não se manteve, pois não existem diferenças significativas entre os grupos alérgicos e tolerantes (Fig. 21).

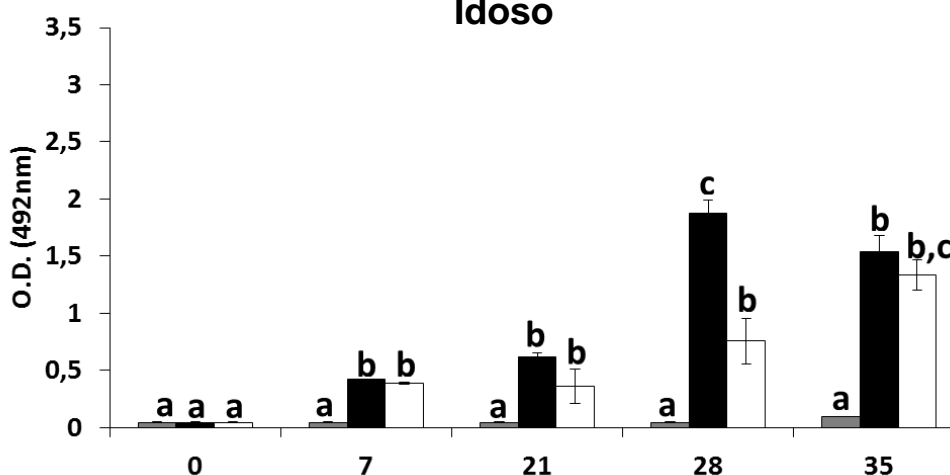
Nos animais jovens, após a indução de alergia alimentar (Dia 35), observamos uma alta produção de IgG1 anti-Ova no grupo alérgico em comparação com os animais tolerantes, fato que não ocorreu nos animais idosos (Fig. 21).



## Jovem



## Idoso



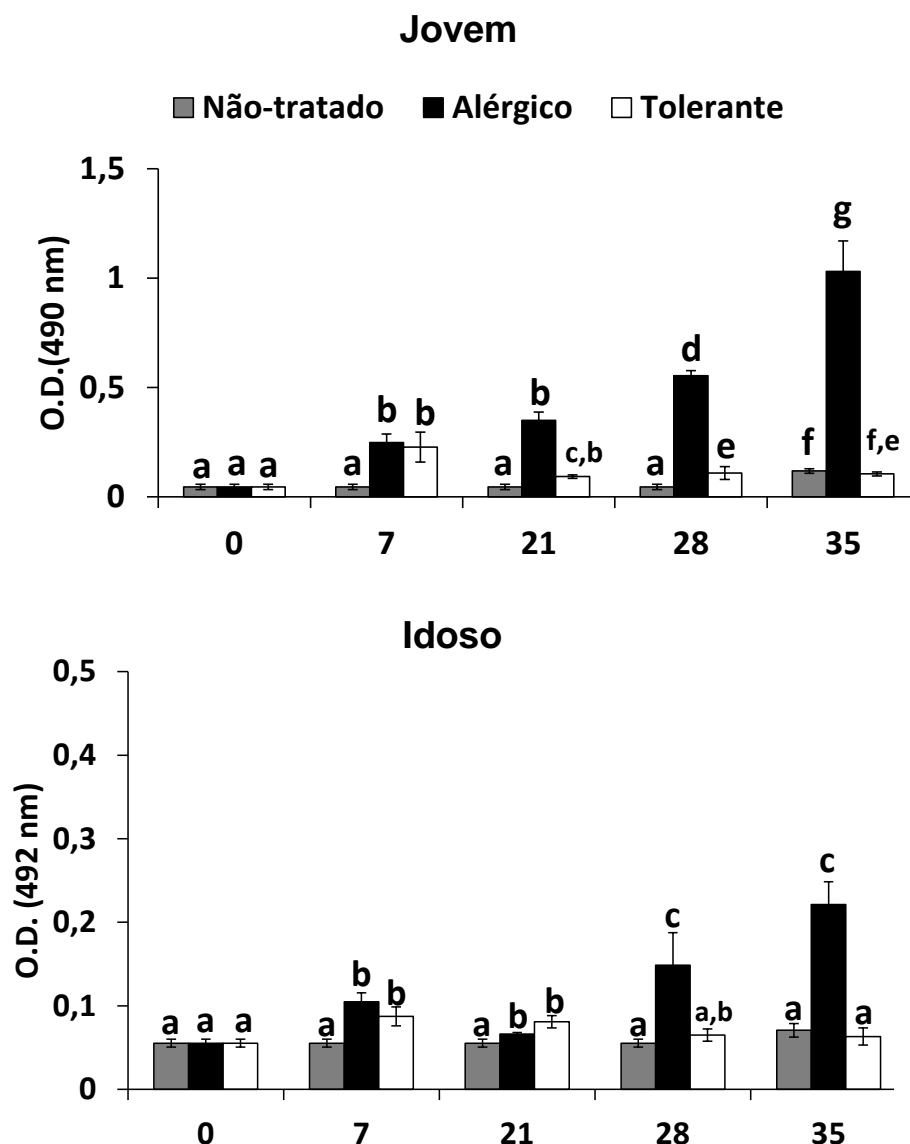
**Figure 21: O efeito de envelhecimento na indução da tolerância oral.**

Análise da produção de IgG-1 anti-Ova de animais com 8 e 53 semanas de idade dosada por ELISA. As primeiras letras apresentam as diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo tempo (ANOVA) e as segundas letras o mesmo grupo entre diferentes tempos (Student T) ( $p < 0,05$ ).

Analisamos também os níveis de IgA secretória (s-IgA) anti-Ova (Fig. 22). Nos animais jovens, após a imunização secundária durante a indução da tolerância oral (Dia 21), notamos um aumento gradual na produção de IgAs total nos animais alérgicos em comparação com os grupos tolerantes e controle (Fig. 22). Após a indução de alergia alimentar (Dia 35), essa produção

alcançou um alto nível nos animais alérgicos, o que não foi observado nos demais grupos (Fig.22).

Por outro lado, observamos baixos níveis de produção de IgAs total nos animais idosos durante a indução de tolerância oral e também após a indução de alergia alimentar. Notavelmente, observamos que os animais alérgicos produzem mesmo quando idosos maior quantidade de IgAs total que os demais grupos (Fig. 22).



**Figure 22: O efeito de envelhecimento na produção de IgAs anti-ova.**

Análise da produção de IgAs anti-Ova do muco intestinal de animais com 8 e 53 semanas de idade dosada por ELISA. As primeiras letras representam as diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo tempo (ANOVA) e as segundas letras o mesmo grupo entre diferentes tempos (Student T) ( $p < 0,05$ ).

## **N. O balanço da produção de citocinas na indução da tolerância oral e da alergia alimentar é alterado pelo envelhecimento.**

Ao avaliarmos a produção de citocinas, focalizamos nosso estudo naquelas relacionadas à alergia alimentar e à tolerância oral: IL-4, IL-5, TGF- $\beta$  e IL-10 produzidas por células do baço e dos linfonodos mesentéricos (Fig.23 e Fig.24 respectivamente) estimuladas *in vitro* com Ova.

Na Figura 23, ao verificarmos a produção de IL-4 no baço dos animais jovens, notamos que a partir da imunização primária (dia 21), a produção de IL-4 pelo grupo alérgico já se torna estatisticamente mais alta que no grupo tolerante (Fig. 23A). Após a indução de alergia alimentar, essa diferença se tornou mais evidente, o que caracteriza o processo inflamatório presente no grupo alérgico e com menor intensidade no grupo tolerante (Fig. 23A). Já nos animais idosos isso não aconteceu. Após a indução de alergia alimentar a produção específica de IL-4 não difere entre os grupos alérgico e tolerante. Curiosamente, nos animais não tratados, a produção de IL-4 aumentou após a indução de alergia alimentar, possivelmente por ser o primeiro contato desses animais com a ingestão de Ova, seria natural o aumento de citocinas inflamatórias (Fig. 23A).

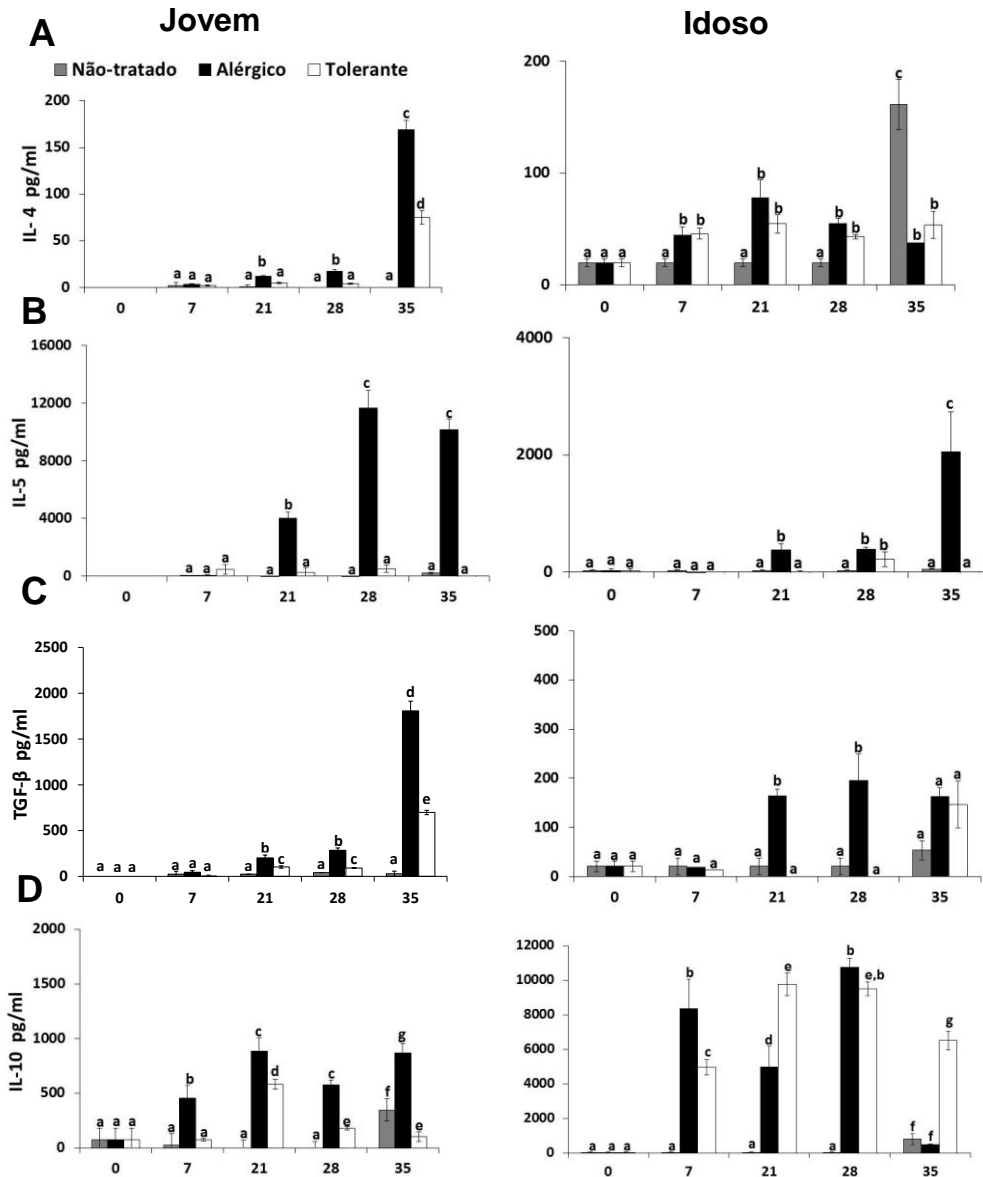
A produção de IL-5 no baço dos animais jovens é mais evidente no grupo alérgico a partir da imunização primária que no grupo tolerante (Dia 21) (Fig. 23A). Após a indução da tolerância oral, a produção de IL-5 específica no grupo alérgico aumentou significativamente e se manteve após a indução de alergia alimentar, o que não é visualizado nos demais grupos (Fig. 23B).

Entretanto, nos animais idosos, a produção de IL-5 foi mais baixa em todas as fases de indução de tolerância oral e alergia alimentar em comparação aos animais jovens, porém semelhante fato é observado nos animais jovens, após a imunização primária (Dia 21), ocorreu um aumento significativo na produção de IL-5 específica no grupo alérgico com relação ao grupo tolerante, e, após a indução da alergia alimentar, essa diferença se tornou mais visível (Fig. 23B).

O TGF- $\beta$  é uma citocina que desempenha um papel crucial na indução de tolerância oral, assim analisamos a sua produção por células do

baço (Fig.23C). Observou-se que, em animais jovens, a produção TGF- $\beta$  após a indução de tolerância oral em camundongos alérgicos é maior quando comparada a produzida pelo grupo tolerante (Fig.23C). Após o desafio oral com solução de clara de ovo, notamos um aumento de produção de TGF- $\beta$  no grupo alérgico, quando comparado ao grupo tolerante (Fig.23C). Nos camundongos idosos, a produção TGF- $\beta$  foi mais baixa em todos os grupos quando comparada a produzida pelos grupos jovens (Fig.23C). Notamos também, que após a indução de alergia alimentar, não observamos diferenças significativas na produção de TGF- $\beta$  entre o grupo alérgico e tolerante (Fig.23C).

Segundo a literatura, a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e além disso, está relacionada à modulação da tolerância oral. Analisamos a produção de IL-10 em camundongos jovens e verificamos que após, a indução de tolerância oral, a produção de IL-10 é baixa em relação ao grupo tolerante (Fig.23D). Após a indução de alergia alimentar com Ova, observamos um aumento na produção de IL-10 no grupo alérgico, o que não ocorreu no grupo tolerante (Fig.23D). Em camundongos idosos, a produção de IL-10 é maior quando comparada a produzida pelos animais jovens (Fig.23D). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos alérgico e tolerante de animais idosos após a indução de alergia alimentar (Fig.23D). Por outro lado, após a indução da alergia alimentar, a produção de IL-10 se reduziu em ambos os grupos, sendo que os camundongos alérgicos foram os mais afetados (Fig.23D).



**Figure 23: Avaliação cinética da produção de citocinas no baço durante a tolerância oral em modelo de alergia alimentar.**

Camundongos BALB / c de 8 e 53 semanas de idade foram tratados por via oral com salina (grupo Alérgico ou 20 mg Ova por gavagem (grupo Tolerante) ou não-tratados (**Dia 0**). Após 7 dias, os animais foram imunizados ip com 10 mg Ova e 1mg de Hidróxido de Alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (**Dia 7**), e receberam um reforço de sç de 10µg de Ova após 14 dias (**dia 21**). Para a indução de alergia alimentar (**Dia 28**), os camundongos foram desafiados oralmente com uma solução de clara de ovo contendo aproximadamente 10 Ova mg /ml, durante sete dias consecutivos (**dia 28-35**). Em cada etapa os animais foram sacrificados e o baço coletado até o final da indução de alergia alimentar (**dia 35**). Níveis de (A) IL-4 (B) IL-5 (C) TGF-β e (D) IL-10 foram dosados por ELISA. Barras representam a média ± SEM de 5 camundongos BALB / c por grupo (\* p <0,05). As primeiras letras representa as diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo tempo (ANOVA) e as letras segundo do mesmo grupo entre diferentes épocas (Student T) (p <0,05).

Nosso próximo passo foi avaliar no LnM as mesmas citocinas avaliadas no baço dos animais jovens e idosos (Fig.24). Nos animais jovens, detectamos níveis mais baixos de IL-4 no grupo tolerante em relação ao grupo alérgico após indução de tolerância oral (Fig.24A). Observamos que os níveis de IL-4 aumentaram no grupo tolerante em relação aos níveis obtidos de IL-4 do mesmo grupo, após a indução de alergia alimentar (dia 35) (Fig.24A). Mesmo assim, essa produção pelo grupo tolerante foi menor em relação ao grupo alérgico (Fig.24A).

Em animais idosos, não foi observada diferença significativa entre os grupos alérgico e tolerante após a indução de tolerância oral (dia 28) (Fig.24A).

De fato, após o desafio oral com OVA, somente o grupo alérgico apresentou um aumento significativa na produção de IL-4 comparada à produzida pelo grupo tolerante (Fig.24A).

Nos animais jovens, notamos que os níveis de produção de IL-5 foram suprimidos após a imunização primária (dia 21) no grupo tolerante com relação ao grupo de alérgico (Fig.24B). Além disso, observamos um aumento significativo de IL-5 nos animais alérgicos após a indução de tolerância oral que atingiu um alto patamar após a indução de alergia alimentar com Ova (Fig.24B).

Em contraste, não observamos uma produção significativa de IL-5 em camundongos idosos após indução de tolerância oral (Fig.24B). Somente após a indução de alergia alimentar o aumento da produção dessa citocina foi detectado no grupo alérgico em comparação ao tolerante (Fig.24B).

Quando avaliamos a produção de TGF- $\beta$  nos animais jovens, observamos diferenças significativas entre os grupos alérgico e tolerante após a indução de tolerância oral (dia 28) e após a indução de alergia alimentar (dia 35) (Fig.24C). Tanto na indução de tolerância oral, quanto após a indução de alergia alimentar, a produção de TGF- $\beta$  específica foi inibida nos animais jovens tolerantes quando comparados aos animais alérgicos e aos não-tratados (Fig.24C). Após a indução de alergia alimentar, observou-se um rápido aumento da produção de TGF- $\beta$  nos grupos alérgico e tolerante (Fig.24C).

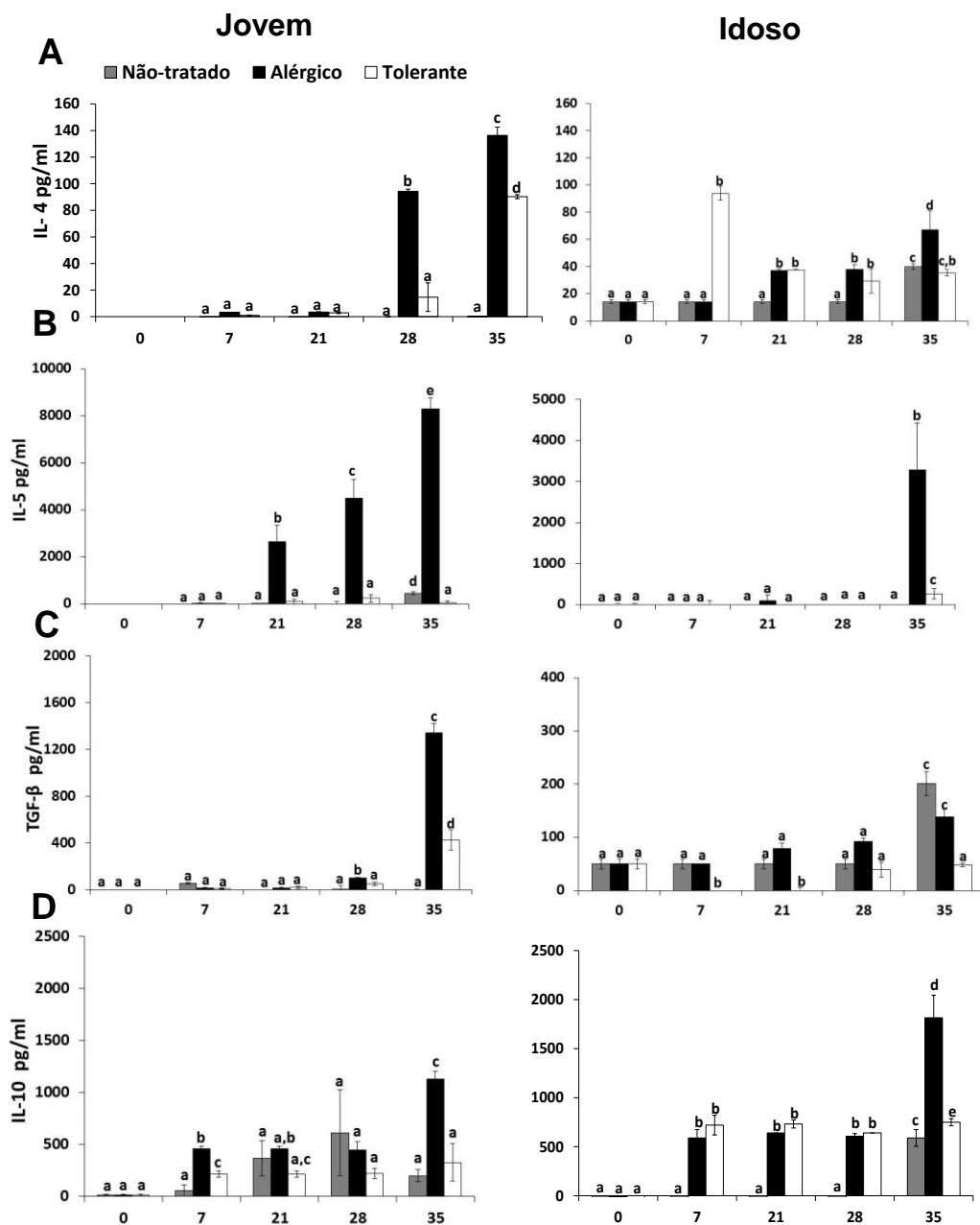
Portanto, no grupo alérgico, esse aumento foi mais expressivo comparado ao grupo tolerante (Fig.24C).

Em animais idosos, notamos que a produção de TGF- $\beta$  específica foi baixa em todos os tempos e grupos analisados em comparação aos jovens (Fig.22C). No entanto, após a indução da alergia alimentar (dia 35), um aumento de TGF- $\beta$  produção foi observada nos grupo alérgico e tolerante quando comparados aos obtidos após a indução de tolerância oral (Fig.24C).

Com relação à produção IL-10, nos animais jovens, somente após o tratamento oral é que observamos que o grupo alérgico produziu maiores níveis de IL-10 comparados aos grupos tolerantes (Fig.24D). Depois disso, apenas o desafio oral com Ova (dia 35), foi capaz de elevar os níveis de produção de IL-10 específicos no grupo alérgico (Fig.24D).

Nos animais idosos, a supressão da produção de IL-10 no grupo tolerante foi observada somente após indução de alergia alimentar, Antes disso, os níveis de IL-10 do grupo alérgico e tolerante não são estatistimamente significativos (Fig.24D).

Nossos resultados indicaram que a tolerância oral suprime as consequências do envelhecimento, modulando a produção de anticorpos e de citocinas pró-inflamatórias.



**Figure 24: Avaliação cinética da produção de citocinas nos LnM durante a tolerância oral em modelo de alergia alimentar.**

Camundongos BALB / c de 8 e 53 semanas de idade foram tratados por via oral com salina (grupo Alérgico ou 20 mg Ova por gavagem (grupo Tolerante) ou não-tratados (**Dia 0**). Após 7 dias, os animais foram imunizados ip com 10 mg Ova e 1mg de Hidróxido de Alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (**Dia 7**), e receberam um reforço de sç de 10µg de Ova após 14 dias (**dia 21**). Para a indução de alergia alimentar (**Dia 28**), os camundongos foram desafiados oralmente com uma solução de clara de ovo contendo aproximadamente 10 Ova mg /ml, durante sete dias consecutivos (**dia 28-35**). Em cada etapa os animais foram sacrificados e os linfonodos mesentéricos coletados até o final da indução da alergia alimentar (**dia 35**). Níveis de (**A**) IL-4 (**B**) IL-5 (**C**) TGF-β e (**D**) IL-10 foram dosados por ELISA. Barras representam a média ± SEM de 5 camundongos BALB / c por grupo (\* p <0,05). As primeiras letras representam as diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo tempo (ANOVA) e as letras segundo do mesmo grupo entre diferentes tempos (Student T) (p <0,05).



## **O.O envelhecimento e o papel das células reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> após a indução da alergia alimentar .**

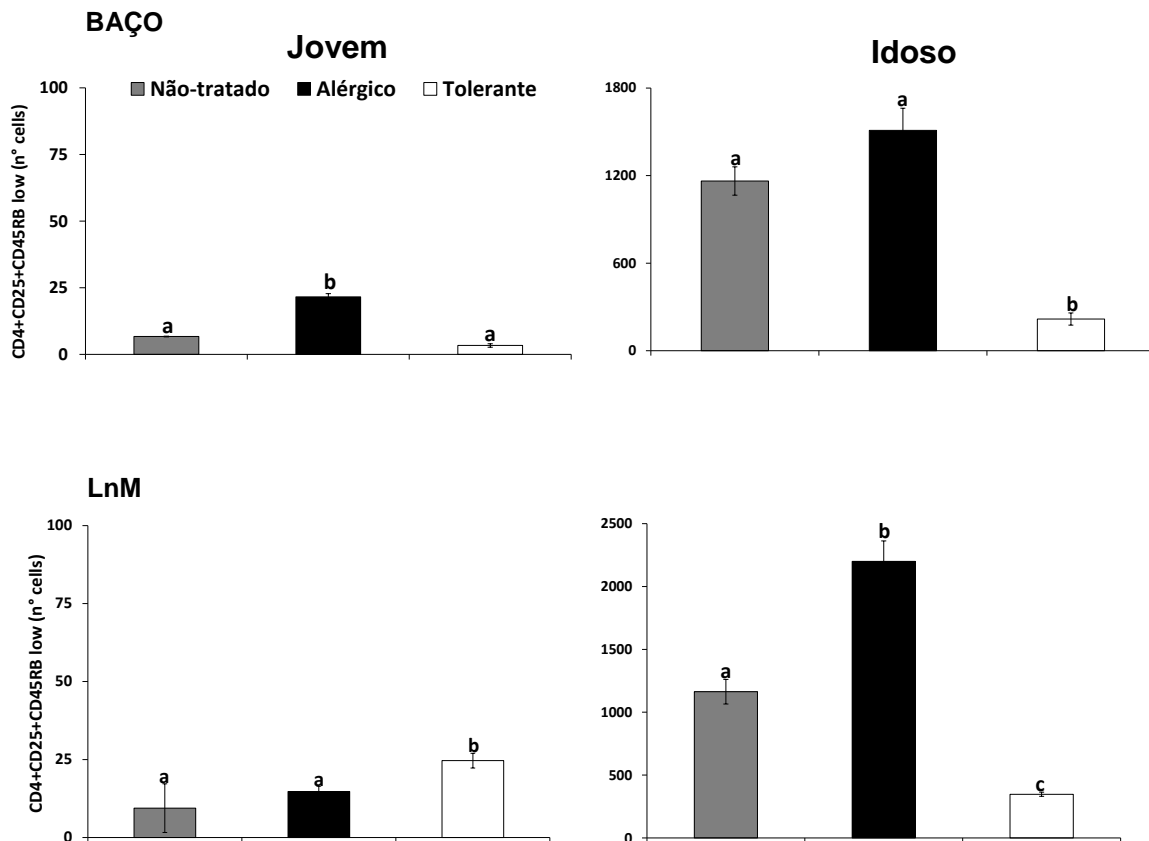
Muitos trabalhos demonstraram que a subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> participa na supressão da resposta imune durante a tolerância oral através da produção de TGF- $\beta$  e IL-10 (Sakaguchi et al., 2001) (Chehade and Mayer, 2005).

Neste trabalho foram analisados em camundongos jovens o número absoluto de células T CD4<sup>+</sup>Cd25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> no baço (Fig.25A) e nos linfonodos mesenéricos (LnM) (Fig.25B). Observou-se que os baços de camundongos alérgicos apresentam maior número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> que no grupo tolerante (Fig.25A). Entretanto, nos linfonodos mesentéricos esse aumento do número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> foi observado no grupo tolerante (Fig.25B).

Em camundongos idosos, observou-se números mais elevados de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> em comparação aos jovens, tanto no baço quanto nos linfonodos mesentéricos, sendo que o grupo alérgico se destacou em relação ao grupo tolerante (Fig.25 A e B)..

A subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> apresenta função reguladora no controle das respostas imunes a doenças alérgicas em camundongos. No modelo utilizado neste trabalho, mostramos que as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , bem como as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> estão envolvidas em eventos modulatórios imunes desencadeados pela reação alérgica e pelo processo de envelhecimento. Pretendemos estudar a participação de outras células T reg como potenciais candidatos para mediadores de tolerância oral, possivelmente com a utilização de outros marcadores, como LAP e Foxp3.

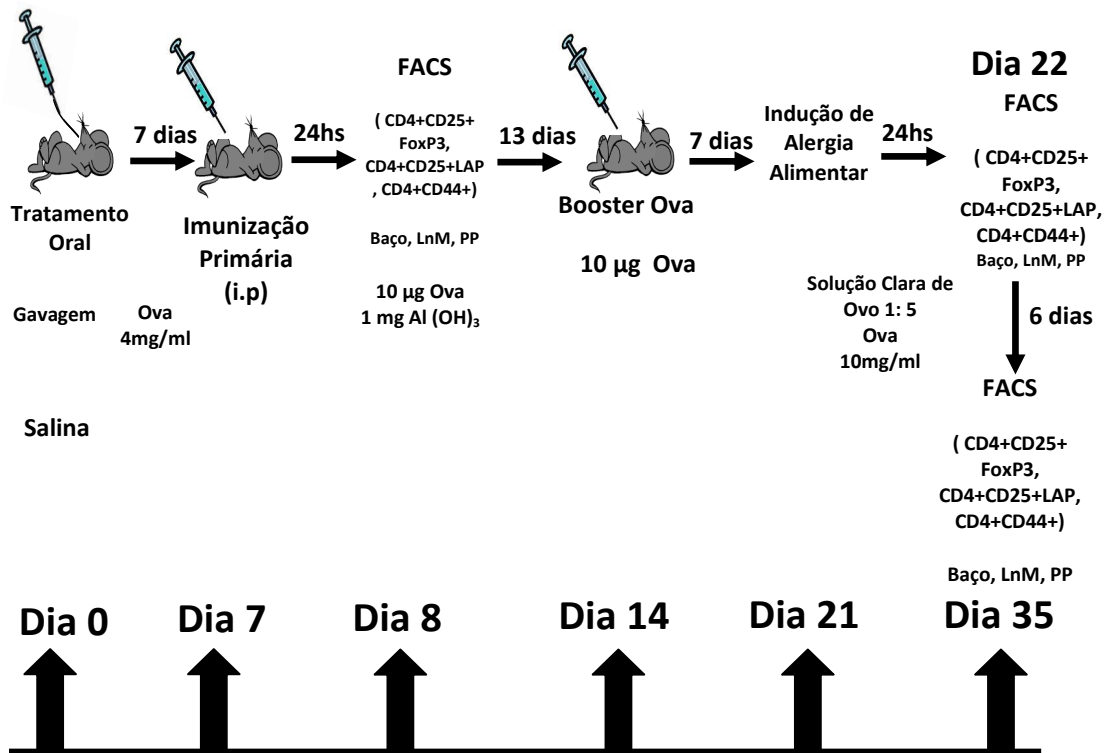
A partir desses resultados, concluímos que a mucosa intestinal tem mecanismos de regulação que contribuem para preservar a homeostase local. Esses mecanismos operam na indução da tolerância oral. No entanto, para manter sua integridade nos processos inflamatórios ou fisiológicos, durante o envelhecimento, a mucosa rapidamente recruta mediadores reguladores, como s-IgA, citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  e diferentes subpopulações de células T reguladoras.



**Figura 25: Avaliação do número absoluto de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> após a indução de alergia alimentar.**

Camundongos BALB / c de 8 e 53 semanas de idade foram tratados por via oral com salina (grupo Alérgico ou 20 mg Ova por gavagem (grupo Tolerante) ou não-tratados (**Dia 0**). Após 7 dias, os animais foram imunizados ip com 10 mg Ova e 1mg de Hidróxido de Alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (**Dia 7**), e receberam um reforço de sç de 10µg de Ova após 14 dias (**dia 21**). Para a indução de alergia alimentar (**Dia 28**), os camundongos foram desafiados oralmente com uma solução de clara de ovo contendo aproximadamente 10 Ova mg /ml, durante sete dias consecutivos (**dia 28-35**). No dia 35 os animais foram sacrificados e os órgãos coletados. As barras representam a média ± SEM de 5 camundongos BALB / c por grupo As letras representam as diferenças significativas entre os diferentes grupos no mesmo tempo (ANOVA) (p < 0,05).

**P. O envelhecimento e o papel das células reguladoras durante a indução da tolerância oral e a indução da alergia alimentar à Ova em camundongos DO.11.10 idosos.**



**Protocolo 3: Indução de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos DO.11.10 idosos:**

Nosso próximo passo foi avaliar como o envelhecimento influenciaria no perfil de células reguladoras ativadas no tecido linfóide associado à mucosa intestinal durante a tolerância oral e após a indução de alergia alimentar. Algumas subpopulações de células reguladoras como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP são descritas como muito importantes para indução de tolerância oral (Curotto de Lafaille et al., 2008; Faria and Weiner, 2005). Utilizamos camundongos transgênicos DO. 11.10 de 53 semanas de idade que possuem TCR específico para o peptídeo 223-232 da Ova para facilitar a análise da ativação antígeno-específica das células T reguladoras.

Isolamos células do baço, dos linfonodos mesentéricos e das placas de Peyer e avaliamos o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP e CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> (Figs. 26, 27 e 28 respectivamente).

No baço, não observamos diferenças significativas no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 entre os grupos tolerante e imune (Fig.26).

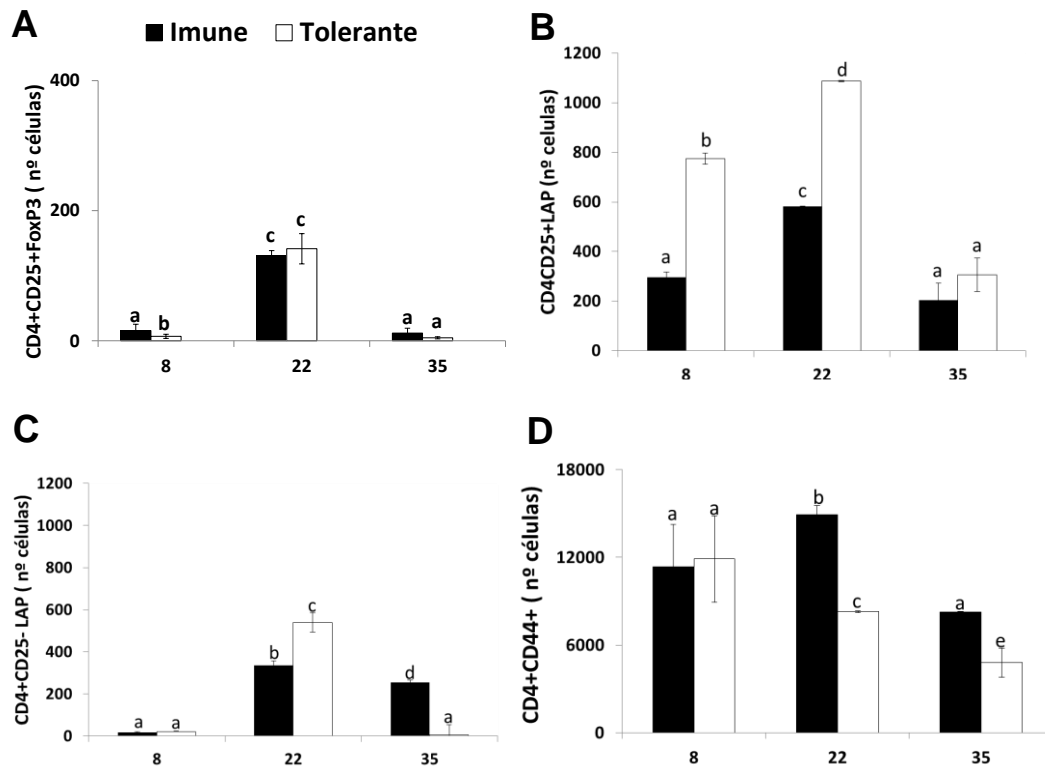
Na Fig. 26, observamos 24hs após a imunização primária (Dia 8), diferenças significativas entre os grupos, ocorrendo uma supressão na produção de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 ativadas nos baços dos animais do grupo tolerante em relação aos imunes (Fig.26A). No início da indução da alergia alimentar (Dia 22), verificamos um aumento no número de células em ambos os grupos, porém sem diferenças significativas entre eles (Fig.26A). Após a indução de alergia alimentar, o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 se reduziu nos dois grupos, sugerindo que a alergia alimentar suprimiu a ativação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 (Fig.26A).

Com relação à subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> observamos diferenças significativas entre os grupos após a imunização primária (Fig.26B). O grupo tolerante apresentou maior número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> que o grupo imune. Esse resultado se manteve 24hs após a indução de alergia alimentar e o aumento das células nos dois grupos também foi observado comparando os dias 8 e 22 (Fig.26B). Entretanto após a indução de alergia alimentar (Dia 35), houve uma drástica redução na produção de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, sugerindo que o processo alérgico inibiu a produção desta subpopulação de células reguladoras (Fig.26B).

Ao analisarmos a produção de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup>, observamos que no dia 8, o número dessas células não apresentou diferenças significativas entre os grupos. No dia 22, o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup> aumentou significativamente em ambos os grupos, sendo que o grupo tolerante apresentou maior número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup> que o grupo imune (Fig.26C).

O número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> após a imunização primária (Dia 8), foi alto em ambos os os grupos (Fig.26D). Já no início da indução da alergia alimentar, o número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> se reduziu no grupo tolerante comparado ao grupo imune (Fig.26D). Após a indução de alergia alimentar, apesar do número absoluto de células diminuir em ambos os grupos, a redução no número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> se mantêm significativamente no grupo tolerante comparado ao grupo imune (Fig.26D).

## BAÇO



**Figura 26: O Efeito do envelhecimento no número absoluto de células CD4+CD25+Foxp3, CD4+CD25+LAP, CD4+CD25-LAP e CD4+CD44+ no baço durante a indução de alergia alimentar.**

Camundongos fêmeas e machos, DO11.10 de 53 semanas foram tratados oralmente com 20mg de Ova (tolerante- barras brancas) ou salina (imune-barras pretas) tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p.com 10µg de Ova + 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> 24 hs depois, (Dia 8), os órgãos foram coletados. Treze dias depois, receberam um reforço de solução de 10µg de Ova e após sete dias foi iniciada a indução de alergia alimentar. Um dia após a indução de alergia alimentar, os órgãos foram coletados (Dia 22). Após seis dias consecutivos de ingestão de clara de ovo, os animais foram sacrificados e os órgãos coletados (Dia 35). As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4+. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão da quantidade de células. As letras representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA) (p < 0,05). N° de animais/grupo = 5.

Na Fig. 27, avaliamos as mesmas populações de células T reguladoras, porém nos linfonodos mesentéricos (LnM) (Fig.27).

Observamos que, 24hs após a imunização primária (Dia 8) já ocorreram diferenças significativas entre os grupos. Houve redução no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 ativadas no grupo imune em relação ao tolerante (Fig.27A). No início da indução da alergia alimentar (Dia 22), esse resultado se inverte, ocorrendo um aumento no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 no grupo imune em comparação ao grupo tolerante. (Fig.27A). Após a indução de alergia alimentar, o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 se reduziu drasticamente nos dois grupos, sugerindo que a alergia alimentar suprime a ativação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3 também nos LnM (Fig.27A).

Com relação à população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, observamos diferenças significativas entre os grupos após a imunização primária (Fig.27B). O grupo tolerante produziu menores números de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> que o grupo salina (Fig.27B). Entretanto, 24hs após a indução de alergia alimentar (Dia 22), o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> aumentou rapidamente nos dois grupos, porém sem diferenças significativas entre eles (Fig.27B).

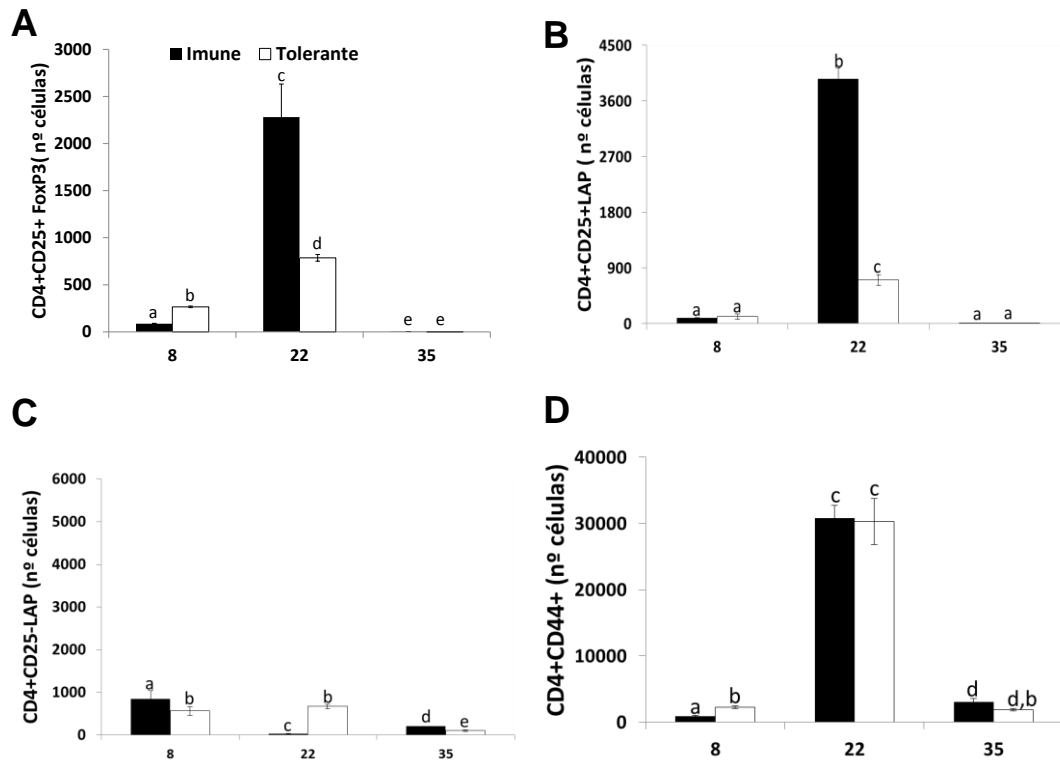
Curiosamente, após a indução de alergia alimentar (Dia 35), houve uma drástica redução no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Fig.27B).

Ao analisarmos a produção de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>, observamos que, no dia 8, o número dessas células apresentou diferenças significativas, com a redução de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> no grupo tolerante, comparado ao grupo imune (Fig.27C). No início da indução de alergia alimentar, o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> no grupo tolerante se manteve, porém o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> se reduziu no grupo imune (Fig.27C). No fim da indução de alergia alimentar, esse resultado se inverteu novamente, e houve a redução do número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> no grupo tolerante em relação ao grupo salina (Fig.27C).

Quando analisamos a produção de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> após a imunização primária (Dia 8), o grupo tolerante apresentou maior número de células T de CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> com relação ao grupo imune (Fig.27D). No início da indução da alergia alimentar, o número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> atingiu um alto

patamar nos dois grupos, porém sem diferenças significativas entre eles (Fig.27D). Após a indução de alergia alimentar, o número absoluto de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> diminuiu em ambos os grupos, mas sem diferenças significativas entre eles (Fig.27D).

## LnM



**Figura 27: O efeito do envelhecimento no número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP e CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos durante a indução de alergia alimentar.**

Camundongos fêmeas e machos, DO11.10 de 53 semanas foram tratados oralmente com 20mg de Ova (tolerante- barras brancas) ou salina (imune-barras pretas) tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p.com 10µg de Ova + 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> 24 hs depois, (Dia 8), os órgãos foram coletados. Treze dias depois, receberam um reforço de sç de 10µg de Ova e após sete dias foi iniciada a indução de alergia alimentar. Um dia após a indução de alergia alimentar, os órgãos foram coletados (Dia 22). Após seis dias consecutivos de ingestão de clara de ovo, os animais foram sacrificados e os órgãos coletados (Dia 35). As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4<sup>+</sup>. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão da quantidade de células. As letras representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA) (p < 0,05). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

Na Fig. 28, avaliamos o perfil das mesmas populações de células T reguladoras nas placas de Peyer (PP) (Fig.28).

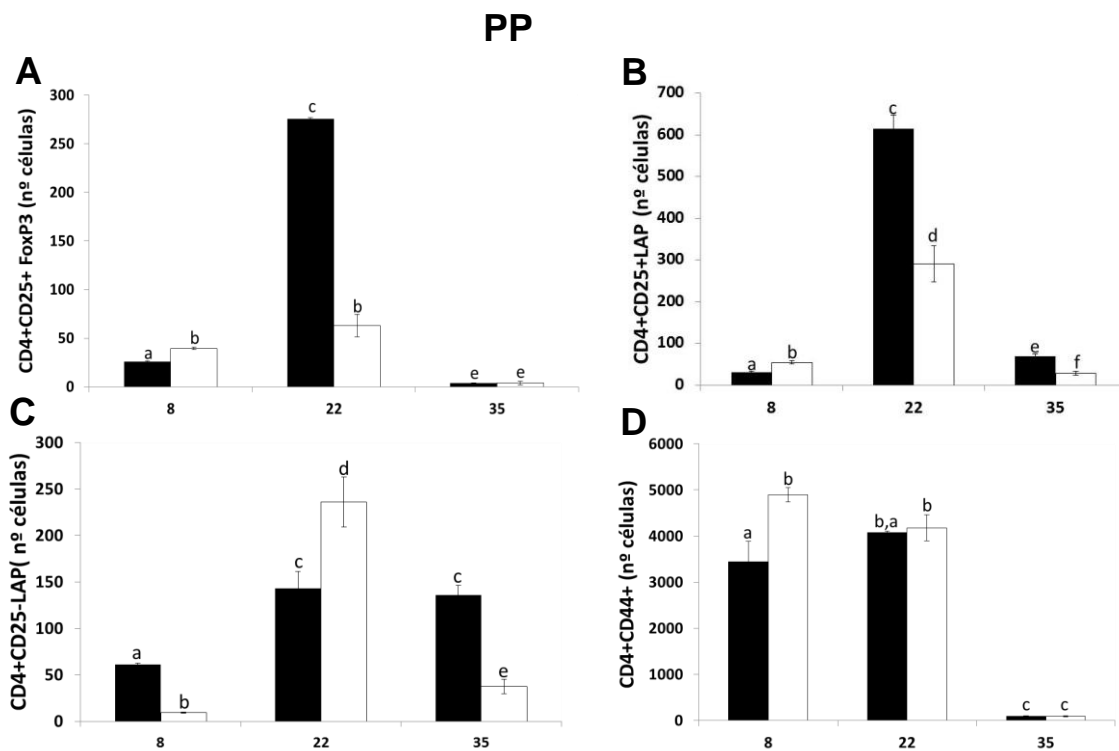
Observamos na Fig. 28A que 24hs após a imunização primária (Dia 8) já ocorreram diferenças significativas entre os grupos, houve redução do número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> ativadas no grupo imune em relação ao tolerante (Fig.28A). No início da indução da alergia alimentar (Dia 22), esse resultado se inverteu, ocorreu um aumento significativo no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> no grupo imune em comparação ao grupo tolerante (Fig.28A). Após a indução de alergia alimentar (Dia 35), o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> se reduziu drasticamente nos dois grupos, sugerindo que a alergia alimentar suprime a ativação das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> também nas PP (Fig.28A).

Com relação à população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, observamos também diferenças significativas entre os grupos após a imunização primária (Fig.28B). O grupo tolerante apresentou um número menor de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> que o grupo imune (Fig.28B). Entretanto, 24hs após a indução de alergia alimentar (Dia 22), o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> aumentou rapidamente nos dois grupos, com menor número no grupo tolerante em comparação ao grupo imune (Fig.28B). Após a indução de alergia alimentar (Dia 35), houve uma expressiva redução no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> em ambos os grupos, mantendo mesmo assim, a redução de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> no grupo tolerante em relação ao grupo imune (Fig.28B).

Ao analisarmos a produção de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>, observamos que no dia 8, o número dessas células apresentou diferenças significativas entre os grupos, com redução significativa do número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> no grupo tolerante, comparado ao grupo imune (Fig.28C). No início da indução de alergia alimentar (Dia 22), o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> em ambos os grupos aumentou significativamente, porém o grupo tolerante apresentou maior número dessas células, em comparação ao grupo imune (Fig.28C). No fim da indução de alergia alimentar esse resultado se inverteu novamente, com a redução do número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> no grupo tolerante em relação ao grupo imune (Fig.28C).



Quando analisamos o número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> após a imunização primária (Dia 8), ambos os grupos apresentaram altos números de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, entretanto o grupo tolerante apresentou maior número que o grupo imune (Fig.28D). No início da indução da alergia alimentar, o número de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> manteve-se alto nos dois grupos, sem diferenças significativas entre eles (Fig.28D). Após a indução de alergia alimentar, o número absoluto de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> diminuiu tanto, que essas células quase desapareceram em ambos os grupos sem diferenças significativas entre eles (Fig.28D).



**Figura 28: O efeito do envelhecimento no número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> nas placas de Peyer e no processo de indução de alergia alimentar.**

Camundongos fêmeas e machos, DO11.10 de 53 semanas foram tratados oralmente com 20mg de Ova (tolerante- barras brancas) ou salina (imune-barras pretas) tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p.com 10µg de Ova + 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> 24 hs depois, (Dia 8), os órgãos foram coletados. Treze dias depois, receberam um reforço de sç de 10µg de Ova e após sete dias foi iniciada a indução de alergia alimentar. Um dia após a indução de alergia alimentar, os órgãos foram coletados (Dia 22). Após seis dias consecutivos de ingestão de clara de ovo, os animais foram sacrificados e os órgãos coletados (Dia 35). As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4<sup>+</sup>. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão da quantidade de células. As letras representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA) (p < 0,05). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

Esses resultados sugerem que as populações de células T reguladoras analisadas dos animais idosos apresentam um papel importante na indução da tolerância oral, mesmo durante o envelhecimento. Em camundongos idosos (Balb/c e DO.11.10), a redução da susceptibilidade á indução de tolerância oral é concomitante á diminuição no número de células T com fenótipo regulador, encontradas em órgãos linfoides associados ao intestino (LnM e PP).

## 5. Discussão

Na primeira parte de resultados, verificamos quais seriam os efeitos do envelhecimento na indução de tolerância oral. Para tal, utilizamos camundongos BALB/c em 4 idades diferentes (8, 28, 53 e 92 semanas) e analisamos os níveis de imunoglobulinas totais, IgG1 (Fig.6 A e B) e IgG2a anti-Ova (Fig.7).

Esse é um parâmetro utilizado por vários autores que já demonstraram que a indução de tolerância oral se traduz na supressão da produção de anticorpos séricos específicos (Challacombe and Tomasi, 1980; van der Heijden et al., 1987).

Com o avanço da idade, notamos que a produção de anticorpos totais e IgG1 específicos estava reduzida no grupo imune, porém o efeito da tolerância oral se mantinha nos demais grupos (Fig6 A e B). Já a produção dos anticorpos IgG2a anti-Ova oscilava ao longo das idades (Fig.7). De acordo com alguns trabalhos, o envelhecimento altera a transdução de sinais em células B e T diminuindo, assim, a ativação dos linfócitos e a subsequente produção de anticorpos específicos. Além disso, o processo de envelhecimento também está associado à redução de células T com capacidade efetora e proliferativa, o que prejudicaria a resposta imune efetiva a novos antígenos (Schmucker et al., 2003; Thoreux et al., 2000). Esses resultados e outros complementares à eles, foram publicados recentemente pelo nosso grupo (Speziali et al., 2009) mostrando que embora ocorra um aumento dos níveis de imunoglobulinas séricas totais, a produção de IgG1 e Ig específicas, declinam com o envelhecimento. A capacidade proliferativa dos linfócitos T também se mostrou comprometida nesse estudo (Speziali et al., 2009).

A tolerância oral, por ser uma resposta não inflamatória comum a antígenos presentes na mucosa intestinal, também é prejudicada pelos fatores relacionados ao envelhecimento. Em nosso laboratório, já foi observado que a tolerância oral à Ova pode ser induzida por gavagem em todas as linhagens de camundongos jovens, porém, somente é observada em camundongos idosos das linhagens C3H/HeJ com 20 semanas e B6D2F1 de 38 semanas de idade (Faria et al., 1993).

Outros trabalhos também relataram resultados semelhantes. Wakabayashi e cols. observaram a refratariedade à tolerância oral em camundongos entre 6 e 8 meses de idade, utilizando como antígeno hemácias de carneiro (Kato et al., 2003; Wakabayashi et al., 1999).

Kato e cols. também mostraram a refratariedade à indução da tolerância oral em camundongos de 6-8 meses, 12-14 meses e 24 meses tratados por gavagem com Ova. Segundo esses autores, tal refratariedade se deve a um defeito na 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 uma redução no número de células dendríticas (DCs) sugere que ocorre uma alteração nas atividades de células T e B em animais idosos. Tal alteração pode estar relacionada em parte com o declínio na função de (DCs) nas placas de Peyer (Kato et al., 2003).

Ao analisarmos a produção de IgA secretória no muco intestinal, notamos uma variação na produção de IgA total e anti-Ova com o avançar da idade (Fig.8). Comparando os camundongos de 8 e 92 semanas, observamos que a sIgA total se encontra reduzida nos grupos imune e tolerante por ingestão voluntária (Fig.8A). É interessante notar que não ocorreu declínio dos níveis de sIgA nos animais não manipulados durante o envelhecimento (Fig.8A).

Em camundongos de 92 semanas, não observamos alterações significativas na produção de sIgA anti-Ova nos tolerantes, somente o grupo imune (Fig.8B). esse resultado também faz parte de um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo (Santiago et al., 2008) mostrando que embora os níveis totais de sIgA não se altere durante o envelhecimento em camundongos não manipulados, a produção de sIgA específica se reduz.

As funções das células B também estão alteradas no processo de envelhecimento. A formação dos centros germinativos se reduz e as respostas a anticorpos diminuem e se tornam mais lentas, e a redução da afinidade dos anticorpos e maturação de também é reduzida (Nikolich-Zugich, 2005).

Na literatura existem várias controvérsias a respeito da produção de IgAs no envelhecimento. Trabalhos já demonstraram que em ratos idosos quando imunizados oralmente com toxina colérica nativa, apresentam um declínio significativo na produção de IgAs específica (Schmucker et al., 1988).

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 (Arranz et al., 1992; Fujihashi and McGhee, 2004; Listi et al., 2006). Nossos dados recentemente publicados (Santiago et al., 2008) e apresentados aqui, mostram uma distinção clara entre a produção de sIgA total e sIgA específica.

Ao avaliarmos a produção de IgE sérica total e anti-ova, notamos que após 28 semanas o efeito da tolerância oral não é mais observado (Fig.9 A e B). Os níveis de IgE produzidos pelos camundongos idosos a partir de 28 semanas se reduzem (Fig.9 A e B).

A produção de IgE sérica é muito sensível à indução de tolerância oral como mostrado anteriormente por trabalho do nosso grupo analisando a supressão de vários parâmetros imunológicos da alergia pela tolerância oral (Fernandes, 2007; Rios et al., 1988). Os parâmetros inflamatórios mais facilmente inibidos são a produção de IgE e a migração de eosinófilos para o sítio inflamado.

Nos últimos anos, vários trabalhos tem usado a indução de tolerância oral específica como tratamento de alergias alimentares, as quais têm como principal consequência a alta produção de IgE sérica (Staden et al., 2007).

Neste estudo, observamos que, embora a produção basal de IgE sérica tenha aumentado com o envelhecimento (Fig. 9A), a produção de IgE anti-Ova se reduziu (Fig. 9B). De fato, alguns trabalhos relatam que o processo envelhecimento reduz os sintomas de alergias alimentares, por diminuir drasticamente a produção de IgE sérica total e específica e a degranulação de eosinófilos. Estudos em humanos já demonstraram que a produção de IgE sérica é mais baixa em indivíduos acima de 60 anos de idade, comparados aos jovens, de 24 anos de idade. (Mathur et al., 2008)

Nosso próximo passo então foi analisar a produção de IL-4 no envelhecimento, pois a citocina IL-4 estimula a troca de isotipo para IgE, além de auxiliar a indução de tolerância oral (Brandtzaeg et al., 1996; Corren, 2011). Observamos que a produção específica de IL-4 (em cultura estimulada por Ova) foi significativamente menor no baço dos animais tolerantes quando comparada àquela obtida nos camundongos imunes (Fig.10A). Esse resultado

condiz com a literatura, pois citocinas pró-inflamatórias estão reduzidas no processo de tolerância oral (Sun et al., 2010). Camundongos do grupo tolerante com 28 e 92 semanas de idade ainda apresentaram redução na produção de IL-4 (Fig.10A) mostrando que, da mesma forma que IgE, a secreção de IL-4 é um parâmetro bastante sensível a indução de tolerância oral. Nos demais órgãos, de forma geral, a produção de IL-4 se mantém em baixos níveis e estável ao longo do envelhecimento (Fig.10B e C).

Da mesma forma que a IgE, a produção específica de IL-4 por células do baço e dos linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c imunizados diminuiu a partir das 28 semanas de idade. Vários trabalhos têm demonstrado que a produção de IL-4 é reduzida em animais idosos (Busse and Mathur, 2010; Gelfand et al., 2004; Hasegawa et al., 2006). Em modelos de asma, camundongos BALB/c idosos imunizados com Ova apresentam menor quantidade de IL-4 no fluido broncoaveolar quando comparados aos animais jovens imunizados (Gelfand et al., 2004). Hasegawa e cols. observaram que camundongos idosos com TCR Ova específico apresentam baixa expressão de IL-4 quando células T CD4<sup>+</sup> virgens são purificadas do baço e estimuladas com Ova (Hasegawa et al., 2006).

A redução de todos os parâmetros relacionados a resposta imune específica induzida nos camundongos BALB/c idosos (IgG1, IgE, IL-4) mediante a imunização com Ova + Al(OH)<sub>3</sub> pode estar relacionada aos efeitos gerais do envelhecimento no sistema imune. Como já mencionado, esse processo afeta tanto a função das células B e T como também reduz significativamente a produção dessas células pela medula óssea e pelo timo (Linton and Dorshkind, 2004). A consequência ao longo do tempo seria um acúmulo de linfócitos ativados (principalmente linfócitos T de memória) e a redução do pool de linfócitos virgens. Esse acúmulo de linfócitos de memória reduziria a capacidade do sistema imune de reagir a antígenos novos, diminuindo assim os níveis de imunoglobulinas específicas e citocinas produzidas após estimulação específica como observamos no nosso modelo.

Avaliamos a seguir, o papel das citocinas anti-inflamatórias no envelhecimento e após a indução da tolerância oral (Fig.11 e 12). A produção de IL-10 no baço até 28 semanas é reduzida nos animais tolerantes quando comparada a observada no grupo imune (Fig.11A). As principais citocinas

reguladoras envolvidas na indução de tolerância oral são IL-10 e TGF- $\beta$  (Faria and Weiner, 2006a; Rizzo et al., 1999; Sonoda et al., 1989). Já foi estabelecido que a administração oral de antígenos induz a produção de células T reguladoras, transformando a mucosa intestinal no maior sítio extra tímico indutor de células T reguladoras (Weiner et al., 2011). Entretanto, a tolerância oral induzida por células T reguladoras induzidas de subtipo CD4+CD25+FoxP3+CD45RB<sup>low</sup> na ausência de células T reguladoras naturais não é dependente da produção de IL-10 (Mucida et al., 2005).

Em alguns trabalhos do nosso laboratório observamos uma correlação direta entre a indução de tolerância oral e a produção aumentada de IL-10. No entanto, enquanto que essa correlação foi clara em modelos de inflamação do tipo Th1 (como a encefalomielite autoimune experimental) (Faria et al, 2003), não obtivemos o mesmo resultado em estudos de tolerância oral utilizando modelos de inflamação alérgica (Santiago, 2011)

Observamos, além disto, que a produção de IL-10 se reduziu a partir de 28 semanas de idade no baço principalmente, mas também nos LnM e PP e, a partir de então, se manteve constante sem diferenças significativas entre os grupos (Fig. 11A, B e C, respectivamente). Estudos recentes em nosso laboratório comprovam que a mucosa intestinal em camundongos idosos é severamente afetada pelo processo de envelhecimento com a redução da frequência de linfócitos intraepiteliais e a redução da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  no intestino delgado (Santiago et al., 2011).

Nosso próximo passo foi avaliar como estaria a produção de outra citocina anti-inflamatória, TGF- $\beta$ , após a indução da tolerância oral nos mesmos órgãos de animais idosos (Fig. 12A, B e C, respectivamente). Observamos diferenças significativas entre os grupos imune e tolerante com menor produção de TGF- $\beta$  pelos animais tolerantes somente até 28 semanas de idade (baço e PP). Após essa idade, não observamos diferenças entre os grupos. Ocorreu, na verdade, uma oscilação com aumento (53 semanas) e redução (92 semanas) da produção de TGF- $\beta$  em todos os órgãos (Fig. 12A, B e C, respectivamente). Como ocorre um aumento na idade de 53 semanas na produção de TGF- $\beta$  em todos os órgãos e os experimentos em animais de idades diferentes foram realizados em épocas diferentes, não podemos eliminar a hipótese de que essa oscilação pode ser devida a diferenças nos

testes de ELISA nesse período. Experimentos confirmando esses resultados são necessários nesse caso.

Vários trabalhos demonstram o envolvimento importante do TGF- $\beta$  na indução de tolerância oral (Faria et al., 2003; Santos et al., 1994; Weiner, 1994). Já foi observado inclusive que somente a administração oral do TGF- $\beta$  induz o aumento da tolerância oral (Ando et al., 2007). Entretanto, no nosso trabalho, observamos que os grupos tolerantes produziram menor quantidade de TGF- $\beta$  que o grupo salina no baço, LnM e PP (8 semanas)(Fig. 12). Esse mesmo resultado foi obtido também em trabalhos recentes do nosso laboratório utilizando um modelo de imunização semelhante (Santiago et al., 2011)

Outros autores também já mostraram que a produção de TGF- $\beta$  não é sempre observada na indução de tolerância oral (Baggi et al., 1999; Husby et al., 1994). Baggi e colaboradores, utilizando modelo experimental de miastenia grave, observaram que em camundongos, após administração oral de epitopos de células T específicos (TACHR), a produção de TGF- $\beta$  não sofria alterações (Baggi e cols., 1999). Husby e colaboradores demonstraram que em humanos, o aumento de TGF- $\beta$  não é observado durante a indução da tolerância específica para KLH (“*keihole limpet hemocyanin*”) (Husby e cols., 1994).

Uma hipótese para explicar o declínio na produção de IL-10 e TGF- $\beta$  com o envelhecimento seriam as alterações em células apresentadoras de antígenos em animais idosos.

Trabalhos relatam que as células dendríticas estão alteradas em número e função durante o envelhecimento (Santiago et al., 2011; Shurin et al., 2007; Simioni et al., 2010). Santiago e colaboradores observaram que as células dendríticas presentes nos linfonodos mesentéricos de animais idosos (53 semanas) não estimulam a produção de TGF- $\beta$  por linfócitos T estimulados com antígeno (Santiago et al., 2011). Shurin e colaboradores observaram que em humanos, o número de células dendríticas nas placas de Peyer é menor em idosos do que em indivíduos jovens (Shurin et al., 2007). Outros trabalhos já relataram que camundongos acima de 40 semanas de idade apresentam células dendríticas incapazes de induzirem proliferação de células T CD4+ no baço, prejudicando assim, a produção de citocinas (Fujihashi and McGhee, 2004; Simioni et al., 2010).



Entretanto, Carlson e colaboradores observaram que os níveis séricos TGF- $\beta$ 1 aumentam por volta de um ano de idade em camundongos e entre 60 e 90 anos de idade em humanos ( período pós reprodutivo) (Carlson et al., 2009).

De acordo com esses diversos dados, a produção de TGF- $\beta$  oscila com o envelhecimento, o que condiz com nossos resultados (Fig. 12).

Investigamos a seguir a produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-2 após a indução de tolerância oral e o efeito do envelhecimento na produção dessas citocinas (Fig.13 e 14, respectivamente). Ambas as citocinas são facilmente suprimidas pela indução de tolerância oral em vários modelos de inflamação (Faria and Weiner, 2006).

Com relação a TNF- $\alpha$ , observamos que a supressão dessa citocina pró-inflamatória pela indução de tolerância oral foi mantida no baço de camundongos até 53 semanas de idade. Houve uma redução drástica na produção de TNF- $\alpha$  em todos os animais de 92 semanas de idade sem diferenças significativas entre os grupos (Fig.13 A). Nos demais órgãos, LnM e PP, a produção de TNF- $\alpha$  foi variável com a idade dos animais, e, em camundongos de 92 semanas de idade, a produção de TNF- $\alpha$  foi bastante reduzida nos grupos tolerantes (Fig.13 B e C). De acordo com alguns trabalhos, o TNF- $\alpha$ , além de seus conhecidos efeitos pró-inflamatórios, também possui um potente efeito imuno-modulador de células T CD4+ e, em alguns casos, pode inibir doenças autoimunes como lupus e diabetes tipo I (Aringer and Smolen, 2008; Chen et al., 2007; Jacob et al., 1990).

Além disso, o receptor II do TNF é expresso em células T reguladoras humanas e murinas nas quais está associando à sua alta capacidade supressora (Chen et al., 2007). Esse potente atividade imuno-moduladora do TNF poderia explicar, principalmente no baço, a baixa produção de TNF- $\alpha$  nos animais idosos dos grupos tolerantes em relação ao grupo imune (Fig.13A). Nos animais jovens, a indução de tolerância oral não afetou a produção dessa citocina.

Agius e colaboradores analisaram a produção de TNF- $\alpha$  na pele de indivíduos com mais de 70 anos de idade (Agius et al., 2009). Eles observaram que após a injeção subcutânea de um antígeno nesses indivíduos, os linfócitos não migram para o local, apesar de não apresentaram qualquer alteração

quando testados *in vitro*. Aparentemente, com o envelhecimento, os macrófagos produzem níveis mais baixos de TNF- $\alpha$ , o que reduz a expressão de moléculas de adesão nesse tecido e, conseqüentemente, a migração de células T para o local da injeção (Agius et al., 2009).

Ao avaliarmos a produção de IL-2 (Fig.14), observamos que ela foi significativamente menor nos baço e LnMs dos animais de 8 e 92 semanas de idade dos grupos tolerantes quando comparados com os animais da mesma idade do grupo imune (Fig.14A e B). A indução de tolerância oral, em geral, se acompanha da supressão da produção de citocinas 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 pela administração oral de antígenos (Faria and Weiner, 2006a; Melamed et al., 1996). Nossos resultados nesse estudo mostraram resultados semelhantes. Camundongos que se tornaram tolerantes pela administração oral de Ova apresentaram níveis reduzidos de citocinas como IL-4, TNF-  $\alpha$  e IL-2.

Nossa próxima questão foi analisar a indução de tolerância oral e o efeito do envelhecimento na produção das tão bem descritas populações de células T reguladoras e alguns subtipos, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Fig.15), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Fig.16) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> (Fig.17).

Vários marcadores já foram descritos para as células T reguladoras naturais, sendo os principais o receptor  $\alpha$  da interleucina 2 (CD25) e o Foxp3 (fator de transcrição *forkhead box p3*) os quais são essenciais para a sua função reguladora, além de outros marcadores como CTLA-4 e GITR (*glucocorticoid inducible tumor necrosis factor receptor family molecule*) (Sakaguchi et al., 2007).

O TGF-  $\beta$  de membrana contendo o peptídeo associado LAP (*latent associated peptide*) está presente em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de camundongos normais. As células que expressam LAP na sua superfície são células Tregs dependentes de TGF- $\beta$  (Oida et al., 2003). Já foi demonstrado que antígenos administrados por via oral podem induzir a produção de células reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Zhang et al., 2001) e que células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> são importantes na imuno-modulação da colite experimental (Oida et al, 2003).

Compatível com o que observamos com relação à produção de TGF- $\beta$  (Fig.12A), camundongos de 53 semanas de idade de todos os grupos apresentaram um aumento significativo no número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em comparação com os animais de 28 e 8 semanas (Fig.15A). Entretanto, com 92 semanas de idade, a produção de TGF- $\beta$  e o número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> estavam altos em todos os grupos, principalmente no grupo salina (Fig.15A).

Em humanos idosos, as células T presentes no sangue periférico apresentam redução da expansão clonal *in vitro* e respondem menos a vacinações (Grubeck-Loebenstein et al., 2009; McElhane and Effros, 2009). Vários trabalhos supõem que, em camundongos idosos (acima de 20 semanas), as alterações funcionais ocorridas com as células T são devidas ao acúmulo de células T de memória, principalmente as que expressam CD44 (Zhao et al., 2007). Na literatura, acredita-se que as células reguladoras de fenótipo Th3 são as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> existentes no sistema imune periférico e que estas são geradas pela ativação com antígenos presentes no intestino. Esses antígenos do intestino sinalizam para os TCRs das células T aumentando as propriedades reguladoras dessas células e iniciando a cascata de sinalização. (Weiner et al., 2011). As células Th3 reguladoras presentes no intestino são importantes agentes imuno-moduladores da mucosa intestinal mantendo a homeostase desse tecido frente ao desafio constante com antígenos (Weiner et al., 2011).

É interessante notar que ocorre um aumento de células T reguladoras (de diferentes fenótipos) no baço e nos LnM (mas não nas placas de Peyer) de camundongos idosos. Duas possibilidades podem explicar esse aumento. A primeira é que essas células T reguladoras, embora aumentadas em número, não são efetivas nos animais senescentes. Esse fenômeno seria análogo ao que ocorre com o aumento dos níveis de imunoglobulinas totais nos animais idosos em paralelo à redução da produção de imunoglobulinas específicas com a idade (Speziali et al, 2009). Outra possibilidade seria que, embora esses animais sejam menos susceptíveis a indução de tolerância oral, o aumento de alguns componentes imuno-reguladores seria importante para manter algum grau de homeostase da mucosa intestinal e de indução de tolerância mediante a utilização de protocolos como a ingestão voluntária. De

fato, camundongos idosos são menos susceptíveis, mas não são totalmente refratários à indução de tolerância oral (Faria et al, 2003; Figs. 6A e 9B).

Em uma segunda parte desse estudo, avaliamos o efeito do envelhecimento na indução da alergia alimentar.

Os avanços feitos em estudos da mucosa intestinal relacionados ao sistema imune nos últimos anos tem sido de extrema importância para a caracterização dos mecanismos responsáveis pela homeostase do intestino.

Ainda são questionados quais seriam os fatores essenciais para a interface saúde e doença. A mucosa intestinal apresenta diversos componentes que a protegem de processos inflamatórios, como o epitélio intestinal, com suas células epiteliais e caliciformes, essenciais na proteção da mucosa, as células M que auxiliam na captação de antígenos, a microbiota, os componentes da dieta, além de um amplo complexo celular imune responsável pelo reconhecimento e eliminação de patógenos provenientes do meio externo (Izcue et al., 2009)

Entretanto, alguns fatores interferem na homeostase do intestino, estimulando processos inflamatórios, gerados devido à presença de patógenos ou a falhas nos mecanismos imunorreguladores da mucosa intestinal ((Brandtzaeg, 2010). Além disso, mecanismos que prejudicam a indução da tolerância oral ou a sua manutenção, propiciam as reações intestinais de hipersensibilidade às proteínas da dieta (Saurer and Mueller, 2009).

Como demonstramos, na primeira parte, que ocorreu uma redução na susceptibilidade à indução de tolerância oral nos camundongos idosos, nesta parte do trabalho, avaliamos os efeitos do envelhecimento nos processos de indução de alergia alimentar. Quando a tolerância oral é deficiente, a ingestão de proteínas da dieta por via oral pode gerar também um tipo de resposta imune inflamatória, a alergia alimentar, que é definida como uma reação de hipersensibilidade do tipo I mediada pela produção de IgE (Brandtzaeg, 2010; Sampson, 1999). Adaptamos o protocolo de indução de alergia alimentar já utilizado por Saldanha e colaboradores (Saldanha et al., 2004) e testamos em camundongos BALB/c jovens (8 semanas) e idosos (53 semanas).

Nosso primeiro passo foi avaliar a hipótese de um aumento na susceptibilidade à indução de alergia alimentar após o processo de envelhecimento. A indução de alergia alimentar a um antígeno está diretamente relacionada à produção de IgE específica (Basso et al., 2003; Helm et al., 2000; Schroeder and Cavacini, 2010). Durante as respostas inflamatórias dos processos alérgicos na mucosa intestinal, os anticorpos IgE séricos se ligam aos mastócitos presentes no intestino, ativando-os, ocasionando sua degranulação e consequente liberação de mediadores inflamatórios (Prussin and Metcalfe, 2003; Sampson, 1999).

Na figura 18, observamos que quando induzimos alergia alimentar nos animais jovens, o grupo tratado oralmente com salina e imunizado posteriormente com Ova associado ao adjuvante  $Al(OH)_3$  e desafiado por via oral com o mesmo antígeno apresentou altos níveis de anticorpos séricos anti-Ova da classe IgE quando comparado ao grupo tolerante (Fig.18). Além disto, observamos claramente que a produção de IgE específica obedeceu a um aumento crescente durante as várias imunizações e desafio com o antígeno.

Por outro lado, nos animais idosos observamos uma baixa produção de anticorpos séricos IgE anti-Ova (Fig.18B). Após o desafio oral com Ova (dia 35), o grupo tratado oralmente com salina com posterior imunização também apresentou maiores níveis de IgE específica em comparação aos demais grupos da mesma idade, porém em intensidade muito menor do que os animais jovens (Fig.18A). Mais que a baixa intensidade, observamos que não houve nenhum crescimento na produção de IgE anti-Ova nesses animais, mesmo após sete dias de desafio oral com o antígeno (Fig. 18B). Ao contrário, a produção de IgE específica nos camundongos idosos foi induzida em baixos níveis e atingiu um ápice que se manteve durante todos os desafios antigênicos posteriores.

Em humanos, reações alérgicas são muitas vezes “encobertas” por diversos fatores gerados pelo declínio das atividades fisiológicas ocorridas durante o envelhecimento (Mohrenschlager and Ring, 2011). Segundo Diesner e colaboradores, o aumento do pH gástrico devido a administração de medicamentos acido-supressivos por idosos provavelmente impedem a sensibilização ao alérgeno (Diesner et al., 2011).

Deste modo, resolvemos avaliar se o envelhecimento interfere nas consequências da alergia alimentar. Trabalhos anteriores demonstraram que camundongos com alergia à ovalbumina evitam a posterior ingestão de solução de clara de ovo (Cara et al., 1994; Cara et al., 1997) e essa aversão ao consumo do alérgeno está relacionada à produção de anticorpos específicos da classe IgE (Andrade, 1999).

De fato, observamos que camundongos jovens alérgicos desenvolveram aversão ao consumo da solução de clara de ovo após a indução de alergia alimentar. A administração oral prévia do antígeno induziu tolerância também a esse parâmetro e não observamos aversão nos animais do grupo tolerante (Fig.19).

Da mesma maneira que houve uma redução na produção de IgE anti-Ova nos animais idosos, não observamos aversão nos animais idosos do grupo alérgico (Fig.19).

De acordo com Saldanha e colaboradores, nesse modelo de alergia alimentar observa-se perda de peso corpóreo após o consumo prolongado de clara de ovo por camundongos BALB/c (Saldanha e cols., 2004). Sendo assim, resolvemos acompanhar o peso dos animais ao longo da indução da tolerância oral e após a indução de alergia alimentar à Ova nos camundongos jovens e nos idosos (Fig.20). Observamos que, em animais jovens alérgicos, houve uma perda significativa de peso corpóreo quando comparados aos animais do grupo tolerante (Fig.20).

Trabalhos já demonstraram que esse emagrecimento não tem como causa a má absorção dos nutrientes provenientes da dieta, uma vez que a mucosa intestinal permanece íntegra (Moreira, 2006). Além disso, os níveis de albumina sérica permanecem inalterados (Moreira, 2006). Saldanha e colaboradores também não associaram essa perda de peso corpóreo a um menor consumo de líquido ou ração (Saldanha, 2006). Segundo Dourado e colaboradores, a redução de tecido adiposo em animais alérgicos está associada a alterações metabólicas como a diminuição de triglicerídeos, glicose sérica, colesterol total e ácidos graxos livres (Dourado et al., 2011). Nos animais idosos alérgicos, também observamos perda de peso corpóreo após o desafio oral com clara de ovo, porém os animais já estavam inicialmente mais

obesos que os jovens e a diferença entre o grupo tolerante idoso e o alérgico não foi significativa (Fig.20).

Uma das características típicas das inflamações alérgicas nas mucosas é a hipersecreção de muco pelas células caliciformes induzida por citocinas como IL-4 e IL-13 (Blanchard et al., 2004). Nesses animais, o número e morfologia dos eosinófilos locais também estão alterados (Schwab et al, 2003).

Até o fim da escrita deste trabalho, infelizmente não conseguimos os resultados morfológicos da mucosa intestinal dos animais idosos, devido a problemas técnicos com as preparações histológicas. Esse processo está em andamento pois esses dados são de fundamental importância para identificar a ocorrência de alergia.

Como os animais jovens tratados com salina, imunizados e desafiados por via oral apresentaram características típicas de animais alérgicos, estes foram considerados como grupo alérgico. A título de comparação, adotamos essa denominação para o grupo de animais idosos tratado com salina, apesar destes não apresentarem características de alergia alimentar.

Nossa próxima avaliação foi observar se ocorreria indução de tolerância oral durante o envelhecimento (Fig.21). Nos animais jovens, observamos pela medida dos níveis séricos de anticorpos da classe IgG1 anti-Ova que a tolerância oral foi induzida com sucesso (Fig. 21). Os níveis de anticorpos séricos IgG1 anti-Ova foram suprimidos no grupo tolerante em comparação com o grupo alérgico (Fig.21). A indução de alergia alimentar no modelo experimental testado em animais jovens não prejudicou o efeito da indução da tolerância oral, mas a acentuou. Porém, apesar de constatarmos também a tolerância oral em alguns pontos do protocolo de indução de alergia em animais idosos (Figs. 18 e 21), a tolerância não é mantida e não houve supressão das respostas de IgE e IgG1 após o desafio oral com Ova nos animais idosos (Fig. 21).

Os anticorpos secretados pelas células B presentes nas mucosas são, na sua grande maioria, da classe IgA (Macpherson et al., 2008; Schroeder and Cavacini, 2010). As relações entre a indução de tolerância oral e a produção de IgA secretória não são ainda muito claras (Faria and Weiner,

2006). Assim, avaliarmos a produção de IgA secretória (S-IgA) na mucosa intestinal (Fig.22) Observamos que, nos animais jovens, os níveis de S-IgA anti-Ova no intestino do grupo tolerante foram suprimidos após a indução de tolerância oral quando comparados aos níveis detectados nos animais do grupo alérgico (Fig.22).

Essa inibição da produção de S-IgA anti-Ova após a indução de tolerância oral também já foi observada em outros trabalhos. Mucida e colaboradores observaram, em modelo experimental de asma alérgica, que a indução de tolerância oral suprime a produção de IgA secretória específica (Mucida et al., 2005).

Por outro lado, após a indução de alergia alimentar, animais do grupo alérgico apresentaram altos níveis de sIgA. Já foi demonstrado que a produção de IgA específica nas fezes aumenta em modelo murino de hipersensibilidade à amendoim (Lee et al., 2010). Kweon e colaboradores observaram um aumento de células secretoras de IgA no intestino grosso em modelo de diarreia de origem alérgica (Kweon et al., 2000). Mucida e colaboradores também observaram que, após a indução de asma experimental em camundongos transgênicos, o grupo alérgico apresenta maiores níveis de IgA secretória que os grupos tolerantes (Mucida e cols., 2005).

Entretanto, nos animais idosos, observamos baixa produção de S-IgA específica ao longo de todo experimento embora os animais do grupo alérgico apresentem níveis mais altos de S-IgA anti-Ova quando comparados aos do grupo tolerante (Fig.22).

A função das células B também está alterada no envelhecimento. A formação de centros germinativos está reduzida e a afinidade dos anticorpos diminuída (e maturação de afinidade) (Nikolich-Zugich, 2005). Alguns estudos mostram um declínio nos níveis de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA nos linfonodos periféricos e de IgA secretória no muco intestinal de animais idosos (Fujihashi and McGhee, 2004). Dados do nosso laboratório mostram que, embora os níveis de sIgA total não se alterem ao longo do envelhecimento, a produção de sIgA específica em animais imunizados está reduzida (Speziali et al, 2009).

Ao avaliarmos os níveis de citocinas produzidas, observamos que nos baços (Fig.23A) e nos linfonodos mesentéricos (Fig.24A) de animais



jovens, a produção de IL-4 no grupo alérgico foi maior quando comparada com a obtida no grupo tolerante ao longo de todo o protocolo de indução de alergia alimentar (dias 7-35). O aumento da produção de IL-4 nos animais imunizados era esperado, pois o hidróxido de alumínio utilizado como adjuvante na imunização primária induz respostas do tipo Th2, com secreção de IgE e IgG1 (Faquim-Mauro and Macedo, 2000).

A IL-4 têm um papel importante em processos alérgicos, pois estimula a troca de isotipo para IgE e de moléculas de adesão no endotélio promovendo o recrutamento de eosinófilos nos processos alérgicos (Corren, 2011).

Nos animais idosos, ocorreu um aumento da produção de IL-4 nos animais não manipulados, provavelmente por ser induzida pelo primeiro contato com o antígeno durante o desafio oral. Observamos ainda que não houve diferenças significativas entre grupo alérgico e tolerante na produção de IL-4 (Fig.23A). Somente nos linfonodos mesentéricos, após a indução de alergia foi possível observar um aumento de IL-4 no grupo alérgico (Fig.24A). A IL-4 é necessária para a ativação de células T CD4+ virgens em células efectoras de memória. Esse processo está muito prejudicado com o envelhecimento (Koga et al., 2000).

Ao analisarmos a produção de IL-5, observamos que nos baços (Fig.23B) e nos linfonodos mesentéricos (Fig.24B) dos animais jovens do grupo tolerante, a produção de IL-5 foi menor quando comparada com a produção de IL-5 obtida no grupo alérgico.

A IL-5 está envolvida na diferenciação e proliferação dos eosinófilos na medula óssea e na sua migração para a mucosa intestinal em modelos murinos de alergia alimentar (Lampinen et al., 2004; Rothenberg and Daeron, 2009). Além disso, a IL-5 tem um papel no aumento da síntese de S-IgA por células B1 e B2 presentes na mucosa intestinal (Lazarus et al., 2003) (Kunkel & Butcher, 2003; Bao e cols., 1998; Brandtzaeg e cols., 1999). A tolerância oral também suprimiu com eficiência a produção de IL-5 nos animais jovens (Figs. 23B a 24B). Já nos animais idosos, a produção de IL-5 estava bastante diminuída nos baços (Fig.23B) e LnM (Fig.24B) sendo detectada em níveis altos apenas após o desafio oral com Ova.

Em conjunto, nossos resultados com a indução de alergia alimentar e de tolerância oral a esse processo em animais jovens e idosos mostram que tanto as respostas inflamatórias (alergia) quanto as imunorreguladoras (tolerância oral) estão comprometidas com o processo do envelhecimento. Em um trabalho recente do nosso laboratório observamos um resultado semelhante em camundongos jovens e idosos infectados com o parasito *Schistosoma mansoni*. Camundongos de 8 semanas de idade (jovens) apresentam granulomas hepáticos grandes na fase aguda da infecção. Na fase crônica, ocorre uma significativa modulação desses granulomas que diminuem de tamanho. Nos animais idosos, tais granulomas são muito menores na fase aguda e estes não sofrem qualquer alteração na fase crônica da infecção (Speziali et al, 2010).

A citocina TGF- $\beta$ , além de estar envolvida na indução da tolerância oral (Faria & Weiner, 2006; Letterio & Roberts, 1998), participa na troca de isotipos para IgA exercendo um papel importante na produção de IgA secretória na mucosa intestinal (Sonoda e cols., 1989; Borsutzky e cols., 2004). Deste modo, analisamos a produção de TGF- $\beta$  no baço (Fig.23C) e linfonodos mesentéricos (Fig.24C) dos animais de todos os grupos, desde o início da indução de tolerância oral até ao final da indução de alergia alimentar.

Nos camundongos jovens, em ambos os órgãos, observamos que a produção de TGF- $\beta$  foi menor no grupo tolerante quando comparada com a produção de TGF- $\beta$  observada nos animais do grupo alérgico (Figs. 23C e 24C). Como mencionado anteriormente, TGF- $\beta$  é uma citocina que tem sido amplamente descrita como sendo importante para a indução da tolerância oral (Faria & Weiner, 2005). Baixas doses de antígenos utilizadas para indução de tolerância oral resultam na ativação de células T regulatórias específicas que agem pela produção de citocinas moduladoras como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-4 (Miller e cols., 1992). Rizzo e colaboradores observaram que em camundongos deficientes em IL-4 apresentam um decréscimo na produção de TGF- $\beta$ . A ausência de IL-4 ou IL-10 resulta em uma redução da produção de TGF- $\beta$  nos linfonodos periféricos (Rizzo e cols., 1999).

A relação entre a supressão mediada pela tolerância oral e a alta produção de TGF- $\beta$  já foi descrita em vários modelos experimentais de

doenças autoimunes (Faria & Weiner, 2005). No nosso modelo, essa correlação não foi observada e o grupo tolerante apresentou níveis menores de TGF- $\beta$  em comparação ao grupo alérgico. Provavelmente, nos animais alérgicos, a produção de TGF- $\beta$  foi estimulada pelo próprio evento inflamatório agindo de forma imunomoduladora, na tentativa de restaurar a homeostase na mucosa intestinal. Nos animais idosos, detectamos baixa produção de TGF- $\beta$  ao longo de todo experimento (Figs. 23C e 24C). Durante o processo de envelhecimento, tanto em camundongos quanto em humanos, limitadas células T são produzidas e exportadas para órgãos linfóides secundários, o que explicaria a baixa produção de TGF- $\beta$  e IL-5 por animais idosos (Linton and Dorshkind, 2004).

Ao avaliarmos a produção de IL-10 pelas células do baço (Fig. 23D) e dos LnMs (Fig.24D) nos animais jovens desde a indução de tolerância oral até o final da indução da alergia alimentar, observamos que, nos dois órgãos, após o tratamento oral, a produção de IL-10 nos animais do grupo tolerante foi menor quando comparada com a produção de IL-10 obtida no grupo alérgico (Figs.23D e 24D). Notamos que, após o tratamento oral, o grupo alérgico apresentou um aumento significativo nos níveis de IL-10 no baço e nos LnMs. Esse resultado também não era esperado, pois o grupo salina não teve contato com o antígeno nesse período.

Em humanos, foi demonstrado que a IL-10 reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-5, por mastócitos suprimindo a ação dos eosinófilos em processos alérgicos (Schandene e cols., 1994), além de inibir a troca de isotipo para IgE pelas células B (Punnonen e cols., 1993).

Provavelmente o papel da IL-10 foi muito maior como elemento anti-inflamatório recrutado pelo próprio processo de alergia. Por isto, sua produção está mais elevada nos animais alérgicos e não nos tolerantes (que não estão inflamados). No modelo de asma experimental, foi demonstrado que os animais alérgicos apresentavam altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$ , assim como uma frequência elevada de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ no lavado brônquio-alveolar, em oposição aos animais tolerantes que não apresentavam esses elementos típicos de eventos imuno-reguladores (Mucida et al., 2005).

A IL-10 é uma citocina produzida por uma variedade de células e tem sido apontada como a principal citocina produzidas por células T

regulatórias (Tr1). (Groux e cols., 1997). IL-10 e o TGF- $\beta$ , concomitantemente com IL-4 e IL-5 também são fatores estimulatórios para a troca de isotipo de IgA na superfície das mucosas (Defrance e cols., 1992; Kunimoto e cols., 1988). Já foi observado em crianças alérgicas a leite que a proporção de células T produtoras de IL-10 são menores comparadas as crianças normais (Scott-Taylor et al., 2005). A sua baixa produção nas placas de Peyer favorece o desenvolvimento de alergia alimentar (Frossard et al., 2004).

Por outro lado, nos animais idosos, após a indução de tolerância oral, observamos altos níveis de IL-10 produzidos no baço tanto no grupo alérgico quanto no grupo tolerante, sem diferenças significativas entre os grupos (Figs. 23D e 24D). Dados recentes do nosso laboratório também mostram que, em camundongos idosos, as células dendríticas dos LnM produzem maior quantidade de IL-10 do que células dendríticas de animais jovens (Santiago et al., 2011).

Vários trabalhos demonstram que a subpopulação de células T CD4+CD25+CD45RB<sup>low</sup> estão relacionadas com a supressão das respostas inflamatórias durante a tolerância oral pela produção de TGF- $\beta$  e IL-10 (Chehade and Mayer, 2005; Sakaguchi et al., 2001).

Neste trabalho, analisamos o número de células CD4+CD25+CD45RB<sup>low</sup> presentes nos baços e linfonodos mesentéricos (Fig.25). Observamos nos animais jovens um número maior de células CD4+CD25+CD45RB<sup>low</sup> nos baços dos animais alérgicos quando comparados com os animais do grupo tolerante. Já nos linfonodos mesentéricos, esse aumento foi observado no grupo tolerante (Fig.25). Nos idosos, observamos um número mais elevado de CD4+CD25+CD45RB<sup>low</sup> tanto no baço quanto nos linfonodos mesentéricos dos animais do grupo alérgico.

Muitos trabalhos já demonstraram que as células T CD4+ expressando CD45RB apresentam funções efetoras e reguladoras, sendo que o nível de expressão de CD45 diferencia essas células em virgens com potencial para células efetoras patogênicas (CD45RB<sup>high</sup>) ou em células T com atividade reguladora (CD45RB<sup>low</sup>) (Powrie et al., 1994); (Maloy and Powrie, 2001). A subpopulação de células CD4+CD25+CD45RB<sup>low</sup> apresenta atividade reguladora em doenças alérgicas em camundongos (Hauet-Broere (Hauet-Broere et al., 2003; Zhang et al., 2001)

No modelo utilizado, mostramos que as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  assim como as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> estão envolvidas em eventos imuno-moduladores estimulados pela reação alérgica (mas não pela tolerância oral) e pelo processo de envelhecimento. Pretendemos estudar, em camundongos BALB/c, a participação de outras células Tregs como potenciais candidatas a mediadores da tolerância oral, possivelmente com a utilização de outros marcadores como LAP e FoxP3.

A partir desses resultados, concluímos que a mucosa intestinal possui diversos mecanismos de regulação que contribuem para que a homeostase local seja preservada. Os processos inflamatórios geralmente não acontecem no intestino devido à indução preferencial de tolerância oral.

Entretanto, para manter sua integridade diante de eventuais processos inflamatórios ou de processo fisiológicos como o envelhecimento, a mucosa recruta rapidamente vários mecanismos regulatórios como S-IgA, citocinas anti-inflamatórias, TGF- $\beta$  e IL-10 e diferentes subpopulações de células T reguladoras.

Avaliamos também o papel do envelhecimento no perfil de outras populações de células reguladoras ativadas no tecido linfóide associado à mucosa intestinal durante a tolerância oral e após a indução de alergia alimentar (Figs. 24, 25 e 26 respectivamente). Para isso, utilizamos camundongos transgênicos DO.11.10 que possuem TCR OVA-específico para Ova. Esse desvio no repertório dos camundongos DO.11.10 facilita a análise da ativação antígeno-específica das células T reguladoras.

Estudos moleculares com células B e T dos órgãos linfóides têm demonstrado a ocorrência de alterações funcionais e nos perfis fenotípicos de células T em humanos e em animais durante o envelhecimento. Estas mudanças incluem a alteração da direção das células de memória CD4<sup>+</sup> de fenótipo CD44<sup>Hi</sup> e CD45<sup>RO</sup>, além de estarem associadas com a redução da proliferação de células T e na produção de citocinas (Maue et al., 2009; Ogra, 2010). Outros trabalhos sugerem que a maioria das respostas antigênicas no envelhecimento são mediadas por células T de memória (Woodland and Blackman, 2006).

Observamos que, mesmo em animais idosos, ocorre a atuação expressiva das células T reguladoras na indução de tolerância oral. No baço,

observamos que a produção de células T reguladoras  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  é baixa com relação às demais populações de células T analisadas (Fig.26 A). Já a produção de  $CD4^+CD25^+LAP^+$  e  $CD4^+CD25^-LAP^+$  estão mais evidentes nos baços dos animais do grupo tolerante no início da indução da alergia alimentar (Fig.26 A). Foram detectados no início da alergia alimentar (Dia 22) números menores de células T  $CD4^+CD25^+LAP$  nos LnM (Fig. 27) e PP (Fig. 28) nos camundongos tolerantes. O fato mais curioso nesses resultados é que após a indução de alergia alimentar (Dia 35), todas as populações de células Tregs analisadas têm seus números reduzidos nos órgãos analisados (Figs.26,27 e 28). Uma provável explicação para isto seria a apoptose dessas células, pois são células T ativadas em animais com um repertório desviado para a reatividade a Ova. Uma estimulação antigênica exagerada de células T ativadas na mucosa pode levá-las à morte (Faria and Weiner, 2005).

Em experimentos utilizando camundongos mutantes, no qual a expressão de FoxP3 é inativada, foi observada a presença de lesões fatais autoimunes e inflamatórias afetando vários órgãos (Littman and Rudensky, 2010). A ausência de células T reguladoras  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  pode causar uma “quebra” na tolerância e estimular o desencadeamento de respostas inflamatórias, o que demonstra que a expressão de FoxP3 nas células T determina sua função supressora (Fontenot and Rudensky, 2005).

No nosso estudo, encontramos um aumento de células T reguladoras  $CD4^+CD25^+FoxP3$  24hs após o início da indução da alergia (dia 22) em todos os órgãos linfóides examinados. Nos LnM e PP observamos maior quantidade de células T reguladoras  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  no grupo imune em comparação ao grupo tolerante.

Experimentos com camundongos demonstram o envolvimento das células T  $CD4^+CD25^+$  reguladoras na indução da tolerância oral (Karlsson et al., 2010). Essas células podem (Curotto de Lafaille et al., 2008) ou não expressar FoxP3 (Boirivant et al., 2008). Trabalhos já demonstraram que camundongos idosos apresentam baixa quantidade de células T  $CD4^+CD25^+$  com efeito supressivo (Zhao et al., 2007).

A presença de grande número de células Treg  $Foxp3^+$  em situações de inflamação não está muito claro na literatura. Apesar de estar estabelecido que as células Treg estão envolvidas em todos os tipos de respostas mediadas

por células T inflamatórias, incluindo aquelas contra à alérgenos (Th2), sua presença em grande número em locais de inflamação crônica (Ruprecht et al., 2005; Saruta et al., 2007) parece ainda um paradoxo. Não está claro por que na inflamação crônica essas Tregs não exercem a sua função supressiva, se elas estão suprimidas ou até mesmo se elas contribuem para a patologia, por exemplo, induzindo a secreção de TGF- $\beta$  que atua na fibrose tecidual (Curotto de Lafaille et al., 2008). No entanto, Strickland e cols. demonstraram, em modelo de asma em ratos, que o número de células Treg está inversamente relacionado com a severidade da inflamação alérgica, indicando que as Tregs modulam a inflamação no pulmão (Strickland et al., 2006). Esses dados sugerem, então, que a presença dessas células T reg em locais inflamados tenha um papel benéfico de controle mínimo da inflamação.

O TGF-  $\beta$  de membrana conhecido como 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 que expressam LAP na sua superfície são células Tregs dependentes de TGF-  $\beta$  (Oida et al., 2003). Alguns estudos já relataram muitas das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> supressoras expressam também LAP na superfície, o que sugere que a expressão LAP/TGF- $\beta$  nas APCs e nas células T CD4<sup>+</sup> é necessária para a geração de células Tregs Foxp3<sup>+</sup> (Andersson et al., 2008; Gandhi et al., 2007). Recentemente a expressão de LAP foi caracterizada como marcador de atividade anti-inflamatória imunomoduladora em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> tanto *in vitro* com *in vivo* (Ali et al., 2008). A indução de células CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> via TGF- $\beta$  talvez seja o mais importante mecanismo da manutenção da tolerância e suas funções supressoras (Andersson et al., 2008). Esses dados podem, então, explicar o grande número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP encontradas no baço do grupo tolerante (Fig.26 B).

Com relação à produção de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, observamos um aumento dessas células, principalmente 24hs após a indução de alergia alimentar (Figs.26D e 27D) em animais dos grupos imune e tolerante.

Alguns trabalhos demonstram que camundongos BALB/c a partir de 3 meses de idade apresentam naturalmente um aumento da produção de células TCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>(Pinchuk and Filipov, 2008). Makita e cols observaram que as células esplênicas CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> migram para a *lamina própria* e suprimem a expansão de células CD4<sup>+</sup>CD45RB e CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> em modelo

experimental de colite (Makita et al., 2007). Esse fato explicaria o baixo número de células CD4+CD44+ no final da indução da tolerância oral nos órgãos analisados.

Inúmeros fatores estão envolvidos na indução da tolerância oral para as grandes quantidades e variedades de alimentos. Qualquer perturbação na homeostase entre antígenos alimentares e a imunidade do intestino pode levar a efeitos diversos na resposta imunológica, incluindo alergia alimentar.

Necessita-se de maiores estudos abrangendo outros aspectos, como o envolvimento de outras citocinas, de outros marcadores, das alterações histológicas da mucosa e das células atuantes em processos inflamatórios para entender melhor a indução da alergia alimentar após o envelhecimento.



## 6. Conclusões

- A indução de resposta imune específica estava inibida pelo processo do envelhecimento;
- A indução de tolerância oral se manteve em camundongos idosos quando estes foram tratados por ingestão voluntária em todas as idades examinadas e, em algumas idades, para o protocolo de gavagem;
- A indução de tolerância oral inibiu mecanismos inflamatórios (IL-4, IL-5 e IL-2) em camundongos jovens e idosos;
- Alguns mecanismos de regulação estavam preservados nos camundongos idosos, tais como a produção de TGF- $\beta$  e de células T reguladoras, principalmente de fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup>;
- A indução de alergia alimentar (avaliada pela medida de IgE e IgG1 séricas anti-Ova, aversão ao consumo de Ova) declinou com o processo do envelhecimento;
- O aumento crescente dos níveis de IgE e IgG1 anti-Ova, e da produção de IL-4 e IL-5 observada nos camundongos jovens durante a indução de alergia alimentar não ocorreu nos animais idosos nos quais todos os parâmetros se encontraram reduzidos a um plateau muito baixo;
- Observamos que em camundongos idosos DO.11.10 a indução da alergia alimentar inibe praticamente todas as subpopulações de células T reguladoras analisadas.
- O processo de envelhecimento afetou tanto as respostas imunes inflamatórias quanto as imunorreguladoras como a tolerância oral.
- Alguns mecanismos reguladores estavam preservados em órgãos linfóides ligados ao intestino (linfonodos mesentéricos e placas de Peyer) e isto pode explicar em parte a manutenção da capacidade dos animais idosos em se tornarem tolerantes quando a administração oral de antígeno é feita por ingestão voluntária, uma forma mais natural de exposição antigênica.

**Tabela 1: O efeito do envelhecimento nos mecanismos de indução de Tolerância Oral.**

↓ Supressão  
 = Sem alterações significativas  
 — Não analisado

| Efeito do Envelhecimento                 | Após a INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA ORAL |            |           |
|--|-----------------------------------|------------|-----------|
|  | BAÇO                              | LnM        | PP        |
| <b>IMUNOGLOBULINAS</b>                   |                                   |            |           |
| Ig Total anti-Ova                        | ↓                                 |            |           |
| IgG1 anti-Ova                            | ↓                                 |            |           |
| IgG2a anti-Ova                           | =                                 |            |           |
| IgAs Total                               | ↓                                 |            |           |
| IgAs anti-Ova                            | ↓                                 |            |           |
| IgE sérica Total                         | ↓                                 |            |           |
| IgE sérica anti-Ova                      | ↓                                 |            |           |
| <b><u>MECANISMOS INFLAMATÓRIOS</u></b>   | <b>BAÇO</b>                       | <b>LnM</b> | <b>PP</b> |
| IL-4                                     | ↓                                 | =          | =         |
| IL-5                                     | ↓                                 | —          | —         |
| TNF- $\alpha$                            | =                                 | =          | ↓         |
| IL-2                                     | ↓                                 | ↓          | ↑         |
| <b><u>MECANISMOS REGULADORES</u></b>     |                                   |            |           |
| IL-10                                    | ↓                                 | =          | =         |
| TGF- $\beta$                             | ↑                                 | ↑          | ↑         |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 | ↓                                 | ↑          | ↑         |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> LAP   | ↑                                 | ↑          | —         |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> LAP   | =                                 | ↑          | —         |

**Tabela 2: O efeito do envelhecimento nos mecanismos de indução da Alergia Alimentar.**

↓ Supressão  
 = Sem alterações significativas  
 — Não analisado

| Efeito do Envelhecimento                                 | Após a indução DE ALERGIA ALIMENTAR |                 |                |                 |
|--|-------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|
|  | JOVEM ALÉRGICO                      | JOVEM TOLERANTE | IDOSO ALÉRGICO | IDOSO TOLERANTE |
| <u>CARACTERÍSTICAS DA ALERGIA</u>                        |                                     |                 |                |                 |
| IgE anti-Ova   | ↑                                   | ↓               | =              | =               |
| AVERSÃO À OVA  | ↑                                   | =               | =              | =               |
| PESO CORPÓREO  | ↓                                   | ↑               | ↓              | ↓               |
| <u>TOLERÂNCIA ORAL</u>                                   |                                     |                 |                |                 |
| IgG1 sérica anti-ova                                     | ↑                                   | ↓               | ↑              | ↑               |
| IgAs anti-Ova  | ↑                                   | ↓               | ↑              | ↓               |
| <u>CITOCINAS</u>   | <b>BAÇO</b>                         |                 |                |                 |
| IL-4   | ↑                                   | ↑               | ↑              | =               |
| IL-5   | ↑                                   | =               | ↑              | =               |
| TGF-β  | ↑                                   | ↑               | =              | ↑               |
| IL-10  | ↑                                   | ↓               | ↓              | ↓               |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup> | ↑                                   | ↓               | ↑              | ↓               |
|  | <b>LnM</b>                          |                 |                |                 |
| IL-4   | ↑                                   | ↑               | ↑              | =               |
| IL-5   | ↑                                   | =               | ↑              | ↑               |
| TGF-β  | ↑                                   | ↑               | ↑              | ≠               |
| IL-10  | ↑                                   | =               | ↑              | ↑               |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup> | ↓                                   | ↑               | ↑              | ↓               |

**Tabela 3: O efeito do envelhecimento na indução da Alergia Alimentar em animais transgênicos para a Ova.**

↓ Supressão  
 = Sem alterações significativas  
 \_\_ Não analisado

| EFEITO DO ENVELHECIMENTO                           | Após a indução de Alergia Alimentar EM CAMUNDONGOS DO.11.10 idosos |           |        |           |        |           |
|--|--|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
|  | BAÇO   |           | LnM    |           | PP     |           |
|  | SALINA   | TOLERANTE | SALINA | TOLERANTE | SALINA | TOLERANTE |
| Células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 | ↓  | ↓         | ↓      | ↓         | ↓      | ↓         |
| Células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> LAP   | ↓  | ↓         | ↓      | ↓         | ↓      | ↓         |
| Células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> LAP   | ↓  | ↓         | ↑      | ↓         | =      | ↓         |
| Células T CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>       | ↓  | ↓         | ↓      | ↓         | ↓      | ↓         |

# 1. Referências

1. Afuwape, A.O., M.W. Turner, and S. Strobel. 2004. Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clin Exp Immunol.* 136:40-48.
2. Agius, E., K.E. Lacy, M. Vukmanovic-Stejic, A.L. Jagger, A.P. Papageorgiou, S. Hall, J.R. Reed, S.J. Curnow, J. Fuentes-Duculan, C.D. Buckley, M. Salmon, L.S. Taams, J. Krueger, J. Greenwood, N. Klein, M.H. Rustin, and A.N. Akbar. 2009. Decreased TNF-alpha synthesis by macrophages restricts cutaneous immunosurveillance by memory CD4+ T cells during aging. *J Exp Med.* 206:1929-1940.
3. Ali, N.A., A.A. Gaughan, C.G. Orosz, C.P. Baran, S. McMaken, Y. Wang, T.D. Eubank, M. Hunter, F.J. Lichtenberger, N.A. Flavahan, J. Lawler, and C.B. Marsh. 2008. Latency associated peptide has in vitro and in vivo immune effects independent of TGF-beta1. *PloS one.* 3:e1914.
4. Anderson, J.A. 1997. Milk, eggs and peanuts: food allergies in children. *American family physician.* 56:1365-1374.
5. Andersson, J., D.Q. Tran, M. Pesu, T.S. Davidson, H. Ramsey, J.J. O'Shea, and E.M. Shevach. 2008. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 205:1975-1981.
6. Ando, T., K. Hatsushika, M. Wako, T. Ohba, K. Koyama, Y. Ohnuma, R. Katoh, H. Ogawa, K. Okumura, J. Luo, T. Wyss-Coray, and A. Nakao. 2007. Orally administered TGF-beta is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol.* 120:916-923.
7. Andrade, M.C. 1999. Participação do processo anafilático na aversão à ingestão de clara de ovo por animais imunizados com ovalbumina. . *In Departamento de Bioquímica e Imunologia.* UFMG, Belo Horizonte.
8. Andrade, M.C., N.M. Vaz, and A.M. Faria. 2003. Ethanol-induced colitis prevents oral tolerance induction in mice. *Braz J Med Biol Res.* 36:1227-1232.
9. Apodaca, G., M. Bomsel, J. Arden, P.P. Breitfeld, K. Tang, and K.E. Mostov. 1991. The polymeric immunoglobulin receptor. A model protein to study transcytosis. *J Clin Invest.* 87:1877-1882.
10. Aringer, M., and J.S. Smolen. 2008. Efficacy and safety of TNF-blocker therapy in systemic lupus erythematosus. *Expert opinion on drug safety.* 7:411-419.
11. Arranz, E., S. O'Mahony, J.R. Barton, and A. Ferguson. 1992. Immunosenescence and mucosal immunity: significant effects of old age on secretory IgA concentrations and intraepithelial lymphocyte counts. *Gut.* 33:882-886.
12. Artenstein, A.W., T.C. VanCott, K.V. Sitz, M.L. Robb, K.F. Wagner, S.C. Veit, A.F. Rogers, R.P. Garner, J.W. Byron, P.R. Burnett, and D.L. Birx. 1997. Mucosal immune responses in four distinct compartments of women infected with human

- immunodeficiency virus type 1: a comparison by site and correlation with clinical information. *The Journal of infectious diseases*. 175:265-271.
13. Astwood, J.D., J.N. Leach, and R.L. Fuchs. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol*. 14:1269-1273.
  14. Baggi, F., F. Andreetta, E. Caspani, M. Milani, R. Longhi, R. Mantegazza, F. Cornelio, and C. Antozzi. 1999. Oral administration of an immunodominant T-cell epitope downregulates Th1/Th2 cytokines and prevents experimental myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 104:1287-1295.
  15. Bashir, M.E., S. Louie, H.N. Shi, and C. Nagler-Anderson. 2004. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol*. 172:6978-6987.
  16. Basso, A.S., F.A. Pinto, M. Russo, L.R. Britto, L.C. de Sa-Rocha, and J. Palermo Neto. 2003. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *Journal of neuroimmunology*. 140:69-77.
  17. Bengtsson, U., T.W. Knutson, L. Knutson, A. Dannaeus, R. Hallgren, and S. Ahlstedt. 1997. Eosinophil cationic protein and histamine after intestinal challenge in patients with cow's milk intolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 100:216-221.
  18. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441:235-238.
  19. Bienenstock, J., and M.R. McDermott. 2005. Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunol Rev*. 206:22-31.
  20. Bilsborough, J., and J.L. Viney. 2004. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology*. 127:300-309.
  21. Bischoff, S.C., J. Mayer, J. Wedemeyer, P.N. Meier, G. Zeck-Kapp, B. Wedi, A. Kapp, Y. Cetin, M. Gebel, and M.P. Manns. 1997. Colonoscopic allergen provocation (COLAP): a new diagnostic approach for gastrointestinal food allergy. *Gut*. 40:745-753.
  22. Bischoff, S.C., J.H. Mayer, and M.P. Manns. 2000. Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol*. 121:270-283.
  23. Blanchard, C., S. Durual, M. Estienne, K. Bouzakri, M.H. Heim, N. Blin, and J.C. Cuber. 2004. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol*. 172:3775-3783.
  24. Blumberg, R.S., L.J. Saubermann, and W. Strober. 1999. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Current opinion in immunology*. 11:648-656.
  25. Boirivant, M., A. Amendola, A. Butera, M. Sanchez, L. Xu, M. Marinaro, A. Kitani, C. Di Giacinto, W. Strober, and I.J. Fuss. 2008. A transient breach in the epithelial barrier leads to regulatory T-cell generation and resistance to experimental colitis. *Gastroenterology*. 135:1612-1623 e1615.

26. Bollinger, R.R., M.L. Everett, S.D. Wahl, Y.H. Lee, P.E. Orndorff, and W. Parker. 2006. Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili. *Molecular immunology*. 43:378-387.
27. Brandtzaeg, P. 1996. The B-cell development in tonsillar lymphoid follicles. *Acta Otolaryngol Suppl*. 523:55-59.
28. Brandtzaeg, P. 2010. Food allergy: separating the science from the mythology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 7:380-400.
29. Brandtzaeg, P., I.N. Farstad, F.E. Johansen, H.C. Morton, I.N. Norderhaug, and T. Yamanaka. 1999. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev*. 171:45-87.
30. Brandtzaeg, P., F.L. Jahnsen, and I.N. Farstad. 1996. Immune functions and immunopathology of the mucosa of the upper respiratory pathways. *Acta Otolaryngol*. 116:149-159.
31. Busse, P.J., and S.K. Mathur. 2010. Age-related changes in immune function: effect on airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 126:690-699; quiz 700-691.
32. Cara, D.C. 1995. Mudança de preferência a sabores induzida imunologicamente em camundongos. In Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo. 100pp.
33. Cara, D.C., A.A. Conde, and N.M. Vaz. 1994. Immunological induction of flavor aversion in mice. *Braz J Med Biol Res*. 27:1331-1341.
34. Cara, D.C., A.A. Conde, and N.M. Vaz. 1997. Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scand J Immunol*. 45:16-20.
35. Carlson, M.E., M.J. Conboy, M. Hsu, L. Barchas, J. Jeong, A. Agrawal, A.J. Mikels, S. Agrawal, D.V. Schaffer, and I.M. Conboy. 2009. Relative roles of TGF-beta1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell*. 8:676-689.
36. Chahine, B.G., and S.L. Bahna. 2010. The role of the gut mucosal immunity in the development of tolerance versus development of allergy to food. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 10:394-399.
37. Challacombe, S.J., and T.B. Tomasi, Jr. 1980. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J Exp Med*. 152:1459-1472.
38. Chehade, M., and L. Mayer. 2005. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*. 115:3-12; quiz 13.
39. Chen, X., M. Baumel, D.N. Mannel, O.M. Howard, and J.J. Oppenheim. 2007. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol*. 179:154-161.
40. Chen, Y., J. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V.K. Kuchroo, and H.L. Weiner. 1995. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. 376:177-180.

41. Chen, Y., J. Inobe, and H.L. Weiner. 1997. Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model. *Cell Immunol.* 178:62-68.
42. Chen, Y., and Y. Ma. 2002. Roles of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 in the inductive phase of oral tolerance. *Immunology.* 105:171-180.
43. Chung, Y., S.H. Lee, D.H. Kim, and C.Y. Kang. 2005. Complementary role of CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in oral tolerance. *J Leukoc Biol.* 77:906-913.
44. Coeffier, E., D. Joseph, and B.B. Vargaftig. 1994. Role of interleukin-5 in enhanced migration of eosinophils from airways of immunized guinea-pigs. *British journal of pharmacology.* 113:749-756.
45. Coombes, J.L., K.R. Siddiqui, C.V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C.M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 204:1757-1764.
46. Corren, J. 2011. Cytokine inhibition in severe asthma: current knowledge and future directions. *Current opinion in pulmonary medicine.* 17:29-33.
47. Curotto de Lafaille, M.A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee, and J.J. Lafaille. 2008. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity.* 29:114-126.
48. Czesnikiewicz-Guzik, M., W.W. Lee, D. Cui, Y. Hiruma, D.L. Lamar, Z.Z. Yang, J.G. Ouslander, C.M. Weyand, and J.J. Goronzy. 2008. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol.* 127:107-118.
49. de Faria, A.M., S.M. Ficker, E. Speziali, J.S. Menezes, B. Stransky, V. Silva Rodrigues, and N.M. Vaz. 1998. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev.* 102:67-80.
50. Dejaco, C., C. Duftner, and M. Schirmer. 2006. Are regulatory T-cells linked with aging? *Exp Gerontol.* 41:339-345.
51. Diesner, S.C., E. Untersmayr, P. Pietschmann, and E. Jensen-Jarolim. 2011. Food allergy: only a pediatric disease? *Gerontology.* 57:28-32.
52. Dorshkind, K., E. Montecino-Rodriguez, and R.A. Signer. 2009. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol.* 9:57-62.
53. Dourado, L.P. 2006. Participação das citocinas na aversão e alergia alimentar induzida à Ovalbumina em camundongos. In Departamento de Patologia Geral. UFMG, Belo Horizonte.
54. Dourado, L.P., L. Noviello Mde, D.M. Alvarenga, Z. Menezes, D.A. Perez, N.V. Batista, G.B. Menezes, A.V. Ferreira, G. Souza Dda, and D.C. Cara. 2011. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cell Immunol.* 270:198-206.



55. Faquim-Mauro, E.L., and M.S. Macedo. 2000. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Int Immunol.* 12:1733-1740.
56. Faria, A.M., S.M. Ficker, E. Speziali, J.S. Menezes, B. Stransky, B.A. Verdolin, W.M. Lahmann, V.S. Rodrigues, and N.M. Vaz. 1998. Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Braz J Med Biol Res.* 31:35-48.
57. Faria, A.M., G. Garcia, M.J. Rios, C.L. Michalaros, and N.M. Vaz. 1993. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology.* 78:147-151.
58. Faria, A.M., R. Maron, S.M. Ficker, A.J. Slavin, T. Spahn, and H.L. Weiner. 2003. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 20:135-145.
59. Faria, A.M., and H.L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 206:232-259.
60. Faria, A.M., and H.L. Weiner. 2006a. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 5:179-190.
61. Faria, A.M., and H.L. Weiner. 2006b. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol.* 13:143-157.
62. Fernandes, R.M. 2007. Estudo da relação entre indução de tolerância oral e produção de IgA secretória em modelo experimental murino de alergia alimentar. *In Departamento de Bioquímica e Imunologia.* UFMG, Balo Horizonte.
63. Fleischer, D.M., S.A. Bock, G.C. Spears, C.G. Wilson, N.K. Miyazawa, M.C. Gleason, E.A. Gyorkos, J.R. Murphy, D. Atkins, and D.Y. Leung. 2011. Oral food challenges in children with a diagnosis of food allergy. *The Journal of pediatrics.* 158:578-583 e571.
64. Fontenot, J.D., and A.Y. Rudensky. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* 6:331-337.
65. Frasca, D., A.M. Landin, R.L. Riley, and B.B. Blomberg. 2008. Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J Immunol.* 180:2741-2746.
66. Frossard, C.P., L. Tropaia, C. Hauser, and P.A. Eigenmann. 2004. Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 113:958-964.
67. Fujihashi, K., and H. Kiyono. 2009. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol.* 30:334-343.
68. Fujihashi, K., and J.R. McGhee. 2004. Mucosal immunity and tolerance in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 125:889-898.

69. Fujihashi, K., J.R. McGhee, M. Yamamoto, T. Hiroi, and H. Kiyono. 1996. Role of gamma delta T cells in the regulation of mucosal IgA response and oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 778:55-63.
70. Gaboriau-Routhiau, V., and M.C. Moreau. 1996. Gut flora allows recovery of oral tolerance to ovalbumin in mice after transient breakdown mediated by cholera toxin or Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Pediatr Res.* 39:625-629.
71. Gallichan, W.S., R.N. Woolstencroft, T. Guarasci, M.J. McCluskie, H.L. Davis, and K.L. Rosenthal. 2001. Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract. *J Immunol.* 166:3451-3457.
72. Gandhi, R., D.E. Anderson, and H.L. Weiner. 2007. Cutting Edge: Immature human dendritic cells express latency-associated peptide and inhibit T cell activation in a TGF-beta-dependent manner. *J Immunol.* 178:4017-4021.
73. Garside, P., M. Steel, F.Y. Liew, and A.M. Mowat. 1995. CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. *Int Immunol.* 7:501-504.
74. Gelfand, E.W., A. Joetham, Z.H. Cui, A. Balhorn, K. Takeda, C. Taube, and A. Dakhama. 2004. Induction and maintenance of airway responsiveness to allergen challenge are determined at the age of initial sensitization. *J Immunol.* 173:1298-1306.
75. Gershon, R.K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 18:723-737.
76. Gill, N., M. Wlodarska, and B.B. Finlay. 2010. The future of mucosal immunology: studying an integrated system-wide organ. *Nat Immunol.* 11:558-560.
77. Gomez, P.A., and R.L. Cabrini. 2004. Anatomic variations of the root canal of the rat according to age. *Acta Odontol Latinoam.* 17:39-42.
78. Gonnella, P.A., H.P. Waldner, and H.L. Weiner. 2001. B cell-deficient (mu MT) mice have alterations in the cytokine microenvironment of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) and a defect in the low dose mechanism of oral tolerance. *J Immunol.* 166:4456-4464.
79. Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2000. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 12:171-181.
80. Grdic, D., E. Hornquist, M. Kjerrulf, and N.Y. Lycke. 1998. Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8+ T cells in the normal gut mucosa. *J Immunol.* 160:754-762.
81. Grubeck-Loebenstein, B., S. Della Bella, A.M. Iorio, J.P. Michel, G. Pawelec, and R. Solana. 2009. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly. *Ageing clinical and experimental research.* 21:201-209.
82. Hamada, H., T. Hiroi, Y. Nishiyama, H. Takahashi, Y. Masunaga, S. Hachimura, S. Kaminogawa, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, H. Kiyono, H. Yamamoto, and H. Ishikawa. 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol.* 168:57-64.

83. Hanson, D.G. 1981. Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns. *J Immunol.* 127:1518-1524.
84. Hasegawa, A., T. Miki, H. Hosokawa, M.B. Hossain, C. Shimizu, K. Hashimoto, M.Y. Kimura, M. Yamashita, and T. Nakayama. 2006. Impaired GATA3-dependent chromatin remodeling and Th2 cell differentiation leading to attenuated allergic airway inflammation in aging mice. *J Immunol.* 176:2546-2554.
85. Haskins, K., R. Kubo, J. White, M. Pigeon, J. Kappler, and P. Marrack. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 157:1149-1169.
86. Hasler, P., and M. Zouali. 2005. Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol.* 233:102-108.
87. Hauet-Broere, F., W.W. Unger, J. Garssen, M.A. Hoiyer, G. Kraal, and J.N. Samsom. 2003. Functional CD25- and CD25+ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur J Immunol.* 33:2801-2810.
88. Helm, R.M., G. Cockrell, C. Connaughton, C.M. West, E. Herman, H.A. Sampson, G.A. Bannon, and A.W. Burks. 2000. Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m Bd 30K. *J Allergy Clin Immunol.* 105:378-384.
89. Hirahara, K., T. Hisatsune, K. Nishijima, H. Kato, O. Shiho, and S. Kaminogawa. 1995. CD4+ T cells anergized by high dose feeding establish oral tolerance to antibody responses when transferred in SCID and nude mice. *J Immunol.* 154:6238-6245.
90. Hogan, S.P., and M.E. Rothenberg. 2008. Dietary allergenic proteins and intestinal immunity: a shift from oral tolerance to sensitization. *Clin Exp Allergy.* 38:229-232.
91. Hooper, L.V., and A.J. Macpherson. 2001. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 10:159-169.
92. Hori, S., T. Takahashi, and S. Sakaguchi. 2003. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol.* 81:331-371.
93. Hornquist, E., D. Grdic, T. Mak, and N. Lycke. 1996. CD8-deficient mice exhibit augmented mucosal immune responses and intact adjuvant effects to cholera toxin. *Immunology.* 87:220-229.
94. Husby, S., J. Mestecky, Z. Moldoveanu, S. Holland, and C.O. Elson. 1994. Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J Immunol.* 152:4663-4670.
95. IBGE. 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. *In Censo 2010.* M.d. Educação, editor.
96. Iliev, I.D., E. Mileti, G. Matteoli, M. Chieppa, and M. Rescigno. 2009. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol.* 2:340-350.
97. Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie. 2009. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.* 27:313-338.

98. Jacob, C.O., S. Aiso, S.A. Michie, H.O. McDevitt, and H. Acha-Orbea. 1990. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:968-972.
99. Jarvinen, K.M., S.T. Laine, A.L. Jarvenpaa, and H.K. Suomalainen. 2000. Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr Res.* 48:457-462.
100. Johansen, F.E., I. Natvig Norderhaug, M. Roe, I. Sandlie, and P. Brandtzaeg. 1999. Recombinant expression of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin. *Eur J Immunol.* 29:1701-1708.
101. Johansson, S.G., J.O. Hourihane, J. Bousquet, C. Brujnzeel-Koomen, S. Dreborg, T. Haahtela, M.L. Kowalski, N. Mygind, J. Ring, P. van Cauwenberge, M. van Hage-Hamsten, and B. Wuthrich. 2001. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy.* 56:813-824.
102. Kang, I., M.S. Hong, H. Nolasco, S.H. Park, J.M. Dan, J.Y. Choi, and J. Craft. 2004. Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J Immunol.* 173:673-681.
103. Kanny, G. 2001. [Food allergy]. *Allergie et immunologie.* 33:351-356.
104. Karlsson, M.R., F.E. Johansen, H. Kahu, A. Macpherson, and P. Brandtzaeg. 2010. Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system. *Allergy.* 65:561-570.
105. Kato, H., K. Fujihashi, R. Kato, T. Dohi, Y. Hagiwara, K. Kataoka, R. Kobayashi, and J.R. McGhee. 2003. Lack of oral tolerance in aging is due to sequential loss of Peyer's patch cell interactions. *Int Immunol.* 15:145-158.
106. Kato, H., K. Fujihashi, R. Kato, Y. Yuki, and J.R. McGhee. 2001. Oral tolerance revisited: prior oral tolerization abrogates cholera toxin-induced mucosal IgA responses. *J Immunol.* 166:3114-3121.
107. Kearney, E.R., K.A. Pape, D.Y. Loh, and M.K. Jenkins. 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity.* 1:327-339.
108. Kim, P.H., and M.F. Kagnoff. 1990. Transforming growth factor-beta 1 is a costimulator for IgA production. *J Immunol.* 144:3411-3416.
109. Kita, H., and G.J. Gleich. 1996. Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation. *J Exp Med.* 183:2421-2426.
110. Knippels, L.M., A.H. Penninks, J.J. Smit, and G.F. Houben. 1999. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicology and applied pharmacology.* 156:161-169.
111. Knutson, T.W., U. Bengtsson, A. Dannaeus, S. Ahlstedt, G. Stalenheim, R. Hallgren, and L. Knutson. 1993. Intestinal reactivity in allergic and nonallergic

- patients: an approach to determine the complexity of the mucosal reaction. *J Allergy Clin Immunol.* 91:553-559.
112. Koga, T., J.R. McGhee, H. Kato, R. Kato, H. Kiyono, and K. Fujihashi. 2000. Evidence for early aging in the mucosal immune system. *J Immunol.* 165:5352-5359.
  113. Kweon, M.N., M. Yamamoto, M. Kajiki, I. Takahashi, and H. Kiyono. 2000. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *J Clin Invest.* 106:199-206.
  114. Lacy, P., F. Levi-Schaffer, S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S.C. Hagen, J. Velazquez, A.B. Kay, and R. Moqbel. 1998. Intracellular localization of interleukin-6 in eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma. *Blood.* 91:2508-2516.
  115. Lahmann, W.M., J.S. Menezes, B.A. Verdolin, and N.M. Vaz. 1992. Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. *Braz J Med Biol Res.* 25:813-821.
  116. Lamont, A.G., M. Gordon, and A. Ferguson. 1987a. Oral tolerance in protein-deprived mice. I. Profound antibody tolerance but impaired DTH tolerance after antigen feeding. *Immunology.* 61:333-337.
  117. Lamont, A.G., M. Gordon, and A. Ferguson. 1987b. Oral tolerance in protein-deprived mice. II. Evidence of normal 'gut processing' of ovalbumin, but suppressor cell deficiency, in deprived mice. *Immunology.* 61:339-343.
  118. Lampinen, M., M. Carlson, L.D. Hakansson, and P. Venge. 2004. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 59:793-805.
  119. Lazarus, N.H., E.J. Kunkel, B. Johnston, E. Wilson, K.R. Youngman, and E.C. Butcher. 2003. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J Immunol.* 170:3799-3805.
  120. Lee, J.H., G. Noh, J. Noh, S. Lee, W.S. Choi, H.S. Kim, K. Lee, S. Choi, H. Jin, and S. Cho. 2010. Clinical characteristics of oral tolerance induction of IgE-mediated and non-IgE-mediated food allergy using interferon gamma. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies.* 31:e39-e47.
  121. Lee, W.T., and E.S. Vitetta. 1990. Limiting dilution analysis of CD45Rhi and CD45Rlo T cells: further evidence that CD45Rlo cells are memory cells. *Cell Immunol.* 130:459-471.
  122. Lee, W.T., X.M. Yin, and E.S. Vitetta. 1990. Functional and ontogenetic analysis of murine CD45Rhi and CD45Rlo CD4+ T cells. *J Immunol.* 144:3288-3295.
  123. Lim, C.S., S. Zheng, Y.S. Kim, C. Ahn, J.S. Han, S. Kim, J.S. Lee, D.W. Chae, J.R. Koo, R.W. Chun, and J.W. Noh. 2001. Th1/Th2 predominance and proinflammatory cytokines determine the clinicopathological severity of IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association.* 16:269-275.

124. Linton, P.J., and K. Dorshkind. 2004. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 5:133-139.
125. Listi, F., G. Candore, M.A. Modica, M. Russo, G. Di Lorenzo, M. Esposito-Pellitteri, G. Colonna-Romano, A. Aquino, M. Bulati, D. Lio, C. Franceschi, and C. Caruso. 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.
126. Littman, D.R., and A.Y. Rudensky. 2010. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell.* 140:845-858.
127. Lopez-Exposito, I., Y. Song, K.M. Jarvinen, K. Srivastava, and X.M. Li. 2009. Maternal peanut exposure during pregnancy and lactation reduces peanut allergy risk in offspring. *J Allergy Clin Immunol.* 124:1039-1046.
128. Lorenz, H.M. 2003. T-cell-activation inhibitors in rheumatoid arthritis. *BioDrugs.* 17:263-270.
129. Lucey, D.R., A. Nicholson-Weller, and P.F. Weller. 1989. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:1348-1351.
130. Macdonald, T.T., and G. Monteleone. 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science.* 307:1920-1925.
131. Macpherson, A.J., K.D. McCoy, F.E. Johansen, and P. Brandtzaeg. 2008. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1:11-22.
132. Majamaa, H., P. Moisiö, K. Holm, H. Kautiainen, and K. Turjanmaa. 1999. Cow's milk allergy: diagnostic accuracy of skin prick and patch tests and specific IgE. *Allergy.* 54:346-351.
133. Makita, S., T. Kanai, Y. Nemoto, T. Totsuka, R. Okamoto, K. Tsuchiya, M. Yamamoto, H. Kiyono, and M. Watanabe. 2007. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol.* 178:4937-4946.
134. Maloy, K.J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2:816-822.
135. Mansueto, P., G. Montalto, M.L. Pacor, M. Esposito-Pellitteri, V. Ditta, C. Lo Bianco, S.M. Leto-Barone, and G. Di Lorenzo. 2006. Food allergy in gastroenterologic diseases: Review of literature. *World journal of gastroenterology : WJG.* 12:7744-7752.
136. Mathur, S.K., E.A. Schwantes, N.N. Jarjour, and W.W. Busse. 2008. Age-related changes in eosinophil function in human subjects. *Chest.* 133:412-419.
137. Maue, A.C., E.J. Yager, S.L. Swain, D.L. Woodland, M.A. Blackman, and L. Haynes. 2009. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol.* 30:301-305.

138. McCabe, M., R.A. Lyons, P. Hodgson, G. Griffiths, and R. Jones. 2001. Management of peanut allergy. *Lancet*. 357:1531-1532.
139. McElhaney, J.E., and R.B. Effros. 2009. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Current opinion in immunology*. 21:418-424.
140. McHugh, R.S., and E.M. Shevach. 2002. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 110:693-702.
141. McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, and M.C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 16:311-323.
142. Melamed, D., J. Fishman-Lovell, Z. Uni, H.L. Weiner, and A. Friedman. 1996. Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. *Int Immunol*. 8:717-724.
143. Mellman, I., and R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 106:255-258.
144. Menezes, J.S., D.S. Mucida, D.C. Cara, J.I. Alvarez-Leite, M. Russo, N.M. Vaz, and A.M. de Faria. 2003. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol*. 15:447-455.
145. Miller, A., O. Lider, A.B. Roberts, M.B. Sporn, and H.L. Weiner. 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:421-425.
146. Min, H., E. Montecino-Rodriguez, and K. Dorshkind. 2006. Effects of aging on the common lymphoid progenitor to pro-B cell transition. *J Immunol*. 176:1007-1012.
147. Mohrenschlager, M., and J. Ring. 2011. Food allergy: an increasing problem for the elderly. *Gerontology*. 57:33-36.
148. Moreira, L.T. 2006. Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar. In Departamento de Patologia Geral. UFMG, ICB.
149. Mowat, A.M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 3:331-341.
150. Mowat, A.M., S. Strobel, H.E. Drummond, and A. Ferguson. 1982. Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology*. 45:105-113.
151. Mucida, D., N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J.J. Lafaille, and M.A. Curotto de Lafaille. 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 115:1923-1933.

152. Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 317:256-260.
153. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 194:629-644.
154. Neish, A.S., A.T. Gewirtz, H. Zeng, A.N. Young, M.E. Hobert, V. Karmali, A.S. Rao, and J.L. Madara. 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination. *Science*. 289:1560-1563.
155. Nikolich-Zugich, J. 2005. T cell aging: naive but not young. *J Exp Med*. 201:837-840.
156. Noverr, M.C., and G.B. Huffnagle. 2005. The 'microflora hypothesis' of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*. 35:1511-1520.
157. Ogra, P.L. 2009. Developmental aspects of the mucosal immune system: role of external environment, mucosal microflora and milk. *Adv Exp Med Biol*. 639:41-56.
158. Ogra, P.L. 2010. Ageing and its possible impact on mucosal immune responses. *Ageing Res Rev*. 9:101-106.
159. Ohkawara, Y., K.G. Lim, Z. Xing, M. Glibetic, K. Nakano, J. Dolovich, K. Croitoru, P.F. Weller, and M. Jordana. 1996. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest*. 97:1761-1766.
160. Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and H.L. Weiner. 2003. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RB<sup>high</sup>-induced colitis by a TGF- $\beta$ -dependent mechanism. *J Immunol*. 170:2516-2522.
161. Otten, M.A., and M. van Egmond. 2004. The Fc receptor for IgA (Fc $\alpha$ RI, CD89). *Immunol Lett*. 92:23-31.
162. Paschoal, P.O., S.M. Campos, M.M. Pedruzzi, V. Garrido, M. Bisso, D.M. Antunes, A.F. Nobrega, and G. Teixeira. 2009. Food allergy/hypersensitivity: antigenicity or timing? *Immunobiology*. 214:269-278.
163. Peterson, D.A., N.P. McNulty, J.L. Guruge, and J.I. Gordon. 2007. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell host & microbe*. 2:328-339.
164. Pfister, G., and W. Savino. 2008. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. *Neuroimmunomodulation*. 15:351-364.
165. Pinchuk, L.M., and N.M. Filipov. 2008. Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immunity & ageing : I & A*. 5:1.



166. Powrie, F., R. Correa-Oliveira, S. Mauze, and R.L. Coffman. 1994. Regulatory interactions between CD45RB<sup>high</sup> and CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med.* 179:589-600.
167. Prussin, C., and D.D. Metcalfe. 2003. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S486-494.
168. Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 118:229-241.
169. Rangel-Moreno, J., L. Hartson, C. Navarro, M. Gaxiola, M. Selman, and T.D. Randall. 2006. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 116:3183-3194.
170. Rescigno, M., and P. Borrow. 2001. The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell.* 106:267-270.
171. Rescigno, M., U. Lopatin, and M. Chieppa. 2008. Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance. *Current opinion in immunology.* 20:669-675.
172. Rios, M.J., M.A. Pereira, L.M. Lopes, A.M. Faria, C.M. Gontijo, E.B. Castanheira, and N.M. Vaz. 1988. Tolerance induction and immunological priming initiated by mucosal contacts with protein antigens in inbred strains of mice. *Braz J Med Biol Res.* 21:825-836.
173. Rizzo, L.V., R.A. Morawetz, N.E. Miller-Rivero, R. Choi, B. Wiggert, C.C. Chan, H.C. Morse, 3rd, R.B. Nussenblatt, and R.R. Caspi. 1999. IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J Immunol.* 162:2613-2622.
174. Rothenberg, M.E., and M. Daeron. 2009. Hypersensitivity and allergy: from mice to men. *Current opinion in immunology.* 21:658-659.
175. Rothenberg, M.E., A. Mishra, E.B. Brandt, and S.P. Hogan. 2001. Gastrointestinal eosinophils. *Immunol Rev.* 179:139-155.
176. Ruprecht, C.R., M. Gattorno, F. Ferlito, A. Gregorio, A. Martini, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2005. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med.* 201:1793-1803.
177. Sakaguchi, E., I. Sakaida, and K. Okita. 2004. [Th1/Th2 balance in HCV-related liver cirrhosis and the effect of TGF-beta on Th1 response: possible implications for the development of hepatoma]. *Nippon Rinsho.* 62 Suppl 7:175-178.
178. Sakaguchi, M., H. Kato, A. Nishiyori, K. Sagawa, and K. Itoh. 1995a. Characterization of CD4<sup>+</sup> T helper cells in patients with Kawasaki disease (KD): preferential production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by V beta 2- or V beta 8- CD4<sup>+</sup> T helper cells. *Clin Exp Immunol.* 99:276-282.

179. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 22:531-562.
180. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995b. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155:1151-1164.
181. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 182:18-32.
182. Sakaguchi, S., R. Setoguchi, H. Yagi, and T. Nomura. 2006. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Current topics in microbiology and immunology.* 305:51-66.
183. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara. 2007. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol.* 37 Suppl 1:S116-123.
184. Saldanha, J.C., D.L. Gargiulo, S.S. Silva, F.H. Carmo-Pinto, M.C. Andrade, J.I. Alvarez-Leite, M.M. Teixeira, and D.C. Cara. 2004. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Braz J Med Biol Res.* 37:809-816.
185. Sampson, H.A. 1999. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 103:717-728.
186. Sampson, H.A. 2004. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 113:805-819; quiz 820.
187. Santiago, A.F., A.C. Alves, R.P. Oliveira, R.M. Fernandes, J. Paula-Silva, F.A. Assis, C.R. Carvalho, H.L. Weiner, and A.M. Faria. 2011. Aging correlates with reduction in regulatory-type cytokines and T cells in the gut mucosa. *Immunobiology.*
188. Santiago, A.F., R.M. Fernandes, B.P. Santos, F.A. Assis, R.P. Oliveira, C.R. Carvalho, and A.M. Faria. 2008. Role of mesenteric lymph nodes and aging in secretory IgA production in mice. *Cell Immunol.* 253:5-10.
189. Santos, L.M., A. al-Sabbagh, A. Londono, and H.L. Weiner. 1994. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF-beta-secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell Immunol.* 157:439-447.
190. Saruta, M., Q.T. Yu, P.R. Fleshner, P.Y. Mantel, C.B. Schmidt-Weber, A.H. Banham, and K.A. Papadakis. 2007. Characterization of FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol.* 125:281-290.
191. Saurer, L., and C. Mueller. 2009. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy.* 64:505-519.

192. Savilahti, E., V.M. Tainio, L. Salmenpera, P. Arjomaa, M. Kallio, J. Perheentupa, and M.A. Siimes. 1991. Low colostral IgA associated with cow's milk allergy. *Acta paediatrica Scandinavica*. 80:1207-1213.
193. Schmucker, D.L., C.K. Daniels, R.K. Wang, and K. Smith. 1988. Mucosal immune response to cholera toxin in ageing rats. I. Antibody and antibody-containing cell response. *Immunology*. 64:691-695.
194. Schmucker, D.L., R.L. Owen, R. Outenreath, and K. Thoreux. 2003. Basis for the age-related decline in intestinal mucosal immunity. *In Clin Dev Immunol*. Vol. 10. 167-172.
195. Schroeder, H.W., Jr., and L. Cavacini. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 125:S41-52.
196. Scott-Taylor, T.H., J.B. Hourihane, J. Harper, and S. Strobel. 2005. Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy*. 35:1473-1480.
197. Shi, H.Z., C.Q. Xiao, C.Q. Li, X.Y. Mo, Q.L. Yang, J. Leng, and Y.Q. Chen. 2004. Endobronchial eosinophils preferentially stimulate T helper cell type 2 responses. *Allergy*. 59:428-435.
198. Shurin, M.R., G.V. Shurin, and G.S. Chatta. 2007. Aging and the dendritic cell system: implications for cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 64:90-105.
199. Sicherer, S.H. 2002. Food allergy. *Lancet*. 360:701-710.
200. Sicherer, S.H. 2011. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 127:594-602.
201. Sicherer, S.H., and H.A. Sampson. 2006. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 117:S470-475.
202. Sicherer, S.H., and H.A. Sampson. 2010. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 125:S116-125.
203. Simioni, P.U., L.G. Fernandes, D.L. Gabriel, and W.M. Tamashiro. 2004. Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin. *Scand J Immunol*. 60:257-266.
204. Simioni, P.U., L.G. Fernandes, D.L. Gabriel, and W.M. Tamashiro. 2010. Effect of aging and oral tolerance on dendritic cell function. *Braz J Med Biol Res*. 43:68-76.
205. Solana, R., and E. Mariani. 2000. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*. 18:1613-1620.
206. Sonoda, E., R. Matsumoto, Y. Hitoshi, T. Ishii, M. Sugimoto, S. Araki, A. Tominaga, N. Yamaguchi, and K. Takatsu. 1989. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med*. 170:1415-1420.

207. Spahn, T.W., H. Herbst, P.D. Rennert, N. Luger, C. Maaser, M. Kraft, A. Fontana, H.L. Weiner, W. Domschke, and T. Kucharzik. 2002. Induction of colitis in mice deficient of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes is associated with increased disease severity and formation of colonic lymphoid patches. *Am J Pathol.* 161:2273-2282.
208. Speziali, E., A.F. Santiago, R.M. Fernandes, N.M. Vaz, J.S. Menezes, and A.M. Faria. 2009. Specific immune responses but not basal functions of B and T cells are impaired in aged mice. *Cell Immunol.* 256:1-5.
209. Staden, U., C. Rolinck-Werninghaus, F. Brewe, U. Wahn, B. Niggemann, and K. Beyer. 2007. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy.* 62:1261-1269.
210. Stassen, M., C. Muller, M. Arnold, L. Hultner, S. Klein-Hessling, C. Neudorfl, T. Reineke, E. Serfling, and E. Schmitt. 2001. IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF-kappa B is decisively involved in the expression of IL-9. *J Immunol.* 166:4391-4398.
211. Strickland, D.H., P.A. Stumbles, G.R. Zosky, L.S. Subrata, J.A. Thomas, D.J. Turner, P.D. Sly, and P.G. Holt. 2006. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 203:2649-2660.
212. Strobel, S., and A. Ferguson. 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.
213. Strobel, S., and A.M. Mowat. 2006. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 6:207-213.
214. Sudo, N., S. Sawamura, K. Tanaka, Y. Aiba, C. Kubo, and Y. Koga. 1997. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol.* 159:1739-1745.
215. Sun, C.M., J.A. Hall, R.B. Blank, N. Bouladoux, M. Oukka, J.R. Mora, and Y. Belkaid. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 204:1775-1785.
216. Sun, J.B., C. Czerkinsky, and J. Holmgren. 2010. Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit. *Scand J Immunol.* 71:1-11.
217. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 10:1969-1980.
218. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21:335-376.
219. Taub, D.D., and D.L. Longo. 2005. Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev.* 205:72-93.

220. Thomas, H.C., and M.V. Parrott. 1974. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology*. 27:631-639.
221. Thoreux, K., R.L. Owen, and D.L. Schmucker. 2000. Intestinal lymphocyte number, migration and antibody secretion in young and old rats. *Immunology*. 101:161-167.
222. Tschernig, T., and R. Pabst. 2000. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology*. 68:1-8.
223. Tsuji, M., N. Komatsu, S. Kawamoto, K. Suzuki, O. Kanagawa, T. Honjo, S. Hori, and S. Fagarasan. 2009. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science*. 323:1488-1492.
224. Tu, Y., S. Salim, J. Bourgeois, V. Di Leo, E.J. Irvine, J.K. Marshall, and M.H. Perdue. 2005. CD23-mediated IgE transport across human intestinal epithelium: inhibition by blocking sites of translation or binding. *Gastroenterology*. 129:928-940.
225. Untersmayr, E., and E. Jensen-Jarolim. 2006. The effect of gastric digestion on food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 6:214-219.
226. van der Heijden, P.J., W. Stok, and A.T. Bianchi. 1987. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology*. 62:551-555.
227. van Wijk, F., and L. Knippels. 2007. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 61:8-20.
228. Vaz, N.M., L.C. Maia, D.G. Hanson, and J.M. Lynch. 1977. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol*. 60:110-115.
229. Vaz, N.M., L.C. Maia, D.G. Hanson, and J.M. Lynch. 1981. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 76:83-91.
230. Vaz, N.M., M.J. Rios, L.M. Lopes, C.M. Gontijo, E.B. Castanheira, F. Jacquemart, and L.A. Andrade. 1987. Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. *Braz J Med Biol Res*. 20:785-790.
231. Veldhoen, M., and B. Stockinger. 2006. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol*. 27:358-361.
232. Veres, G., M. Westerholm-Ormio, J. Kokkonen, A. Arato, and E. Savilahti. 2003. Cytokines and adhesion molecules in duodenal mucosa of children with delayed-type food allergy. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 37:27-34.
233. Verhasselt, V., V. Milcent, J. Cazareth, A. Kanda, S. Fleury, D. Dombrowicz, N. Glaichenhaus, and V. Julia. 2008. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat Med*. 14:170-175.

234. Wakabayashi, A., M. Utsuyama, T. Hosoda, K. Sato, and K. Hirokawa. 1999. Differential age effect of oral administration of an antigen on antibody response: an induction of tolerance in young mice but enhancement of immune response in old mice. *Mech Ageing Dev.* 109:191-201.
235. Weiner, H.L. 1994. Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10762-10765.
236. Weiner, H.L., A.P. da Cunha, F. Quintana, and H. Wu. 2011. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 241:241-259.
237. Weiner, H.L., A. Friedman, A. Miller, S.J. Khoury, A. al-Sabbagh, L. Santos, M. Sayegh, R.B. Nussenblatt, D.E. Trentham, and D.A. Hafler. 1994. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* 12:809-837.
238. Woodland, D.L., and M.A. Blackman. 2006. Immunity and age: living in the past? *Trends Immunol.* 27:303-307.
239. Yamaguchi, Y., Y. Hayashi, Y. Sugama, Y. Miura, T. Kasahara, S. Kitamura, M. Torisu, S. Mita, A. Tominaga, and K. Takatsu. 1988. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med.* 167:1737-1742.
240. Yamamoto, M., P. Rennert, J.R. McGhee, M.N. Kweon, S. Yamamoto, T. Dohi, S. Otake, H. Bluethmann, K. Fujihashi, and H. Kiyono. 2000. Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol.* 164:5184-5191.
241. Yu, L.C., and M.H. Perdue. 2001. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol Rev.* 179:61-73.
242. Zeiger, R.S., and S. Heller. 1995. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol.* 95:1179-1190.
243. Zhang, X., L. Izikson, L. Liu, and H.L. Weiner. 2001. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol.* 167:4245-4253.
244. Zhao, L., L. Sun, H. Wang, H. Ma, G. Liu, and Y. Zhao. 2007. Changes of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in aged Balb/c mice. *J Leukoc Biol.* 81:1386-1394.

**Anexo A: Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em  
experimentação Animal da UFMG.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 115/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Envelhecimento e produção de IgA na indução de tolerância oral**", que tem como responsável(is) **Ana Maria Caetano de Faria**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **13/ 08/2008**.

Este certificado expira-se em **13/ 08/ 2013**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 115/2007**, related to the project entitled "**Aging and IgA production in the oral tolerance induction**", under the supervisors of **Ana Maria Caetano de Faria**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 13, 2008**.

This certificate expires in **August 13, 2013**.

Belo Horizonte, 18 de Agosto de 2008.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)

**Anexo B: Artigos Publicados**