



ARCHIMEDES BARBOSA DE CASTRO JUNIOR

ASPECTOS SISTÊMICOS DA TOLERÂNCIA ORAL

Belo Horizonte

2012

ARCHIMEDES BARBOSA DE CASTRO JUNIOR

ASPECTOS SISTÊMICOS DA TOLERÂNCIA ORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Nelson Monteiro Vaz
Prof. Ana Maria Caetano de Faria

Belo Horizonte

2012

ARCHIMEDES BARBOSA DE CASTRO JUNIOR

ASPECTOS SISTÊMICOS DA TOLERÂNCIA ORAL

Aprovada em 18 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Doutora Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Doutora Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Doutora Liza Figueiredo Felicori Vilela
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Doutora Ana Maria Caetano de Faria
Universidade Federal de Minas Gerais
(co-orientadora)

Prof. Doutor Nelson Monteiro Vaz
Universidade Federal de Minas Gerais
(orientador)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia no Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com o apoio dos órgãos de fomentação científica CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Aos meus pais, Archimedes Barbosa de Castro e
Vânia Ayres Pinto.

“Responda depressa...
A resposta pra tua pergunta
Ainda é essa?”

Ana Maria Caetano de Faria

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e sempre acreditaram em mim mesmo quando nem eu mais acreditava. Devo essa vitória aos dois.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Nelson Vaz, com quem aprendi que o ensino é impossível mas o aprendizado é inevitável! Conviver com o Professor é aprender, sempre, sobre coisas muito além da ciência. Aprendi sobre estética, literatura, poesia, enfim, sobre o viver. Agradeço pelo tanto que aprendi e ainda aprendo mesmo sem ter me ensinado nada.

A Profa. Ana Maria Caetano, não somente pela imensa ajuda como co-orientadora mas também por sua longanimidade e humanidade que me fizeram admirá-la tanto como profissional quanto como pessoa. Obrigado pelos ensinamentos e conselhos constantes durante todos estes anos.

À Profa. Claudia Carvalho, pelas conversas e discussões e também por sua receptividade e hospitalidade sempre que necessitei.

Ao Prof. Tomaz da Mota Santos, pessoa de grande humanidade, com quem aprendi muito sempre que conversamos.

À Ildinha, pelo carinho enorme que sempre me tratou desde o início. Agradeço também pela atividade competente no cuidado dos animais e com o laboratório.

Duas pessoas foram de extrema importância nesta jornada em Belo Horizonte. Bernardo Coelho e Ana Cristina Gomes, ambos co-autores deste trabalho. Sem eles esta tarefa teria sido não somente mais difícil mas muito mais dolorosa. Os dois tornaram-se amigos para todas as horas, companheiros de lutas e aventuras. Se foi possível terminar este trabalho, devo isso aos dois. Agradeço também à Thaís, que chegou mais tarde, me ajudou muito (!) e se tornou uma grande amiga.

Tive extrema sorte de trabalhar com duas pessoas de uma humanidade e sensibilidade incríveis. O primeiro é co-autor deste trabalho, André Pires. Pessoa fantástica, única e insubstituível, sempre disposto a ajudar de todas as formas possíveis! Rafael Pires também compartilha com seu primo das mesmas qualidades,

que, presume-se, seja de família! Aos dois, só tenho que agradecer pela convivência durante esses anos!

Aos colegas que fazem ou fizeram parte do LIB, com quem sempre pude contar inúmeras vezes e fizeram parte desta história: Andrezza, Rafaela, Tatiani, Wesley, Daniele, Andréa, Joana, Samara, Mauro, Adna, Flávia e tantos outros, aos quais peço desculpas por não constar desta lista.

Ao Raphael Steinberg, colega de rigor técnico e científico invejáveis, agradeço pela intensa ajuda nos experimentos de RT-qPCR.

À amiga Danielle Nascimento, que também ajudou muito nos experimentos de RT-qPCR, e também nas análises dos dados. Muito obrigado por tudo e principalmente pelo tempo e paciência despendidos!

Aos colegas do laboratório da Profa. Claudia: Raquel, Claudiney, Geraldo, Diana, pela convivência sempre agradável. Também agradeço à Maria Noviello pela amizade e longas conversas em tempos difíceis.

A todos do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela convivência cotidiana.

Às agências CNPq, CAPES e Fapemig, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 BREVE HISTÓRICO DA IMUNOLOGIA	2
1.2 INÍCIO DA IMUNOBIOLOGIA	3
1.3 DA TEORIA DA SELEÇÃO NATURAL DOS ANTICORPOS À TEORIA DA SELEÇÃO CLONAL	6
1.4 TOLERÂNCIAS NEGLIGENCIADAS.....	7
1.5 TOLERÂNCIAS “ENQUADRADAS”	8
1.6 CONTEXTO PARA A REDESCOBERTA DA TOLERÂNCIA ORAL	9
1.6.1 A Imunologia de Mucosas	9
1.6.2 Organização das estruturas linfóides associadas às Mucosas	11
1.7 A REDESCOBERTA DA TOLERÂNCIA ORAL.....	13
1.7.1 O papel da IgA na Tolerância Oral e na mucosa intestinal	16
1.8 AUTO-TOLERÂNCIA E TOLERÂNCIA ORAL: COMPARANDO MECANISMOS	18
1.8.1 Células T supressoras.....	18
1.8.2 Deleção clonal.....	21
1.8.3 Anergia clonal.....	24
1.8.4 Células T reguladoras e a Tolerância dominante.....	27
1.9 A TOLERÂNCIA REINTERPRETADA.....	32
1.10 Tolerância Oral – caminhos para uma reinterpretação	33
1.11 BREVE COMENTÁRIO SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL	35
2. OBJETIVOS	37
2.1 GERAL	38
2.2 ESPECÍFICOS.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 ANIMAIS	40
3.2 ANTÍGENO	40
3.3 TRATAMENTO ORAL PARA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA.....	40
3.4 IMUNIZAÇÕES PARENTERAIS.....	40
3.5 OBTENÇÃO DE SORO SANGUÍNEO	41
3.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA MEDIDA DE ANTICORPOS SÉRICOS	41

3.6.1	Elisa para medida de anticorpos anti-OVA.....	41
3.6.2	Elisa para medida de anticorpos totais.....	42
3.6.3	Elisa para medida de IgE anti-OVA.....	43
3.6.4	Elisa para medida de IgE total.....	44
3.7	ENUMERAÇÃO DAS CÉLULAS SECRETORAS DE IMUNOGLOBULINAS POR ELISPOT .	44
3.8	CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS	46
3.9	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) – PCR QUANTITATIVO	47
3.10	ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS DO BAÇO E DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	50
3.11	DESCRIÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL	53
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4.	RESULTADOS	55
4.1	INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL À OVALBUMINA	56
4.2	PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS EM ANIMAIS TOLERANTES E IMUNIZADOS APÓS A IMUNIZAÇÃO SECUNDÁRIA	59
4.3	ATIVIDADE LINFOCITÁRIA GLOBAL EM ANIMAIS IMUNIZADOS E TOLERANTES	66
4.4	PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS EM CULTURA DE CÉLULAS DO BAÇO EM ANIMAIS TOLERANTES E IMUNIZADOS	71
4.5	CINÉTICA DE APARECIMENTO DE LINFÓCITOS ATIVADOS NO BAÇO	73
4.6	CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CULTURA DE CÉLULAS DE BAÇO	78
5.	DISCUSSÃO	82
6.	CONCLUSÕES	91
7.	BIBLIOGRAFIA.....	94
8.	ANEXOS.....	113
8.1	CERTIFICADO CETEA - UFMG	114
8.2	ARTIGO PUBLICADO	115

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Estratégia de *gating* para os experimentos de citometria de fluxo. Células de baço ou de linfonodos mesentéricos foram coletadas e submetidas a análise de citometria de fluxo. A região de linfócitos foi estabelecida com base no tamanho relativo (*forward light scatter*) e complexidade citoplasmática (*side angle scatter*). A sequência de regiões (*gates*) foi estabelecida de acordo com as marcações. A definição das regiões (*gate*) de interesse foi baseada em controles de fluorescência menos um (do inglês *fluorescence minus one* – FMO) onde as células são marcadas com todos os anticorpos menos aquele de interesse para o *gating*.....52
- Figura 2: Diagrama dos experimentos realizados. Dois conjuntos experimentais estão representados. Experimentos com o protocolo completo, após duas imunizações parenterais com o antígeno, terminando aos 21 dias. Experimentos de cinética após a imunização primária nos seguintes tempos: 0, 1, 2, 4 e 7 dias.53
- Figura 3: Títulos séricos de Ig total anti-Ova. Foram obtidos soros de Camundongos C57BL/6 antes do protocolo de imunização e após cada imunização. Animais Tolerantes (▲) receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados intraperitonealmente (i.p.) com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados (■) passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo anteriormente. Animais controle (●) foram imunizados somente com salina. Os títulos de Ig sérica anti-ova estão expressos em ELISA score (ver materiais e métodos). Significância estatística medida por ANOVA com pós-teste de Tukey.57
- Figura 4: Títulos séricos de IgG1, IgE, IgM e IgA anti-Ova em animais Controle, Imunizados e Tolerantes após a imunização secundária. Animais Tolerantes receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina.

Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo anteriormente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Os títulos de Ig sérica anti-ova estão expressos em ELISA score (ver materiais e métodos). OD = densidade óptica (*optical density*). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós teste de Tukey (P<0,05).58

Figura 5: Fenótipo de linfócitos ativados no baço de animais Controles, Imunizados e Tolerantes após a imunização secundária. Animais Tolerantes receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo anteriormente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram mortos e tiveram seus baços retirados para análise fenotípica por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em porcentagem e número absoluto de células. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey (P<0,05).60

Figura 6: Gráficos *dotplots* representativos dos fenótipos de linfócitos no baço, apresentados na figura 5.61

Figura 7: Fenótipo de linfócitos ativados nos linfonodos mesentéricos de animais Controles, Imunizados e Tolerantes após a imunização secundária. Animais Tolerantes receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo previamente. Animais controle foram

imunizados somente com salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram mortos e tiveram seus baços retirados para análise fenotípica por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em porcentagem e número absoluto de células. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).63

Figura 8: Gráficos *dotplots* representativos dos resultados de fenótipos de linfócitos em linfonodos mesentéricos, apresentados na figura 7.....64

Figura 9: Células secretoras de imunoglobulinas totais (CSI) mensuradas por Elispot. Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos Tolerante, Imunizado e Controle. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10 μ g de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Células de baço e de medula óssea foram coletadas após a imunização primária ou após a secundária e cultivadas para obter o número de CSI totais. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).67

Figura 10: Células secretoras de imunoglobulinas totais (CSI) mensuradas por Elispot. Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos Tolerante, Imunizado e Controle. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10 μ g de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Foram obtidos os números de CSI produzindo IgG, IgM e IgA a partir do baço (A-C) ou da medula óssea (D-F) dos animais após a imunização secundária. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).68

Figura 11: Títulos séricos de Imunoglobulinas totais IgG1, IgE, IgM e IgA após imunização secundária. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10 μ g de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Os dados estão apresentados como concentração de Igs (μ g/mL) para IgG1, IgM e IgA e como densidade ótica (490nm) para IgE. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).70

Figura 12: Perfil de expressão de citocinas em células do baço após imunização secundária. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10 μ g de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Sete dias após a imunização secundária as células do baço foram coletadas e cultivadas por 48 horas. Após este tempo coletou-se o RNA total das células para medir expressão de citocinas por RT-qPCR. Resultados estão expressos como quantidades médias relativas, e seus respectivos erros-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al. (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão dos animais controles. Letras diferentes sobre as barras representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) medidas por ANOVA com pós-teste de Tukey.....72

Figura 13 (página anterior): Cinética de aparecimento de linfócitos no baço após imunização primária. Animais Tolerantes (linhas pontilhadas - \square) receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Animais Imunizados (linhas contínuas - \blacktriangle) passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo previamente. Animais controle

foram imunizados somente com salina. Os animais foram mortos em intervalos de 1, 2, 4 e 7 dias após a imunização primária e um grupo de animais tolerantes foi morto antes da imunização primária (tempo 0). Células de baços foram coletadas para análise fenotípica por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em porcentagem e número absoluto de células para cada marcação. Asteriscos representam diferenças estatísticas (ANOVA com pós-teste de Tukey) entre animais tolerantes e imunizados em cada tempo da cinética (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$). As diferenças entre pontos distintos da cinética estão representadas por # (# = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$; ### = $P < 0,001$).76

Figura 14 (página anterior): Gráficos *dotplots* representativos dos resultados de fenótipos de linfócitos no baço, apresentados na figura 13.78

Figura 15 (página anterior): Cinética da expressão de citocinas em células do baço após imunização primária. Animais Tolerantes (linhas pontilhadas) receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Animais Imunizados (linhas contínuas) passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo previamente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Os animais foram mortos em intervalos de 1, 2, 4 e 7 dias após a imunização primária e um grupo de animais tolerantes foi morto antes da imunização primária (tempo 0). Células do baço foram coletadas em cada tempo e cultivadas por 48 horas. Após este tempo coletou-se o RNA total das células para medir expressão de citocinas por RT-qPCR. Gráficos à direita (F-J) representam dados dos dias 0, 1 e 2 da cinética, destacados por um retângulo nos gráficos à esquerda. Tolerantes (símbolos claros - $\triangle \square \diamond$), Imunizados (símbolos escuros - $\blacktriangle \blacklozenge$) e Controles (\bullet). Resultados estão expressos como quantidades médias relativas, e seus respectivos erros padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al. (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão dos animais controles. Para os gráficos da esquerda os asteriscos representam diferenças estatísticas (ANOVA) entre animais tolerantes e imunizados em cada tempo da cinética (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$). As diferenças entre pontos distintos da cinética para um mesmo grupo (tolerante ou imunizado) estão representadas

por # (# = $P < 0,05$; ## = $P < 0,01$; ### = $P < 0,001$). Os dados dos gráficos da direita foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Tukey, entre todos os grupos.81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela descritiva dos primers utilizados, suas respectivas sequências de anelamento e temperaturas de amplificação	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/ml	Microgramas por mililitro
Al(OH) ₃	Hidróxido de Alumínio
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (<i>antigen presenting cells</i>)
BALB/c	Linhagem isogênica de camundongos
BALT	Tecido linfóide associado à mucosa brônquica
CALT	<i>conjunctiva-associated lymphoid tissue</i> – tecido linfóide associado a conjuntiva
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> - marcador de superfície da célula T
CD5	<i>Cluster of differentiation 5</i> - Marcador de superfície de células T e B
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> - Marcador de superfície de célula T
CD25	<i>Cluster of differentiation 25</i> - Marcador de superfície de célula T ativada
CEI	Células epiteliais intestinais ou enterócitos
Cy	Ciclofosfamida
C57BL/6J	Linhagem isogênica de camundongos
DNP	Dinitrofenil
DTH	<i>Delayed Type Hypersensitivity</i> - Hipersensibilidade do Tipo Tardio
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> – separador de células ativado por fluorescência
FAE	<i>Follicle associated epithelium</i> – epitélio associado ao folículo
Fc	Fragmento cristalizável - Região constante das moléculas de imunoglobulinas
FMO	<i>Fluorescence minus one</i> – fluorescência menos um
Foxp3	<i>Forkhead Box P3</i> – fator de transcrição de células T regulatórias
GALT	Tecido Linfóide associado à mucosa gastrintestinal
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia – Granulócitos / Macrófagos
GvH	<i>Graft vs Host</i> - Enxerto versus Hospedeiro
IFN-γ	Interferon-γ
IgA, IgG, IgE, IgM	Imunoglobulinas com cadeias pesadas α, γ, ε, μ
IL-n	Interleucinas – n= números diferenciadores
ILF	<i>Isolated lymphoid follicles</i> - folículos linfóides isolados

LALT	<i>larynx-associated lymphoid tissue</i> – tecido linfóide associado a laringe
LDALT	<i>lacrimal-drainage-associated lymphoid tissue</i> – tecido linfóide associado a mucosa das glândulas lacrimais
LM	Linfonodos mesentéricos
LPS	Lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas
MALT	Tecido Linfóide associado às mucosas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MNL	Linfonodos mesentéricos
NK	Células Natural Killer
OPD	Ortofenileno-diamina
PBS	Tampão Salino Fosfato
PFC	<i>Plaque-forming cells</i> - células formadoras de placas
PP	Placas de Peyer
RAG	<i>Recombination activating gene</i> - Proteína de recombinação gênica de linfócitos
RNA _m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SALT/DALT	<i>salivary-gland- or duct-associated lymphoid tissue</i> – tecido linfóide associado à glândula salivar
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i> – imunodeficiência severa combinada
TALT	<i>Eustachian tube-associated lymphoid tissue</i> – tecido linfóide associado ao tubo de Eustáquio
TCR	Receptor da célula T
TGF- β	Fator de crescimento tumoral- β
Th1	Células T <i>helper</i> 1
Th2	Células T <i>helper</i> 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
Treg	Células T reguladoras

RESUMO

A Tolerância Oral é tradicionalmente definida pela inibição da reatividade imune específica contra proteínas previamente ingeridas, devido a um decréscimo da atividade linfocitária. Pouca atenção tem sido dada à atividade imunológica sistêmica global em animais tolerantes orais. Por atividade imunológica global, entendemos a ativação concomitante de clones de linfócitos não específicos ao antígeno em questão, além dos clones antígeno-específicos. Paradoxalmente, nós observamos que a inibição da reatividade específica coexiste com um aumento da atividade global de linfócitos. Camundongos C57BL/6 tolerantes a ovalbumina apresentaram a supressão característica das respostas de anticorpos séricos específicos para todas as classes de Imunoglobulinas avaliadas: IgG1, IgE, IgM e IgA. Entretanto, o nível de IgM total sérica estava mais aumentado em animais tolerantes do que em imunizados. Os níveis de IgA total sérica estavam aumentados em ambos os grupos. Por consequência, animais tolerantes possuíam números elevados de células secretoras de imunoglobulinas (CSI) no baço e na medula óssea. No baço de animais tolerantes prevaleceu CSI produzindo IgA e IgM enquanto que na medula óssea predominam CSI produzindo IgG e IgM. Animais imunizados mostraram maior número de CSI secretando IgG no baço. Apesar de possuírem o mesmo número e frequência de linfócitos T ativados e reguladores no baço após a imunização secundária, animais tolerantes exibiram uma cinética particular de aparecimento dessas células após a imunização primária. Camundongos tolerantes mostraram uma expansão precoce de células T efetoras/memória CD4+CD44^{high} um dia após a imunização, enquanto que animais imunizados tiveram esta população aumentada após o quarto dia. Similarmente, células T reguladoras CD4+Foxp3⁺ aparecem antes no baço de animais tolerantes, no segundo dia da cinética. Estas células expandem tardiamente em animais imunizados, porém alcançam uma frequência e número maior do que a de animais tolerantes após 7 dias. Digno de nota é o aumento no número de células T CD4+CD69⁺ (recém ativadas) e CD4+CD25⁺LAP⁺ (reguladoras) no baço de animais tolerantes mesmo antes da imunização parenteral, sete dias após a administração oral do antígeno. Neste período, animais tolerantes também possuem uma expressão aumentada de citocinas reguladoras (TGF- β e IL-10) e uma expressão transitória de citocinas efetoras (IL-2 e IFN- γ). Assim, concluímos que os fenômenos imunológicos subjacentes à tolerância oral vão além

da inibição da reatividade específica, envolvendo uma ativação linfocitária mais distribuída e uma rápida mobilização de linfócitos ativados e reguladores.

Palavras chave: tolerância oral, ativação sistêmica de linfócitos, Treg, citocinas, cinética.

ABSTRACT

Oral tolerance is traditionally understood as a reduction of specific immune responsiveness to ingested proteins due to lymphocyte activity decrease. Few attention has been given to systemic immunological activity in orally tolerant organisms. Paradoxically, we found that specific lymphocyte activity inhibition was parallel to an increased global lymphocyte activity. C57BL/6 mice rendered orally tolerant to ovalbumin showed the characteristic suppression of antigen specific antibody responses in all serum immunoglobulin classes analyzed: IgG1, IgE, IgM and IgA. Nevertheless, these mice presented total IgA levels similar to immunized mice and higher levels of total IgM in serum. Accordingly, orally tolerant mice had higher number of immunoglobulin secreting cells (ISC) in spleen and bone marrow. Moreover, tolerant mice Ig-secreting cells in spleen were mainly IgM and IgA producers, whereas immunized mice had mostly IgG-secreting cells. Despite having the same number of regulatory and activated T cells in spleen after booster immunization, tolerant animals exhibit a different cells appearance kinetics in the spleen after the primary intraperitoneal immunization with antigen and adjuvant. Tolerant mice showed an earlier expansion of CD4+CD44^{high} effector/memory T cell as soon as one day after immunization while immunized mice had these cells expanded at the fourth day. Similarly, CD4+Foxp3+ regulatory T cells appeared sooner in tolerant mice, two days after immunization. Immunized mice showed a CD4+Foxp3+ Treg cells expansion delay, achieving higher cells frequencies and numbers 7 days after immunization. Importantly, orally tolerant mice presented higher numbers of CD4+CD69+ T cells and CD4+CD25+LAP+ regulatory T cells in spleen even before parenteral immunization. Also, at this time tolerant animals showed a higher expression of regulatory cytokines (TGF- β and IL-10) and a transient expression of lymphocyte activation cytokines (IL-2 and IFN- γ). Thus, over inhibiting specific responsiveness, orally-tolerant mice display an early and widespread mobilization of activated and regulatory lymphocytes.

Key words: oral tolerance, lymphocyte activation, Treg, kinetics, cytokines

1. INTRODUÇÃO

1.1 BREVE HISTÓRICO DA IMUNOLOGIA

A Imunologia nasce como disciplina na segunda metade do sec. XIX, vinculada ao crescente desenvolvimento da Medicina e Bacteriologia daquela época. Para se compreender como os conceitos imunológicos surgiram e se desenvolveram pode-se dividir a história da imunologia em fases, onde cada uma direciona as pesquisas da fase seguinte, influenciando fortemente as interpretações de alguns resultados obtidos e relegando outros ao esquecimento.

A fase fundadora da Imunologia compreende os primeiros resultados experimentais que generalizaram a variação de Edward Jenner, que já era realizada desde o século anterior, no conceito de vacinação, como proteção para doenças infecciosas. Neste período, Louis Pasteur postulou a primeira explicação para a origem das doenças, a Teoria dos Germes, segundo a qual cada doença teria seu causador específico (germe) e a imunidade seria uma reação de defesa contra a invasão de organismos patogênicos. A importância dessa teoria para a Medicina da época mede-se pela ausência até então de alguma teoria científica que pudesse explicar a origem das doenças. Assim, cada doença teria um causador específico (germe), e poderia ser tratada com uma vacina específica ao germe. Em 1890, a descoberta das antitoxinas diftéricas por Von Bering e Kitasato revelaram um primeiro substrato com o qual os imunologistas passaram a trabalhar (von Behring e Kitasato, 1890). O sucesso na criação das primeiras vacinas durante esse período fundador fortaleceu o entendimento de que a atividade imunológica é potencialmente destrutiva, e com ela a convicção de que a finalidade evolutiva do sistema imune seria o de proteger os organismos vertebrados dos temidos invasores microscópicos que nos cercam (Gradmann, 2000).

Paul Ehrlich foi outro pesquisador importante nesse período fundador. Como resultado de seus trabalhos, Ehrlich propôs que os anticorpos não reagiriam somente contra antígenos de microorganismos, pois também era possível obter anticorpos que reagem com proteínas de plantas (ricina, abrina), ampliando o universo de antígenos com os quais o sistema imune poderia reagir. Foi de Ehrlich a primeira teoria imunológica sobre a origem dos anticorpos (Ehrlich, 1900). Segundo Ehrlich, as células teriam em sua superfície receptores usados para a sua nutrição (cadeias laterais) que seriam produzidos em grande quantidade e secretados

quando em contato com os antígenos. Em seus trabalhos, Ehrlich apontou que a reação a produtos tóxicos microbianos é apenas uma faceta da atividade imunológica, uma vez que o corpo produz anticorpos contra qualquer elemento, seja de origem animal ou vegetal. Havia, porém, uma exceção: quando imunizados com suas próprias hemácias, os animais nunca produziam anticorpos contra as mesmas, apesar de reagirem contra hemácias de outros indivíduos da mesma espécie. A essa ausência de reatividade contra o próprio corpo Ehrlich deu o nome de “*horror autotoxicus*”.

Durante as primeiras décadas do século XX, a Imunologia entrou em uma fase imunoquímica e os pesquisadores se dedicaram a estudar os aspectos físico-químicos dos anticorpos, qual a sua composição e estrutura, como e porque são produzidos. Devido às evidências de que os anticorpos poderiam se ligar a qualquer elemento químico, mesmo não naturais, como compostos produzidos em laboratório (Landsteiner, 1945), a teoria das cadeias laterais de Ehrlich foi desacreditada, pois era considerado impossível haver tamanha diversidade de anticorpos já pré-formados no organismo. Assim, a Teoria de Ehrlich foi substituída por diversas versões do que se convencionou chamar de “teorias de moldagem” para a produção de anticorpos, onde o próprio antígeno serviria como molde para a molécula do anticorpo ser montada e adquirir sua especificidade.

1.2 INÍCIO DA IMUNOBIOLOGIA

Ocorre uma grande mudança na Imunologia a partir dos anos 1950, quando novos conceitos surgem e dão forma ao aparecimento da imunologia celular, baseada em abordagens da biologia celular e molecular. Dois conceitos interdependentes são criados pelo imunologista australiano Frank Mcfarlane Burnet: o conceito de *self* ou identidade do corpo; e o de tolerância imunológica. O *self*, ou o conjunto de componentes do corpo, seria definido ativamente durante a sua embriogênese através de complexas interações entre células imunes e todas as outras células e moléculas do embrião. Se durante esse processo outros materiais ou até mesmo outros organismos, de fora do corpo (*non-self*), entrassem acidentalmente no corpo do embrião, eles seriam percebidos como parte do organismo. Assim, bactérias, vírus ou células geneticamente diferentes poderiam ser

indefinidamente “toleradas” pelo organismo. Burnet assinalava que embriões e animais recém-nascidos tem pouca ou nenhuma atividade imunológica contra agentes estranhos incluindo vírus, toxinas e tumores. Ele mesmo tentou gerar anticorpos pela inoculação de vários vírus em embriões de galinha, sem sucesso. Burnet imaginou que essa falha na capacidade de reconhecer materiais externos seria decorrente de uma imaturidade, ou falta de competência, do seu sistema imune, que seria adquirida gradualmente com o crescimento do organismo.

Dois conjuntos de experimentos foram cruciais para que Burnet desenvolvesse esses conceitos. Primeiro foram os estudos da infecção de camundongos pelo vírus da coriomeningite linfocítica (ou LCMV, em inglês). O LCMV infecta cronicamente colônias de camundongos, sendo transmitido "verticalmente" da mãe para os filhotes, *in utero*. As infecções são geralmente benignas, os animais possuem vírus em quase todos os tecidos do corpo e são resistentes ao desafio intracerebral com o vírus. Se, no entanto, um animal adulto virgem de contato com o vírus é introduzido na colônia, instala-se uma intensa meningite viral com grande infiltração de linfócitos, levando à morte em poucos dias. A convivência com o vírus desde a vida embrionária, portanto, resulta em uma certa inibição da reatividade ao vírus (Traub, 1939). O segundo conjunto veio a partir de experimentos de Robert Owen (1945), que expandiu as consequências de anastomoses nas placentas de gêmeos bovinos bivitelinos, que, por isso, possuem uma circulação sanguínea cruzada entre embriões fraternos. Sabia-se que essas anastomoses entre embriões macho e fêmea levavam as fêmeas adultas a uma anormalidade chamada *freemartin* (ou vaca-maninha) que são estéreis e não produzem leite. Owen demonstrou que as anastomoses também levavam a um compartilhamento dos tipos sanguíneos entre os gêmeos dizigóticos, que se tornavam quimeras hematológicas até a vida adulta. Burnet entendeu que este era um exemplo de sobrevivência de células alogênicas (de outro organismo da mesma espécie) sem despertar a reatividade imunológica. Com estes exemplos, Burnet e Fenner (1949) descrevem a tolerância imunológica como o resultado da distinção feita pelo organismo entre o os seus próprios componentes (*self*) e os antígenos (celulares, moleculares) estranhos, de fora do corpo (*non-self*).

O segundo conjunto experimental decorreu dos trabalhos do biólogo inglês Peter Medawar com transplantação de tecidos. A motivação de Medawar decorria de

sua frustração em transplantar pele em pacientes com grandes queimaduras sofridas durante a segunda Guerra Mundial. Os enxertos de pele eram invariavelmente rejeitados dentro de poucos dias e Medawar se propôs a estudar a rejeição de transplantes clínica e experimentalmente. As primeiras observações foram de que a sobrevivência do aloenxerto era inversamente proporcional à quantidade do tecido transplantado e que um segundo enxerto era rejeitado mais rapidamente, o que sugeria tratar-se de fenômenos imunológicos (Medawar, 1946; Medawar, 1946). Medawar tentou usar a técnica de enxertos de pele para diferenciar gêmeos bovinos dizigóticos de monozigóticos. Ele esperava que os transplantes só seriam aceitos se os animais fossem gêmeos idênticos, ou seja monozigóticos, do contrário seriam rejeitados. A surpresa foi que todos os gêmeos bovinos experimentados aceitaram os enxertos de pele mesmo os que seriam obviamente dizigóticos, como bovinos gêmeos machos e fêmeas.

Estes resultados só fizeram sentido quando Medawar teve conhecimento dos resultados de Owen sobre as quimeras hematológicas. Ele concluiu que as anastomoses placentárias permitem passar não somente precursores de hemácias do gêmeo não idêntico mas também outras células do organismo, levando o futuro animal a um estado de tolerância adquirida aos tecidos do gêmeo. Mas a demonstração experimental definitiva do fenômeno da tolerância imunológica adquirida foi realizada com camundongos de linhagens isogênicas, geneticamente homogêneas. Billingham, Brent e Medawar (Billingham, Brent *et al.*, 1953) injetaram células de tecidos de uma linhagem de camundongos em fetos por nascer de uma segunda linhagem. Após o nascimento, esses camundongos aceitavam os transplantes de pele da linhagem doadora das células, mas não de uma terceira linhagem. Ademais, a transfusão de linfócitos de animais que rejeitaram o transplante de pele para animais que já haviam rejeitado um enxerto similar, levava a rejeição do enxerto antes tolerado. Isto sugeria que os linfócitos estavam envolvidos na rejeição dos enxertos e que, portanto, a tolerância era devida à ausência de linfócitos capazes de reagir ao transplante. É digno de nota que Hasek, na então Tchecoslováquia, reproduziu no mesmo ano (Hasek, 1953) o fenômeno de Owen em galinhas, estabelecendo uma parabiose sincorial entre ovos embrionados. Ele observou que as aves adultas aceitavam transplantes de pele do parceiro e não formavam anticorpos contra suas hemácias. Entretanto, foram os experimentos de

Medawar e colaboradores que se tornaram amplamente conhecidos e reproduzidos pelos imunologistas. Burnet extrapolou esses resultados ao ver semelhanças entre a tolerância a alo-transplantes (alo-antígenos) e uma auto-tolerância (*self-tolerance*) que ele postulava teoricamente. O mecanismo sugerido para o desenvolvimento da tolerância aos próprios componentes seria eliminar os linfócitos auto-reativos ainda na fase embrionária ou peri-natal.

1.3 DA TEORIA DA SELEÇÃO NATURAL DOS ANTICORPOS À TEORIA DA SELEÇÃO CLONAL

Em 1955, o imunologista dinamarquês Niels Jerne propôs que os anticorpos são imunoglobulinas espontaneamente pré-formadas pelo organismo e que o antígeno somente “selecionaria” aquelas imunoglobulinas com as quais tivesse alguma afinidade; a produção de tais imunoglobulinas seria, então, amplificada (Jerne, 1955). Apesar de não ter oferecido alguma explicação de como se daria essa expansão de anticorpos, sua proposta era extremamente revolucionária à época, pois propunha que o organismo fazia anticorpos de várias especificidades independentemente do contato com antígenos, o que era frontalmente contrário as teorias instrutivas, onde o antígeno era usado como um molde para formar o anticorpo. Independentemente, Talmage e Burnet perceberam que o conceito de seleção era superior ao de instrução, e que era necessário propor uma base celular para a produção de anticorpos. Burnet, porém, não aceitava a possibilidade de que o organismo pudesse produzir tanta diversidade de anticorpos e entendia que o alvo da seleção do antígeno deveria ser a célula produtora de anticorpos e não a própria molécula. Assim ele propôs uma modificação da teoria de Jerne, onde as células produtoras de anticorpos só produziriam um tipo de anticorpo, ou seja, ao se expandirem formariam clones. Ao serem selecionados pelo antígeno, esses clones seriam ativados, se expandiriam e passariam a produzir em grande quantidade os anticorpos daquela especificidade (Burnet, 1957). Com sua Teoria da Seleção Clonal, Burnet explicava os fenômenos da memória imunológica, a distinção do próprio do não próprio (*self-nonself*) e a tolerância imunológica. A morte ou inativação de clones autorreativos se daria na fase embrionária ou perinatal, garantindo a tolerância ao próprio. Burnet cunhou o termo “clones proibidos”

(*forbidden clones*) para descrever os clones que poderiam reagir com moléculas do próprio organismo. A tolerância, para Burnet, seria caracterizada, portanto, pela ausência de reconhecimento do próprio corpo (*self*).

1.4 TOLERÂNCIAS NEGLIGENCIADAS

Antes desse desenvolvimento teórico sobre o conceito de tolerância já haviam evidências experimentais de supressão da atividade imunológica, que nunca assumiram um papel central nas teorias imunológicas. Uma dessas evidências foram os estudos em imunização com polissacarídeos de pneumococos por Loyd Felton e Barbara Ottinger (Felton e Ottinger, 1942). Primeiramente esses autores descreveram a antigenicidade de tais polissacarídeos que eram até então considerados como haptenos. A inoculação de pequenas doses (0,5 µg) dos polissacarídeos em camundongos levava à produção de anticorpos e resistência à infecção pelo pneumococo do mesmo tipo. Porém, o uso de doses muito maiores (0,5 a 5 mg) não induzia imunização. A esse fenômeno foi dado o nome de paralisia imunológica (*immunological paralysis*), que permaneceu como a principal evidência de inibição imunológica até a época de Burnet e Medawar. A explicação proposta para o fenômeno era de que quantidades excessivas do antígeno persistiriam nas células produtoras de anticorpos inibindo a sua reação de síntese ou neutralizando todos os anticorpos sintetizados. Essa hipótese encontrou respaldo na demonstração de Felton de que os polissacarídeos persistiam em diversos tecidos por longos períodos. O fenômeno de Felton era paradigmático na época e condizente com a crença de que os anticorpos eram moldados pelos antígenos. Na ausência do conceito de tolerância, que surgiria anos depois, utilizou-se o termo “paralisia imunológica”, indicando uma total ausência de reatividade.

A outra forma de inibição da reatividade imunológica, ainda mais antiga que a “paralisia imunológica” de Felton, foi o fenômeno de inibição imune pela via oral, descoberto ao acaso e de forma independente por dois pesquisadores: Alexander Besredka, no Instituto Pasteur (1909) e por H.G. Wells nos Estados Unidos (1911). Besredka estudava formas de prevenir as reações de anafilaxia em cobaias, denominando-as anti-anafilaxia. Para isso ele aplicava doses muito pequenas do

soro por diversas vias, tais como intravenosa, retal ou oral com o intuito de evitar o estado anafilático. Observou que qualquer que fosse a substância sensibilizante, seja leite, ovalbumina, ou mesmo soro, o estado anafilático pode ser evitado pela administração desta substância pela via endovenosa mas também pelo reto ou pela boca. Estudando a anafilaxia para proteínas vegetais, H.G. Wells observou que suas cobaias não desenvolviam a sensibilidade anafilática contra proteínas do milho, logo após a troca da ração destes animais por outra contendo milho em sua composição. Assim o simples fato de ingerir proteínas do milho impedia a indução subsequente de anafilaxia às proteínas do milho. Esses estudos nunca tomaram parte das preocupações dos imunologistas e permaneceram esquecidos por pelo menos 30 anos.

Em 1946, Merrill Chase, no laboratório de Landesteiner, realizou as experiências fundadoras do que viria a se chamar "imunologia celular". Sabia-se que a sensibilidade anafilática podia ser passivamente transferida de um animal a outro por anticorpos presentes no soro, mas não a hipersensibilidade de tipo tardio (*delayed type hypersensitivity*, DTH), ou sensibilidade "tuberculínica", como também era chamada. Chase mostrou que a DTH à tuberculina pode ser "adotivamente" transferida de uma cobaia a outra pela transferência de leucócitos (Chase, 1946). Logo a seguir, Chase mostrou que leucócitos colhidos de animais sensibilizados para a dermatite de contato por pincelagem da pele com cloreto de picrila ou dinitrofluorobenzeno (DNFB), podiam também transferir a "sensibilidade de contato" para animais normais. Ele realizou a curiosa observação de que animais tratados com os agentes sensibilizantes (cloreto de picrila ou DNFB) por via oral tornavam-se refratários à sensibilização pela pincelagem posterior da pele (Chase, 1946). Era mais uma evidência da inibição pela via oral caracterizada por Wells e por Besredka três décadas antes.

1.5 TOLERÂNCIAS “ENQUADRADAS”

Foi somente após o desenvolvimento do conceito de tolerância imunológica por Burnet que essas evidências experimentais foram unificadas pelo próprio Merrill Chase em sua revisão de 1959, ano de lançamento do livro *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity* de Burnet e um ano antes do Prêmio Nobel em

Medicina e Fisiologia concedido a Burnet e Medawar (Chase, 1959). Nesse texto, Chase colocou sob o conceito de tolerância, inaugurado por Burnet, os fenômenos de “paralisia imunológica” de Felton e as inibições pela via digestiva descritas por H.G. Wells e por ele mesmo. Como na teoria de Burnet o animal só poderia tornar-se tolerante caso entrasse em contato com o antígeno no período perinatal, Chase citou um resultado experimental onde era obtida a inibição da reatividade imunológica após a exposição oral do antígeno somente se este fosse administrado no período neonatal (Smith e Bridges, 1958). Chase conclui afirmando que este trabalho trazia a interpretação final sobre os resultados de H.G. Wells sobre a resistência a anafilaxia à proteínas do milho em cobaias previamente alimentadas com milho. Entretanto, tal resultado é o contrário do que se observa sobre a inibição da reatividade imunológica por um exposição prévia ao antígeno pela via oral, pois esta depende do amadurecimento imunológico do organismo e não ocorre em neonatos (Hanson, 1981). No entanto, esse enredamento promovido por Chase sobre todas as formas de tolerância fez com que a investigação particular sobre a tolerância oral voltasse a ser esquecida por pelo menos mais 15 anos.

1.6 CONTEXTO PARA A REDESCOBERTA DA TOLERÂNCIA ORAL

1.6.1 A IMUNOLOGIA DE MUCOSAS

A redescoberta da tolerância oral em meados dos anos 1970 deu-se em um contexto teórico específico, tendo relação com uma nova área de pesquisas que ficou conhecida como “Imunologia de Mucosas”. Dois desenvolvimentos experimentais importantes definiram o caminho explicativo tomado nos estudos das mucosas. O primeiro foi a descoberta de uma nova classe de imunoglobulinas, a IgA, por Heremans em 1959 (Heremans, Heremans *et al.*, 1959). Essa nova Ig teve sua presença detectada em níveis elevados no leite e em outras secreções (Hanson e Holm, 1961), abrindo caminho para o estudo do papel das mucosas nos eventos imunológicos. Em humanos adultos cerca de 90% dos plasmócitos nas mucosas são IgA+, compreendendo 80% de todos os plasmócitos no corpo (Brandtzaeg, Halstensen *et al.*, 1989).

A segunda descoberta fundamental para a fundação da nova área de Imunologia de mucosas foram os estudos sobre a (re-)circulação de linfócitos, que acabou por encontrar a migração seletiva de linfoblastos entre as diversas mucosas do organismo. Gowans e Knight (Gowans, Evangelista *et al.*, 1964) demonstraram que a circulação dos linfócitos do sangue para a linfa e de volta ao sangue dependia de uma afinidade especial entre os linfócitos e o endotélio das vênulas pós-capilares. Nesse mesmo trabalho, esses autores também mostraram que linfoblastos retirados do ducto torácico quando injetados em ratos receptores, migravam preferencialmente para o intestino. Observou-se que os linfoblastos B dos linfonodos mesentéricos migram para a *lamina propria* do intestino delgado (Halstead e Hall, 1972) e produzem uma IgA dimérica (McWilliams, Phillips-Quagliata *et al.*, 1977) diferente da IgA do soro sanguíneo, monomérica. As células das placas de Peyer, quando transferidas para animais irradiados, também podiam repovoar a *lamina propria* do intestino (Craig e Cebra, 1971), e até mesmo os brônquios, com plasmócitos secretores de IgA (Rudzik, Clancy *et al.*, 1975). Descreveu-se, em diversas espécies, que o trato brônquico continha agregados linfóides morfológicamente semelhantes às placas de Peyer (Bienenstock, Johnston *et al.*, 1973). Bienenstock mostrou ainda que as células derivadas desses agregados linfóides (chamado por ele de “tecido linfóide associado aos brônquios”) podiam repovoar a mucosa intestinal com plasmócitos secretores de IgA. Diante dessa migração seletiva dos linfócitos entre os tecidos linfóides do pulmão e do intestino, Bienenstock cunhou a expressão “Sistema Imunológico Comum das Mucosas” (Bienenstock, McDermott *et al.*, 1979).

Posteriormente, outras evidências confirmaram a existência de um tráfego constante de linfoblastos comprometidos com a síntese de IgA entre as diferentes mucosas do corpo. Montgomery e colaboradores, alimentando coelhas grávidas com pneumococos conjugados com o hapteno dinitrofenil (DNP), mostraram a presença de anticorpos IgA anti-DNP nas secreções mamárias (Montgomery, Rosner *et al.*, 1974). O mesmo fenômeno foi descrito em humanos (Goldblum, Ahlstedt *et al.*, 1975) e camundongos (Roux, McWilliams *et al.*, 1977). Também foram encontrados anticorpos do tipo IgA em glândulas lacrimais (Montgomery, Ayyildiz *et al.*, 1983), glândulas salivares (Montgomery, Khaleel *et al.*, 1977), e mucosa genital (McDermott e Bienenstock, 1979) de humanos e animais alimentados com uma variedade de

antígenos. Outros relatos citam a migração de linfócitos T do tecido linfóide associado aos brônquios para as glândulas mamárias (Parmely, Beer *et al.*, 1976; Ogra e Ogra, 1978) e do intestino para vários outros sítios (Cahill, Poskitt *et al.*, 1977; Richman, Graeff *et al.*, 1981; Dunkley e Husband, 1987).

1.6.2 ORGANIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS LINFÓIDES ASSOCIADAS ÀS MUCOSAS

As diferentes superfícies de mucosas incluem várias estruturas linfóides coletivamente chamadas de Tecidos Linfóides Associados às Mucosas (do inglês MALT- *mucosa-associated lymphoid tissues*) (Macpherson, McCoy *et al.*, 2008). Esses são tecidos linfóides secundários que podem ser subdivididos e renomeados, de acordo com o órgão que apresenta o tecido de mucosa. Os principais exemplos são: o Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT), o Tecido Linfóide Associado a Nasofaringe (NALT), o Tecido Linfóide Associado aos Brônquios (BALT) (Ruddle e Akirav, 2009; Fagarasan, Kawamoto *et al.*, 2010). Outras potenciais regiões são: SALT/DALT (*salivary-gland- or duct-associated lymphoid tissue*), CALT (*conjunctiva-associated lymphoid tissue*), LDALT (*lachrymal-drainage-associated lymphoid tissue*), TALT (*Eustachian tube-associated lymphoid tissue*), and LALT (*larynx-associated lymphoid tissue*) (Brandtzaeg, 2009).

Apesar de compartilhar semelhanças estruturais com os linfonodos periféricos, o MALT possui características únicas como a ausência de vasos linfáticos aferentes, coletando antígenos diretamente da superfície epitelial (Macpherson, McCoy *et al.*, 2008). No GALT, a amostragem de antígenos envolve células especializadas microfenestradas (células M) presentes no epitélio associado aos folículos (FAE) (Neutra, Mantis *et al.*, 2001). As células M possuem um glicocálix complexo e são muito permeáveis, coletando principalmente antígenos particulados, como bactérias comensais recobertas por IgA ou patógenos (Kadaoui e Corthesy, 2007). Os antígenos coletados são transferidos às células dendríticas (DC) que ficam muito próximas às células M, ocupando invaginações basolaterais de suas membranas (Neutra, Mantis *et al.*, 2001). Alternativamente, as células dendríticas podem também coletar antígenos diretamente do lúmen intestinal, emitindo projeções membranares por entre as células epiteliais (Rescigno, Urbano *et al.*,

2001). Essas células dendríticas carregadas com antígenos migram para a área perifolicular das placas de Peyer e apresentam peptídeos às células T CD4+ iniciando respostas T e B antígeno específicas (Macpherson, McCoy *et al.*, 2008).

No MALT, identificam-se sítios funcionalmente distintos chamados de indutores e efetores. As placas de Peyer (PP) e os linfonodos mesentéricos (LM) são exemplos de sítios indutores, que contém linfócitos T e B em expansão clonal e diferenciação pela ativação antigênica (Fagarasan e Honjo, 2003). A *lamina propria* intestinal (LP) é um exemplo de sítio efector da mucosa, para onde migram as células T e B efectoras saídas dos sítios indutores (Suzuki e Fagarasan, 2009).

O GALT compreende as placas de Peyer, o apêndice cecal e folículos linfóides isolados (ILFs). As placas de Peyer se localizam principalmente no íleo distal e contém entre 5 e 200 folículos linfóides agregados (Cornes, 1965). Em humanos as placas de Peyer podem ser observadas a partir da 11^a semana de gestação e algumas áreas de células T e B podem ocorrer na 19^a semana. Entretanto nenhum centro germinativo aparece até pouco após o nascimento, refletindo a dependência de estímulo antigênico que na infância também induz hiperplasia folicular, facilitando inclusive a visão macroscópica das PP (MacDonald e Spencer, 1990). O número de placas de Peyer aumenta de 50 no início do último trimestre de gravidez até 100 no nascimento e 250 na adolescência, diminuindo até aproximadamente 100 entre a idade de 70 e 95 anos (Cornes, 1965).

Toda essa organização do tecido linfóide associado à mucosa intestinal coloca um grande número de linfócitos em contato direto com antígenos provenientes do lúmen intestinal, seja de origem microbiana ou de proteínas alimentares. A entrada destes antígenos além de não passar despercebida pelo sistema imune local tem reflexos imunológicos sistêmicos. O foco desta tese é na relação entre proteínas alimentares e o sistema imunológico, de acordo com o que se convencionou chamar de tolerância oral.

A seguir, exporemos como se deu a redescoberta do fenômeno de tolerância oral e quais são as principais características de inibição da reatividade imunológica específica determinada pelo ingresso de antígenos pela via digestiva.

1.7 A REDESCOBERTA DA TOLERÂNCIA ORAL

A partir de meados dos anos 1970 a tolerância oral passou a ser intensamente estudada por diversos grupos de pesquisa. Novamente, a redescoberta da tolerância oral foi fortuita, assim como foram no caso de Besredka e Wells no início do século XX e de Chase em 1946. Diferentes grupos, que não estudavam a nova área de Imunologia de Mucosas, participaram dessa redescoberta.

André e colaboradores (André, Heremans *et al.*, 1975) se surpreenderam com a potente capacidade tolerizante de antígenos aplicados por via oral. Ao estudar a resposta imunológica contra hemácias de carneiro administradas por via intragástrica eles observaram uma completa ausência de indução de células formadoras de placas (PFC) produzindo IgA específica no baço mesmo com uma segunda administração oral de hemácias após um intervalo de 2 semanas. A reatividade contra às hemácias só retornou aos níveis usuais após vários meses. Diante da relevância destes achados para o campo da vacinação oral e do tratamento de alergias, André *et al.* se mostraram surpresos com o fato da literatura ter tão raramente aludido a tais fenômenos

Outra redescoberta fortuita aconteceu no laboratório do Prof. Nelson Vaz em Denver (EUA), quando Donald Hanson, ao estudar a aversão imunológica a sabores, observou que animais que haviam recebido ovalbumina pela via oral não produziam anticorpos contra ovalbumina (Hanson, Vaz *et al.*, 1977). A partir de então vários laboratórios obtiveram resultados de inibição de reatividade imunológica pela ingestão prévia do antígeno, e o termo **tolerância oral** foi amplamente aceito.

Muitos trabalhos envolvendo a tolerância oral, mostraram a ocorrência do fenômeno com vários antígenos e modelos animais, como o cão (Cantor e Dumont, 1967), o porco (Bourne, Newby *et al.*, 1975; Newby e Bourne, 1976), a cobaia (Heppell e Kilshaw, 1982), o rato (Bazin e Plateau, 1976; Bazin e Plateau, 1977); e o camundongo (Hanson, Vaz *et al.*, 1977; Vaz, Maia *et al.*, 1981; Guerra, 1991; Weiner, 2001).

É verdade que, na sua maior parte, os alimentos são digeridos às unidades estruturais de cada grupo de alimentos. No entanto, parte das macromoléculas ingeridas é absorvida *in natura* pela mucosa, entrando em contato direto com as

células dendríticas e linfócitos subjacentes, principalmente nas placas de Peyer, que são mais permeáveis aos antígenos do lúmen devido ao seu epitélio especializado rico em células M (Heyman, Ducroc *et al.*, 1982; Heyman e Desjeux, 2000; Menard, Cerf-Bensussan *et al.*, 2010)

Encontram-se vários relatos na literatura mostrando que ocorre a absorção de macromoléculas minutos ou até segundos após a sua ingestão, inclusive com sua passagem para o feto ou para o lactente (Bruce e Ferguson, 1986; Bruce e Ferguson, 1986; Bruce, Strobel *et al.*, 1987). A rápida absorção de macromoléculas intactas para a circulação pode ser evidenciada clinicamente nas alergias alimentares, que podem se manifestar por sintomas generalizados, como as urticárias, segundos após a ingestão do alimento alergênico. No laboratório, ela também pode ser facilmente comprovada por radioimunensaio e outros métodos de detecção da presença de antígenos na circulação. Existem, também, amplas evidências de que os organismos se imunizam para agentes infecciosos através das mucosas, como por exemplo, para o vírus da poliomielite, na qual a vacinação por via oral mostrou-se eficaz.

A indução de tolerância sistêmica pela ingestão do antígeno também foi demonstrada para uma grande diversidade de antígenos. Estes antígenos incluíam substâncias químicas sensibilizantes (Chase, 1946; Glaister, 1973; Asherson, Zembala *et al.*, 1977) proteínas autólogas normais ou haptinizadas (Neurath, Fuss *et al.*, 1996; Dasgupta, Kesari *et al.*, 2001), superantígenos (Migita e Ochi, 1994), células sanguíneas heterólogas (Kagnoff, 1978), leucócitos alogênicos (Sayegh, Zhang *et al.*, 1992), extratos de pólen (Aramaki, Fujii *et al.*, 1994) ou de ácaros (Suko, Mori *et al.*, 1995), vírus ou bactérias inativados (Stokes, Newby *et al.*, 1979) e proteínas de plantas (Ma, Zhao *et al.*, 1997; Arakawa, Yu *et al.*, 1998).

Mostrou-se ser possível induzir tolerância oral para virtualmente todas as proteínas examinadas com exceção da toxina colérica (CT) e da enterotoxina de *Escherichia coli* (LT) (Elson e Ealding, 1984). Estas toxinas tem a capacidade não usual de atuar como adjuvantes, inclusive inibindo a indução de tolerância oral para outras proteínas coadministradas. Porém, a subunidade B da toxina colérica aumenta a indução de tolerância oral (Sun, Holmgren *et al.*, 1994).

A administração oral de antígenos pode suprimir diversas manifestações da reatividade imunológica, tais como:

- a) título de anticorpos de diversos isotipos no soro (Hanson, Vaz *et al.*, 1977; Vaz, Maia *et al.*, 1977; Melamed e Friedman, 1994);
- b) reações de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) (Miller e Hanson, 1979; Titus e Chiller, 1981);
- c) aparecimento de células secretoras de anticorpos (PFCs) (Richman, Chiller *et al.*, 1978; Titus e Chiller, 1981);
- d) ritmo de clareamento de antígenos da circulação (Hanson, Vaz *et al.*, 1979);
- e) proliferação de linfócitos T em cultura (Richman, Chiller *et al.*, 1978; Titus e Chiller, 1981) e
- f) secreção de citocinas (Fishman-Lobell, Friedman *et al.*, 1994; Melamed, Fishman Lovell *et al.*, 1996).

Apesar de inibir grande parte das manifestações da resposta imune, a tolerância afeta mais facilmente e prolongadamente a resposta imune celular, sendo necessárias doses menores do que as necessárias para a inibição da resposta imune humoral (Strobel e Ferguson, 1987). A hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) e respostas proliferativas também são mais facilmente inibidas em humanos (Husby, Mestecky *et al.*, 1994; Lee, Scherberg *et al.*, 1998; Kraus, Toy *et al.*, 2004). Interpretou-se estes dados como uma dicotomia na susceptibilidade de subtipos de linfócitos T auxiliares à indução de tolerância oral, onde citocinas do tipo Th1 como IL-2 e IFN- γ seriam mais facilmente inibidas que as citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10. Adicionalmente, a produção de anticorpos IgG1, dependente de IL-4, seria mais resistente a tolerância do que as respostas de IgG2a, dependentes de IFN- γ (Melamed e Friedman, 1994; Claessen, von Blomberg *et al.*, 1996).

No entanto, esta dicotomia não é uma propriedade intrínseca do fenômeno de tolerância oral, uma vez que a susceptibilidade de diferentes linfócitos T auxiliares a tolerância oral reflete a natureza do adjuvante utilizado no desafio antigênico nos animais. Assim, respostas Th2 são mais facilmente inibidas em modelos onde os animais são imunizados com adjuvantes polarizadores para resposta Th2, como o hidróxido de alumínio (Tobagus, Thomas *et al.*, 2004) ou a toxina colérica (Kato, Fujihashi *et al.*, 2001); enquanto que imunizações parenterais com adjuvante

completo de Freund revelam maior inibição de respostas Th1. É importante lembrar que a produção de IgE é particularmente suscetível à inibição pela administração oral do antígeno desde os experimentos iniciais na década de 1970 (Vaz, Maia *et al.*, 1977; Ngan e Kind, 1978; Saklayen, Pesce *et al.*, 1984), além de poder-se induzir tolerância em modelos de asma, mediados por linfócitos Th2 (Nakao, Kasai *et al.*, 1998; Russo, Jancar *et al.*, 1998).

1.7.1 O PAPEL DA IgA NA TOLERÂNCIA ORAL E NA MUCOSA INTESTINAL

Como resultado dos estudos iniciais da imunologia de mucosas, a tolerância oral foi inicialmente entendida como um fenômeno duplo: uma inibição sistêmica da reatividade imunológica paralela a uma imunização local, resultando na produção de IgA secretória (SIgA) específica ao antígeno ingerido (Swarbrick, Stokes *et al.*, 1979; Challacombe e Tomasi, 1980). Essa imunidade local seria importante para a imunoeclusão dos antígenos mediada pela IgA. O conceito de imunoeclusão foi a principal explicação para o aumento de IgA nas secreções de mucosas, e seria importante para proteger o organismo da invasão de bactérias patogênicas. Entretanto, com relação à tolerância oral não se verificou correlação entre o aumento da produção de SIgA específica e o resultado de tolerância oral quando comparadas diferentes linhagens de camundongos (Stokes, Swarbrick *et al.*, 1983). Em humanos, não foi detectada a presença de IgA específica a antígenos alimentares em indivíduos saudáveis (Mestecky, 2005). Outros estudos mostraram que a resposta secundária de IgA se mostrava normal (Kelly e Whitacre, 1996) ou suprimida nos animais tolerantes (Christensen, Kjaer *et al.*, 2003).

As IgAs secretadas nas mucosas compreendem anticorpos com afinidade variável (Macpherson, McCoy *et al.*, 2008). De forma geral, a IgA de alta afinidade neutraliza toxinas microbianas e patógenos invasores enquanto que as de baixa afinidade promovem o confinamento de bactérias comensais ao lúmen intestinal. Entretanto, esta distinção não é absoluta, pois IgA de alta afinidade foi descrita na regulação da microbiota comensal (Hapfelmeier, Lawson *et al.*, 2010) enquanto que IgA de baixa afinidade também pode proteger contra alguns patógenos (Franco e Greenberg, 1997; Wijburg, Uren *et al.*, 2006). As IgAs de alta afinidade parecem ser

produzidas por células B foliculares por mecanismo T dependente, enquanto que as de baixa afinidade surgiriam a partir de linfócitos B extra-foliculares estimulados de forma T independente (Fagarasan e Honjo, 2003). Entretanto, achados recentes mostram a existência de produção de IgA de forma T independente em células B foliculares (Suzuki, Maruya *et al.*, 2010).

A IgA também promove a manutenção adequada de comunidades microbianas no intestino grosso (Suzuki, Meek *et al.*, 2004). De fato, a IgA pode modular a expressão gênica de bactérias comensais, selecionando espécies com menor atividade inflamatória (Peterson, McNulty *et al.*, 2007). A IgA facilita o relacionamento com simbioses não somente na luz intestinal como também nas placas de Peyer (Obata, Goto *et al.*, 2010). Adicionalmente, a IgA promove a amostragem de antígenos luminais através da recaptção pela célula M de complexos antígeno-anticorpo (Mantis, Cheung *et al.*, 2002; Kadaoui e Corthesy, 2007).

Em camundongos deficientes para o receptor de Ig polimérica (pIgR), que são incapazes de secretar IgA para o lúmen, ocorre aumento da resposta imune a bactérias comensais, entretanto eles continuam capazes de desenvolver tolerância oral, não ocorrendo hipersensibilidade ao antígeno previamente ingerido (Karlsson, Johansen *et al.*, 2010).

Desta forma, os estudos mais recentes põem em cheque não somente o papel da IgA na tolerância oral como também ampliam o seu papel para além da proteção por imunoeclusão de patógenos, relacionando a produção de SIgA com a fisiologia da interação do organismo com a sua microbiota autóctone.

1.8 AUTO-TOLERÂNCIA E TOLERÂNCIA ORAL: COMPARANDO MECANISMOS

O aumento do interesse na tolerância oral nos anos 1970 surgiu, entre outros fatores, pela presença de novos mecanismos propostos para explicar a tolerância imunológica, como a supressão por células T. Desde então a tolerância oral segue sendo vista como um caso específico da tolerância imunológica, acompanhando os desenvolvimentos experimentais e mudanças teóricas desta última. A seguir, comparamos os mecanismos imunológicos propostos para explicar tanto a auto-tolerância quanto a tolerância oral.

1.8.1 CÉLULAS T SUPRESSORAS

Gershon e Kondo (Gershon e Kondo, 1970; Gershon e Kondo, 1971) mostraram que a resposta de linfócitos B contra hemácias de carneiro poderia ser especificamente inibida por linfócitos T. Além disso, esta tolerância poderia ser transferida para animais receptores não tolerantes. A este fenômeno Gershon deu o nome de “tolerância infecciosa” e os linfócitos T responsáveis pelo fenômeno foram chamados de supressores. Durante os anos 1970 o conceito de supressão imunológica tornou-se popular e foi utilizado como mecanismo explicativo em vários sistemas experimentais, como a incapacidade genética de responder a antígenos particulares e a tolerância por baixas doses de antígenos (*low-zone tolerance*).

A supressão da resposta imune teve mais implicações fundamentais para a teoria imunológica do que a descoberta das células T auxiliares. A sinergia entre linfócitos T e B para a produção de anticorpos foi acomodada na Teoria da Seleção Clonal sem maiores reformulações de seus princípios básicos. Ou seja, a resposta imune aumentaria com a proliferação dos clones correspondentes e a eliminação de células ou precursores que respondessem ao próprio corpo impediria a ocorrência de respostas autoimunes. Melvin Cohn e Rod Langman elaboraram o modelo de dois sinais para ativação de linfócitos (*two signal activation*) colocando em perspectiva a descoberta dos linfócitos T auxiliares (Cohn, 1994).

A introdução da proposta de ação de células T supressoras teve um impacto muito maior na teoria imunológica. A relação antes direta entre o estímulo antigênico e a aquisição da imunidade fica perdida, desde que o aumento dos linfócitos supressores leva a uma diminuição e não ao aumento da resposta imune. Por outro lado, a eliminação de clones supressores reativos a determinantes do corpo poderia, contraditoriamente, potencializar uma resposta autoimune. A contradição entre a ideia de supressão imunológica e a proposta central de Burnet fez com que a supressão sempre fosse vista com ceticismo pelos defensores da Teoria Clonal, como Cohn e Langman.

1.8.1.1 Tolerância oral e células T supressoras

Ngan e Kind (Ngan e Kind, 1978) apresentaram as primeiras evidências diretas sobre a geração de células T supressoras em camundongos alimentados com OVA por via oral. A supressão foi demonstrada pela capacidade de células do baço e das placas de Peyer transferirem a tolerância oral, inibindo a formação de anticorpos anti-OVA (IgG e IgE) em receptores singênicos normais. Apesar de uma única administração intragástrica de 20 mg de OVA resultar em tolerância, segundo estes autores, para se obter a indução de células supressoras com capacidade de transferir tolerância para receptores normais foram necessárias 8 ingestões de 20 mg de OVA por um período de 2 semanas em camundongos SWR.

Os linfócitos das placas de Peyer de animais tolerantes foram mais efetivos na supressão do que as células de baço, uma vez que 10^7 células de placas de Peyer suprimiram a formação de IgE enquanto foram necessárias 10^8 células de baço para produzir um efeito semelhante. Além disso, foram necessárias doses de 20 mg de OVA para induzir células supressoras esplênicas enquanto doses de apenas 1 mg foram suficientes para induzir células supressoras nas placas de Peyer. Estes resultados sugeriram que as placas de Peyer poderiam ser a fonte de células supressoras no baço e nos linfonodos após a administração oral do antígeno (Ngan e Kind, 1978).

Para Richman e colaboradores (Richman, Chiller *et al.*, 1978; Richman, 1979), a administração intragástrica de uma única dose de 20 mg de OVA em camundongos B6D2F1 é suficiente para a geração de células T supressoras no baço uma semana após a ingestão do antígeno. A transferência adotiva destas

células para receptores normais singênicos suprimia significativamente a formação de células formadoras de placas (PFC) anti-OVA subsequente à imunização intraperitoneal dos receptores com o antígeno. A depleção de linfócitos T antes da transferência impediu a inibição da formação de células formadoras de placas (PFC) nos receptores, apontando os linfócitos T como essenciais na transferência de tolerância oral.

Estudos usando tolerância oral no modelo de encefalite autoimune experimental (EAE) em ratos Lewis tolerizados com proteína básica de mielina (MBP), identificaram células T CD8⁺ supressoras (Lider, Santos *et al.*, 1989) que agiam via secreção de TGF- β (Miller, Lider *et al.*, 1992). Estas células transferiam a supressão *in vivo* e podiam suprimir *in vitro*.

Entretanto, surgiram evidências de que a geração de células T supressoras não seria o único mecanismo responsável pela indução e manutenção da tolerância oral. Hanson e Miller (Hanson e Miller, 1982) demonstraram que interferir na indução de células T supressoras, usando um fármaco citostático como a ciclofosfamida (Cy), 3 dias antes da ingestão de OVA em camundongos B6D2F1, não impedia a indução de tolerância oral, medida pelo teste de DTH, proliferação de linfócitos e título de anticorpos séricos específicos. Entretanto, a transferência adotiva de células do baço desses animais pré-tratados com Cy não transferia supressão para animais receptores. A reconstituição com células linfóides nos doadores restaurava a capacidade de transferir tolerância. Nesse estudo a presença de linfócitos T na reconstituição linfóide era fundamental para recuperar a transferência da supressão.

1.8.1.2 Declínio da Supressão

O conceito de supressão entrou em descrédito ao longo dos anos 1980 devido principalmente a dificuldade em se detectar com precisão os marcadores que pudessem identificar o linfócitos T supressores. A proposta de que a supressão era codificada por uma região especial do complexo H2, chamada I-J, nunca foi comprovada, o que também contribuiu para o desinteresse no estudo para o fenômeno da supressão.

O mecanismo de tolerância por deleção ganhou força com a descrição da deleção de linfócitos T no timo (Kappler, Roehm *et al.*, 1987) e os eventos inibitórios que não se enquadravam neste esquema receberam diversos mecanismos complementares para dar conta dos clones que “escapassem” da deleção central. Dentre os mecanismos complementares destacou-se a anergia clonal, descrita tanto para linfócitos B (Pike, Abrams *et al.*, 1983) quanto para linfócitos T (Rammensee, Kroschewski *et al.*, 1989; Schwartz, Mueller *et al.*, 1989).

1.8.2 DELEÇÃO CLONAL

A deleção dos clones autorreativos sempre foi o principal mecanismo proposto para a indução de tolerância a componentes do organismo (auto-tolerância) desde a primeira versão da Teoria de Seleção Clonal. Burnet propôs que os clones proibidos (autorreativos) deveriam ser eliminados na fase embrionária do organismo, quando o sistema imune ainda estaria imaturo. Somente assim seria possível garantir a ausência de reatividade imune aos auto-componentes. Joshua Lederberg fez a primeira alteração neste dogma Burnetiano ao propor que a deleção de linfócitos autorreativos ocorreria na fase imatura da vida do linfócito, e não na vida do organismo, uma vez que novos linfócitos são formados durante toda a vida do indivíduo (Lederberg, 1959). Assim, deveria existir outra forma de inibir os linfócitos produzidos continuamente em algum órgão linfóide central. O timo era um forte candidato pois era um órgão sem função conhecida e apresentava um grande número de linfócitos em apoptose. A primeira demonstração do seu papel crucial no desenvolvimento de um sistema imune normal ocorreu em 1961 quando Miller mostrou que camundongos timectomizados logo após o nascimento apresentavam tecido linfóides pouco desenvolvidos, respostas imunes deficientes e susceptibilidade a infecções recorrentes (Miller, 1961). A primeira evidência de que os linfócitos derivados do timo eram imunocompetentes foi observada quando demonstrou-se que estes linfócitos respondiam ao antígeno mas não eram capazes de produzir anticorpos, ajudando outros linfócitos derivados da medula óssea a se diferenciar em plasmócitos.

As experiências pró-deleção clonal ganharam um impulso importante com a descoberta dos superantígenos. Os produtos dos genes menores de estimulação linfocitária (Mls) foram chamados de superantígenos por estimularem uma grande

fração das células T (1:10 comparada a 1:100.000 para uma resposta imune típica). Essa alta frequência e a tendência surpreendente ao uso restrito apenas de algumas variedades de genes $V\beta$ nas respostas anti-MIs, transformaram o MIs em um modelo de escolha para o estudo da tolerância enquanto resultado de deleção clonal (Robey e Urbain, 1991).

Em camundongos, o produto do gene MIs-a é um antígeno capaz de interagir com determinados produtos do MHC (H-2k e H-2d) formando um ligante para grande parte do repertório de células T, incluindo quase todos os receptores que expressam o segmento $V\beta$ 8.1. A presença de MIs-a e do MHC apropriado durante o desenvolvimento das células T resulta na eliminação das células T que expressam o $V\beta$ 8.1 (Kappler, Staerz *et al.*, 1988).

A deleção clonal durante a ontogenia dos linfócitos T no timo também foi demonstrada em um sistema envolvendo o segmento gênico $V\beta$ 17a no TCR e o produto de classe II do MHC-I-E (Kappler, Roehm *et al.*, 1987). As células T expressando o segmento $V\beta$ 17a no TCR, o qual é fortemente associado a reatividade com I-E, podem ser detectadas na periferia de algumas linhagens I-E negativas. Entretanto, camundongos F1 do cruzamento de uma linhagem positiva e uma negativa para I-E, apresentam poucas células T expressando $V\beta$ 17a. Segundo Kappler e colaboradores, a perda da expressão de $V\beta$ 17a ocorreria por um mecanismo de deleção dos linfócitos T no timo. Números normais de timócitos duplo negativos expressando $V\beta$ 17a estavam presentes, porém o número de timócitos CD4+ ou CD8+ expressando $V\beta$ 17a mostrou-se muito diminuído.

1.8.2.1 Tolerância oral e deleção clonal

Experimentos em camundongos com os linfócitos apresentando TCR transgênico anti-Ova, sugeriram que altas doses de OVA poderiam induzir deleção clonal de linfócitos TCD4+ $V\beta$ 8.2+ nas placas de Peyer (Chen, Inobe *et al.*, 1995). Outros autores demonstraram que haveria deleção de linfócitos T CD4+ antígeno específicos após altas doses do antígeno por via oral em outros tecidos como baço e linfonodos periféricos (Marth, Zeitz *et al.*, 1999; Meyer, Benson *et al.*, 2001). Entretanto são necessárias doses muito altas de antígenos (até 500 mg diários) ou neutralização adicional de IL-2 (Marth, Zeitz *et al.*, 1999) para induzir deleção dos

linfócitos. Foi mostrado que administração de doses altas de antígeno a animais normais tornavam seus linfócitos susceptíveis a apoptose após a imunização parenteral com o antígeno em adjuvante (Garside, Steel *et al.*, 1996).

Entretanto, a deleção clonal não foi observada em um estudo utilizando camundongos TCR transgênicos (Chen, Inobe *et al.*, 1997) nem foi visto diretamente após transferência adotiva de número limitado de linfócitos TCR transgênicos (Van Houten e Blake, 1996). O uso desses animais com TCR transgênicos não são apropriados para o estudo da imunorregulação *in vivo* devido à proporção muito alta de linfócitos T idênticos, com alta afinidade pelo antígeno, o contrário da fisiologia do organismo. Simioni e colaboradores (2004) relataram não ser possível induzir tolerância oral a ovalbumina nestes animais transgênicos. De fato, a maioria dos experimentos com estes animais utilizaram a técnica de Kearney e colaboradores, onde as células de órgãos linfóides destes animais são transferidas adotivamente em quantidades determinadas para camundongos normais (Kearney, Pape *et al.*, 1994). Nos órgãos linfóides de animais receptores verifica-se a presença, expansão e migração dos linfócitos T específicos (originados dos camundongos transgênicos) através do anticorpo monoclonal KJ-1.26, que se liga ao TCR anti-Ova.

1.8.2.2 Críticas à deleção clonal

Na grande maioria dos trabalhos que apoiaram a ideia de deleção clonal, as células do clonotipo “deletado” são encontradas na periferia em níveis que variam de 0,2 a 15% e ainda assim os animais permanecem tolerantes (Blackman, Kappler *et al.*, 1990). Os melhores resultados que mostram a deleção tímica são baseados em superantígenos, como os MIs e enterotoxinas de estafilococos, que se ligam a um setor particular da região variável de algumas famílias V β específicas e podem não ser relevantes para a tolerância a antígenos convencionais (Herman, Kappler *et al.*, 1991). A timectomia neonatal em camundongos com 3 dias pós nascimento resulta em diversas doenças autoimunes o que revela a presença de linfócitos T potencialmente destrutivos em camundongos normais.

Precisamente para suprimir as células T que “escapassem” da deleção tímica, foram criados vários mecanismos complementares para inativar os linfócitos T na periferia: a exaustão clonal (Webb, Morris *et al.*, 1990; Moskophidis, Laine *et al.*, 1993; Rocha, Grandien *et al.*, 1995), o “aborto clonal” (*clonal abortion*) (Nossal e

Pike, 1975) e a anergia clonal (Pike, Abrams *et al.*, 1983; Rammensee, Kroschewski *et al.*, 1989; Schwartz, Mueller *et al.*, 1989).

1.8.3 ANERGIA CLONAL

O conceito de anergia clonal originou-se da observação experimental *in vitro* de que a ocupação do receptor antigênico da célula T na ausência de sinais co-estimulatórios não era um evento neutro. Na realidade, esta sinalização induzia a célula a um estado no qual ela se tornava incapaz de produzir IL-2 ao ser re-exposta ao antígeno em conjunto a sinais co-estimulatórios (Mueller, Jenkins *et al.*, 1989; Schwartz, 1990; Robey e Urbain, 1991; Kroemer e Martinez, 1992). A ativação adequada de linfócitos T leva a um crescimento no qual as células estimuladas proliferam em resposta a sua própria produção de IL-2 (estimulação autócrina). Portanto, a indução do estado de anergia, onde há uma drástica redução da produção de IL-2, impede a proliferação celular. Ocorre também modulação para outras citocinas como a IL-3 e IFN- γ que tem sua expressão reduzida em 87% e 33%, respectivamente (Schwartz, 1990).

Durante sua fase de indução a anergia é um processo ativo pois depende de síntese protéica, sendo inibida pela administração de ciclohexamida (Quil e Shwartz, 1987). A anergia pode ser evitada durante as primeiras 2 horas de ocupação do receptor de célula T *in vitro*, caso se adicione uma fonte de atividade co-estimuladora (Mueller, Jenkins *et al.*, 1989).

O estado anérgico já foi induzido *in vitro* em vários modelos. Em um deles, moléculas de MHC de classe II purificadas são inseridas em lipossomas e colocados sobre superfícies de plástico ou vidro. Durante o tempo de cultura (48h) as células T aumentam de tamanho mas não se dividem e uma re-etimulação com células apresentadoras de antígenos normais não induzem proliferação. A anergia também pode ser induzida pela estimulação de linfócitos T com Concanavalina A, mesmo na ausência de células apresentadoras (Schwartz, 1990). Essa lectina se liga a glicoproteínas presentes na superfície celular e interage com o TCR dos linfócitos T, ativando-os.

Esse conjunto de resultados provenientes de modelos de cultivo de células *in vitro*, tem sido frequentemente usado para explicar um possível mecanismo de

indução de tolerância *in vivo*. Assim, células T reativas ao *self* que não foram deletadas seriam ativadas de uma maneira que elas se tornem anérgicas, isto é, temporariamente incompetentes para mediar reações imunes. A ativação das células T CD4+, na ausência de sinais co-estimulatórios, provocaria uma diminuição seletiva da produção de IL-2, interrompendo assim a estimulação autócrina mediada por IL-2 (Schwartz, 1990; Robey e Urbain, 1991; Kroemer e Martinez, 1992).

1.8.3.1 Tolerância oral e anergia clonal

A possibilidade de ocorrência de anergia clonal na tolerância oral foi primeiramente sugerida por ensaios de diluição limitante e por experimentos onde a tolerância de linfócitos T poderia ser revertida *in vitro* com a administração de IL-2 exógena (Whitacre, Gienapp *et al.*, 1991). A responsividade a IL-2 e a incapacidade de transferência da supressão foram os critérios usados para definir a anergia clonal como o principal mecanismo da tolerância oral à altas doses de antígeno (Friedman e Weiner, 1994).

Em trabalhos com transferência adotiva de células T (TCR transgênico anti-Ova) verificou-se que as células T CD4+ antígeno específicas sofrem ativação e expansão clonal *in vivo* após a ingestão de doses tolerogênicas do antígeno. Esta ativação era similar aquelas seguidas da imunização com o antígeno em adjuvante porém mais limitadas e transientes. As células T de animais tolerantes passavam por menos divisões celulares e se tornavam não responsivas a re-estimulação subsequente com o antígeno (Sun, 2003).

Entretanto, a dicotomia entre anergia e supressão ativa não é completa, pois as células ditas anérgicas estão, na verdade, sendo ativadas de outra maneira, produzindo outras citocinas (por ex. IL-10, TGF- β) e até mesmo suprimindo outras células tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Cauley, Cauley *et al.*, 1997; Taams, van Rensen *et al.*, 1998; Takahashi, Kuniyasu *et al.*, 1998). De fato, células T CD4+ “anérgicas” de camundongos tolerantes orais a caseína podem mediar supressão ativa quando transferidas para camundongos SCID (Hirahara, Hisatsune *et al.*, 1995).

1.8.3.2 Crítica a anergia clonal

A anergia clonal foi duramente criticada nos anos de 1990 pelo grupo do imunologista português Antonio Coutinho, à época trabalhando no Instituto Pasteur, em Paris. Em um ensaio discutindo porque nem a deleção nem a anergia podem justificar satisfatoriamente a tolerância natural, os autores criticam a adoção generalizada da ideia de anergia como uma forma de indução de tolerância:

“... após uma série de publicações heterogêneas, a anergia se tornou o último refúgio para aqueles que só podem conceber a tolerância por inativação. Para os que mantinham a convicção de que a tolerância era devida à deleção, os achados recorrentes de linfócitos específicos em animais tolerantes surgiram como uma surpresa perturbadora. Que benção que se pudesse recorrer à anergia (“*What a blessing that anergy was around*”), porque agora tudo está de novo em ordem: Se a inativação não é uma deleção física, ela deve ser funcional e, portanto, a anergia é atribuída a todas as situações de tolerância onde a deleção não pode ser demonstrada. Em outras palavras, a anergia é uma explicação *ad hoc*, não uma conclusão experimental derivada de um grupo de achados, nem mesmo um modelo, sem mencionar uma teoria.” (Coutinho, Coutinho *et al.*, 1992).

Os autores sugerem que, ao invés de definir-se uma célula como anérgica, incapaz de responder, deveria se referir à anergia apenas como uma maneira de reação do linfócito em um teste particular que pode ou não estar relacionada com a tolerância.

Vários exemplos da literatura deixam evidente que linfócitos considerados “anérgicos” são capazes de participar de vários eventos imunológicos *in vivo*:

1- Linfócitos retirados de ductos torácicos de camundongos sofrendo uma reação enxerto contra hospedeiro (*graft versus host* – GvH) sistêmica não proliferam *in vitro* (e seriam classificados como anérgicos atualmente) mas, contudo, eles podem matar o hospedeiro (Ford e Atkins, 1971);

2- Uma injeção intravenosa de células de baço Mls1a em camundongos Mls1b induz uma resposta imune poderosa que envolve uma grande fração das células T CD4+, as quais não proliferam em testes *in vitro*

(Bandeira, Mengel *et al.*, 1991). Estas células respondedoras foram definidas como anérgicas (Lilliehook, Jacobsson *et al.*, 1975) mas os animais “anérgicos” produzem uma resposta acelerada para células antigênicas e ainda as eliminam mais rápido do que camundongos não anérgicos (Berumen, Halle-Pannenko *et al.*, 1983);

3- Blastos de células T reativas ao *self* naturalmente ativadas e isoladas *ex vivo* de animais normais atuam muito eficientemente em testes efetores para atividades auxiliares ou supressoras (Pereira, Larsson *et al.*, 1985). Contudo, apesar delas serem ótimas produtoras de IL-4 (Ben-Sasson, Le Gros *et al.*, 1990) nem proliferam, nem produzem IL-2 *in vitro* (Bandeira, Larsson *et al.*, 1987);

4- Animais transgênicos com expressão do transgene em um tecido específico, não conseguem deletar as células T específicas. Tal falha foi interpretada como uma tolerância ao *self* baseada na anergia, e, na maioria das vezes, foi realmente demonstrada ausência de respostas proliferativas *in vitro*. Ohashi e colaboradores (Ohashi, Oehen *et al.*, 1991) mostraram, porém, que uma infecção viral em tais camundongos resulta em destruição do órgão alvo, aparentemente pelas células consideradas anérgicas por outros.

1.8.4 CÉLULAS T REGULADORAS E A TOLERÂNCIA DOMINANTE

Quatro linhas experimentais independentes levaram a ressurreição das células T supressoras agora com o nome de reguladoras. A primeira foi o estudo da síndrome deflagrada em camundongos timectomizados pelo grupo de Shimon Sakagushi, no Japão. A timectomia em camundongos com 3 dias de vida induz diversas doenças autoimunes como ooforite, gastrite, tireoidite, orquite, variando de acordo com a linhagem utilizada. Esse autor foi o primeiro a fracionar células T supressoras envolvidas nesta síndrome usando o marcador de superfície CD5 (Iy1-1) (Sakaguchi, Takahashi *et al.*, 1982; Sakaguchi, Takahashi *et al.*, 1982). Eles mostraram que a transferência de células de baço CD5+, mas não CD5-, de camundongos normais adultos preveniam o desenvolvimento de doenças autoimunes após timectomia neonatal. Também mostraram que a transferência de

células CD5⁻ de um animal adulto normal para um camundongo *nude* (sem timo e sem linfócitos T maduros) levava ao desenvolvimento de doenças autoimunes similares aquelas induzidas pela timectomia neonatal, no entanto, a co-transferência de células CD5⁺ preveniam o desenvolvimento da doença. O que fica claro a partir destes experimentos é que camundongos adultos normais possuem células auto-reativas, potencialmente indutoras de doenças autoimunes, pois a simples retirada de uma população de linfócitos (CD4⁺CD5⁺) leva ao aparecimento destas doenças. Uma limitação importante neste modelo foi que o CD5 é expresso por 80 a 90% dos linfócitos, limitando o valor operacional para os estudos em células reguladoras.

Em 1995, Sakagushi mostrou que as células com esta atividade reguladora podiam ser segregadas a uma população que correspondiam de 5 a 10% dos linfócitos T CD4⁺ no baço (Sakaguchi, Sakaguchi *et al.*, 1995). O marcador que permitiu esta segregação foi o CD25, a cadeia alfa que confere alta afinidade ao receptor de IL-2 e um marcador de ativação para linfócitos T (Shevach, 2000). O estabelecimento de ensaios *in vitro* que mostravam a atividade supressora das células T CD4⁺CD25⁺ sobre células T CD4⁺CD25⁻ (Takahashi, Kuniyasu *et al.*, 1998) contribuiu consideravelmente para a posterior caracterização molecular destas células T reguladoras.

A segunda linha de experimentos veio dos estudos do grupo de Donald Mason, na Inglaterra. Em 1990, este grupo também relatou a existência de células T CD4⁺ reguladoras no baço de animais normais. Estas células T reguladoras foram caracterizadas pela baixa expressão da isoforma RB do marcador CD45, considerado um marcador de ativação/memória. A transferência de células T CD4⁺CD45RB^{high}, mas não de CD4⁺CD45RB^{low} ou de células T CD4⁺ totais, em animais *nude* induzia doenças autoimunes similares a doença enxerto contra hospedeiro (GVHD). A fração reguladora CD4⁺CD45RB^{low} era capaz de prevenir o desenvolvimento de autoimunidade induzida por timectomia neonatal e pela irradiação subletal (Mason e Powrie, 1990; Powrie e Mason, 1990). Esse sistema experimental foi posteriormente estendido para um modelo murino de doença inflamatória intestinal (IBD) onde camundongos SCID (*severe combined immunodeficiency* – imunodeficiência severa combinada) recebem células CD4⁺CD45RB^{high} de animais normais (Powrie, Mauze *et al.*, 1997). Era possível prevenir o desenvolvimento desta doença inflamatória intestinal pela co-

transferência de células T CD4⁺CD45RB^{low}. Posteriormente demonstrou-se que a atividade reguladora destas células também podiam ser segregadas na fração de células T CD4⁺ CD25⁺ (Read, Malmstrom *et al.*, 2000; Stephens e Mason, 2000), sugerindo uma base comum com o modelo experimental de Sakagushi.

O terceiro sistema experimental que também contribuiu para a visão moderna de células T reguladoras partiu do grupo de Herman Waldmann. O modelo experimental usado por este grupo consistia na tolerância a antígenos de histocompatibilidade menores (*minor*) pela administração de anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 não depletantes (Cobbold, Martin *et al.*, 1990; Qin, Cobbold *et al.*, 1993). A tolerância induzida por estes anticorpos era permanente, antígeno específica e mediada por células T reguladoras. O modelo para testar a tolerância consistia em enxertar tecidos incompatíveis em camundongos *nude* e transferir células T CD4⁺ de animais tratados com os anticorpos (tolerantes), ou de não tratados (não tolerantes). Somente os camundongos *nude* que recebiam células de animais tolerantes aceitavam o enxerto, ou aqueles que recebiam uma mistura de células de animais tratados e não tratados com os anticorpos (Cobbold, Adams *et al.*, 1996). Posteriormente estas células T reguladoras também puderam ser segregadas na fração CD25⁺ das células T CD4⁺ (Graca, Thompson *et al.*, 2002).

O quarto achado experimental partiu dos elegantes trabalhos feitos pelos grupos de Nicole Le Douarin e Antonio Coutinho, na França. O grupo de Nicole Le Douarin usava quimeras codorna/galinha para avaliar a migração de células do tubo neural e de células hematopoiéticas durante o desenvolvimento embrionário. Ao se inserir brotos de asas de embrião de codorna em embrião de galinha a quimera resultante rejeitava o membro estranho em duas semanas após a eclosão. Este resultado já contradiz frontalmente a previsão de Burnet de que haveria tolerância a tecidos implantados na vida embrionária. Porém se juntamente com o broto de asa fossem transplantado rudimentos tímicos de codorna as aves aceitavam o xenoenxerto até a vida adulta (Ohki, Martin *et al.*, 1987). Ou seja, as células T de galinha se diferenciavam em contato com dois epitélios tímicos: de galinha (provenientes de rudimentos tímicos remanescentes após a cirurgia no embrião) e de codorna (implantado). Assim as galinhas quiméricas possuíam células T diferenciadas no timo de galinha capazes de atacar o xenoenxerto, porém eram inibidas por linfócitos T diferenciados no timo de codorna. Este experimento foi

transportado para modelo murino, onde camundongos *nude* recebiam enxertos de epitélio tímico alogênicos e verificou-se que os animais tornavam-se tolerantes a enxertos de pele de camundongos da linhagem doadora do timo mas não de uma terceira linhagem. A tolerância era mediada por linfócitos T CD4+ e podia ser transferida para camundongos *nude* não quiméricos (Modigliani, Pereira *et al.*, 1995; Modigliani, Thomas-Vaslin *et al.*, 1995; Modigliani, Coutinho *et al.*, 1996).

Estes resultados experimentais foram grandemente expandidos para caracterizar a origem tímica destas células, sua autorreatividade fisiológica, seus mecanismos de regulação e a presença de um fator de transcrição característico desta população de células, o Foxp3. Outros trabalhos demonstram que o Foxp3 é uma molécula com participação fundamental no desenvolvimento e função das Tregs (Fontenot, Gavin *et al.*, 2003). Tal molécula vem sendo utilizada como um importante marcador destas células. Uma anomalia genética de Foxp3, é a causa primária de uma síndrome conhecida como IPEX (*immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*), uma doença humana que se manifesta como múltiplas doenças autoimunes, reações alérgicas graves e doenças inflamatórias intestinais (Kim e Rudensky, 2006).

1.8.4.1 Células T reguladoras na Tolerância Oral

Os estudos em tolerância oral foram um dos primeiros a fornecerem resultados indicando produção de células reguladoras na periferia. A indução de tolerância oral a antígenos de mielina em modelo murino de encefalomielite autoimune experimental (EAE) levou ao isolamento e clonagem da primeira célula T reguladora induzida pela tolerância oral. Elas foram chamadas de células Th3 pois apesar de terem similaridade com células Th2, como produção de IL4 e IL10, elas possuíam uma capacidade especial de produzir TGF- β (Miller, Lider *et al.*, 1992). Posteriormente foi demonstrado que a prevenção da EAE e a sua recuperação natural neste modelo era acompanhada pela produção de TGF- β (Khoury, Hancock *et al.*, 1992). Recentemente foi identificado nas células Th3 a expressão de LAP (*latent associated peptide*) na membrana celular. LAP é um pró-peptídeo que está não-covalentemente ligado a porção amino-terminal do TGF- β , formando um

complexo de TGF- β latente. Foi identificada população de células T CD4+CD25-LAP+ no baço que fazem parte da fração de células CD45RB^{low} e suprimem colite induzida por transferência adotiva de células CD4+CD45RB^{high}, de forma dependente de TGF- β (Oida, Zhang *et al.*, 2003). Também foram identificadas populações de CD4+CD25+LAP+ e CD4+LAP+ em camundongos. O TGF- β pode induzir a expressão de LAP na superfície de células T CD4+ independentemente da indução de Foxp3 (Oida e Weiner, 2010).

A citocina TGF- β é um dos mediadores mais estudados na tolerância oral. Ela está presente em abundância no intestino, sendo importante para regular a homeostase epitelial e a troca de isotipo para IgA. A produção aumentada desta citocina foi detectada em diversos estudos sobre tolerância oral (Chen, Inobe *et al.*, 1997; Weiner, 2001; Faria, Maron *et al.*, 2003) e outros trabalhos também têm evidenciado uma participação fundamental desta citocina na conversão de células T CD4+ CD25- em Tregs CD4+ CD25+ pela indução de Foxp3 (Huber, Schramm *et al.*, 2004; Chung, 2005; Faria e Weiner, 2005; Carrier, Yuan *et al.*, 2007), e na geração de células Th3 (Weiner, 2001).

Entretanto, é importante salientar que o resultado da ação da citocina TGF- β sobre os linfócitos T parece depender de um equilíbrio entre esta e outras citocinas presentes no microambiente, já que resultados recentes demonstram que na presença de IL-6 ou IL-21, TGF- β induz a diferenciação de células Th17, com características pró-inflamatórias e que desempenham um papel importante na patogênese de diferentes tipos de doenças auto-imunes (Korn, Bettelli *et al.*, 2007).

Outra população de células T reguladoras recebem o nome de Tr1 e são caracterizadas pela produção seletiva de IL-10. Essas células Tr1 são capazes de inibir a proliferação de células T CD4+ e de inibir o desenvolvimento de colite induzida em camundongos SCID pela transferência de células T CD4+CD45RB^{high} (Groux e al., 1997). Células produtoras de IL-10 com atividade reguladora foram demonstradas nas placas de Peyer de camundongos tratados por via oral com baixas doses de β -lactoglobulina (Tsuji, Mizumachi *et al.*, 2001).

A IL-10 tem recebido muita atenção nos trabalhos sobre tolerância oral, sendo que em alguns, foi demonstrado um aumento na sua produção após o tratamento oral com o antígeno (Chen, Inobe *et al.*, 1997; Faria, Maron *et al.*, 2003). Da mesma

forma que TGF- β , a IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias produzida em grande quantidade no intestino. Ela é capaz de suprimir a atividade de células Th1 atuando através da diminuição da expressão de moléculas co-estimuladoras e da produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno (Skeen, Miller *et al.*, 1996; Asseman, Mauze *et al.*, 1999). Além disso, a ativação crônica de células T CD4+ na presença de IL-10 resulta na diferenciação dessas células em clones com baixa capacidade proliferativa e que produzem altos níveis de IL-10 (células Tr1). No entanto, outros estudos questionam a relevância dessa citocina para indução da tolerância oral. Foi demonstrado que o tratamento com anticorpos monoclonais anti-IL-10 ou o uso de camundongos deficientes em IL-10, não altera nem a indução nem a manutenção da tolerância oral (Aroeira, Cardillo *et al.*, 1995; Gomes-Santos, Moreira *et al.*, 2012). Desta forma, o papel desta citocina na tolerância oral merece melhor investigação.

Células T reguladoras CD8+ também podem fazer parte da indução de tolerância oral (Lider, Santos *et al.*, 1989; Chen, Inobe *et al.*, 1995). Deficiência nestas células são observadas em pacientes com doença inflamatória intestinal, correlacionando com uma falha na indução de tolerância oral nestes pacientes (Brimnes, Allez *et al.*, 2005). Células epiteliais do intestino podem ativar linfócitos T CD8+ com atividade reguladora (Kraus e Mayer, 2005). Apesar de células T reguladoras CD8+ serem induzidas alguns estudos mostram que ela não é essencial na indução de tolerância oral, como é o caso de linfócitos T CD4+ (Garside, Steel *et al.*, 1995).

1.9 A TOLERÂNCIA REINTERPRETADA

Os experimentos de Medawar e colaboradores (Billingham, Brent *et al.*, 1953) demonstrando que enxertos de tecido alogênicos são aceitos (tratados como *self*) se o indivíduo é exposto a células hematopoiéticas do doador na vida embrionária ou perinatal formaram a convicção de que o *self* imunológico corresponde ao grupo de estruturas antigênicas que estão disponíveis para o reconhecimento imunológico em períodos críticos do desenvolvimento e a deleção dos clones reativos seria imprescindível para a tolerância imunológica.

Entretanto, Bandeira e colaboradores (1989) repetiram os experimentos de Medawar e mostraram que os animais que toleravam o aloenxerto apresentavam um número muito maior de linfócitos B, TCD4+ e TCD8+ ativados e reativos ao transplante. Por outro lado, os animais não tolerantes rejeitavam o enxerto sem aumentar consideravelmente o número de linfócitos reativos ao transplante. Os animais tolerantes que recebiam um segundo enxerto da mesma linhagem doadora apresentavam um aumento do tamanho do baço, com aumento correspondente no número de linfócitos B e T específicos e ativados. A esplenomegalia desenvolvida nestes camundongos tolerizados foi tomada como indicação de que a tolerância é um evento ativo e dominante e não depende exclusivamente da eliminação de linfócitos autorreativos (Bandeira, Coutinho *et al.*, 1989).

Assim, a alo-tolerância era exatamente o contrário do que postularam Medawar e seus colaboradores. Os animais que aceitavam o enxerto tinham muito mais células ativadas do que os animais que rejeitavam o enxerto. Essa mudança paradigmática ainda não foi completamente assimilada pela teoria imunológica. Mesmo a recém admitida autorreatividade fisiológica dos linfócitos T reguladores ainda se restringe a contenção da imunidade inflamatória sem um real papel ativo ou dominante na fisiologia do sistema imune.

1.10 TOLERÂNCIA ORAL – CAMINHOS PARA UMA REINTERPRETAÇÃO

A tolerância oral é um fenômeno robusto, de ocorrência natural e fisiológica, e depende da maturidade imunológica para acontecer. De fato, camundongos neonatos são menos susceptíveis a indução de tolerância oral (Hanson, 1981; Strobel e Ferguson, 1984). O defeito na indução de tolerância em neonatos pode ser revertido com a transferência adotiva de linfócitos de animais adultos (Peng, Turner *et al.*, 1989). Portanto, a tolerância oral é um contra-exemplo de tolerância imunológica para a visão burnetiana, segundo a qual somente seria possível haver tolerância em animais com o sistema imune imaturo. No caso da tolerância oral ocorre o inverso, somente é possível induzir tolerância em animais adultos, ou seja, imunologicamente competentes.

As proteínas da dieta são uma fonte de estimulação antigênica tão importante

para o desenvolvimento do sistema imune quanto a microbiota autóctone. Menezes e colaboradores (2003) demonstraram que as proteínas da dieta são essenciais para a maturação imunológica. Camundongos alimentados desde o desmame com dieta livre de proteínas intactas têm crescimento corpóreo normal, porém apresentam níveis baixos de IgG e IgA séricas e atrofia de órgãos e tecidos linfóides, como os linfonodos mesentéricos e o GALT, possuindo vilosidades alongadas e placas de Peyer pouco desenvolvidas. Além disso, a secreção de citocinas por diferentes órgãos linfóides é desviada para um perfil Th2, com alta concentração de IL-10 e IL-4 e baixos níveis de IFN- γ . Esses resultados demonstram, portanto, que a estimulação antigênica pelas proteínas da dieta após o desmame é essencial para a maturação do sistema imune (Menezes, Mucida *et al.*, 2003). Os efeitos imunológicos do consumo de dietas contendo aminoácidos livres na produção de imunoglobulinas podem ser revertidos pela introdução de proteínas na dieta, o que sugere que esses efeitos decorrem da baixa estimulação antigênica por antígenos dietéticos (Amaral, Foschetti *et al.*, 2006). Além disso, animais alimentados com dieta contendo aminoácidos livres são resistentes à indução da tolerância pela via nasal (Mucida, Rodriguez *et al.*, 2004).

A reatividade imunológica a antígenos que entram por via de mucosas não correlaciona diretamente com inibição total ou reatividade progressiva. Usando modelo de tolerância oral a ovalbumina, Bruno Verdolin e colaboradores (Verdolin, Ficker *et al.*, 2001) observaram que em animais tolerantes os títulos de anticorpos específicos anti-Ova atingiam um patamar inversamente proporcional a quantidade de antígeno administrado oralmente. Ou seja, quanto maior a quantidade de antígeno oferecida por via intragástrica, menor o patamar alcançado pelos títulos de anticorpos específicos. Mesmo com a continuidade das imunizações parenterais os títulos de anticorpos específicos em animais tolerantes mantinham-se no mesmo nível, enquanto que o de animais imunes mostravam um aumento progressivo. Verdolin mostrou também que a estabilização em patamares ocorria mesmo quando os títulos de anticorpos específicos não eram significativamente diferentes dos títulos de animais imunes, ou seja, quando a inibição da reatividade específica, característica da tolerância oral, não era observada após as duas primeiras imunizações. A partir desses dados conclui-se que a entrada do antígeno pela via de mucosas confere ao mesmo um status imunológico particular, onde o organismo não manifesta uma reatividade progressiva contra o antígeno, mesmo que a quantidade

do antígeno não seja suficiente para induzir tolerância oral.

A imunização de animais tolerantes orais com o antígeno previamente ingerido leva a profundas repercussões sistêmicas, capazes de inibir ou alterar uma variedade de fenômenos, como: resposta de anticorpos a antígenos não relacionados (Carvalho, Verdolin *et al.*, 1994); formação de granuloma de *Schistosoma mansoni* no pulmão (Carvalho, Lenzi *et al.*, 2002); reações de GvH (enxerto contra hospedeiro) (Vaz e Carvalho, 1994), diferenciação de eosinófilos na medula óssea (Rodrigues, Martins-Filho *et al.*, 2006); reações de hipersensibilidade tardia por injeção de carragenina (Ramos, Rodrigues *et al.*, 2009); deposição de colágeno em cicatrização de feridas de pele (Costa, Ruiz-de-Souza *et al.*, 2011); remodelamento cardíaco após infarto induzido por isoproterenol (Ramos, Dalbo *et al.*, 2012).

Diante destes dados entendemos que ainda falta muito para se compreender como se dão estas influências sistêmicas da tolerância oral. Pouco se sabe sobre a atividade imunológica global que acompanha a inibição da reatividade específica durante a indução e estabelecimento desse fenômeno. Nesta tese procuramos analisar e quantificar a atividade imunológica global, que engloba mas vai além da atividade específica, em animais tolerantes orais.

1.11 BREVE COMENTÁRIO SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL

A tolerância oral é um fenômeno inerentemente comparativo, pois decorre da tentativa frustrada em se estabelecer uma reatividade antígeno-específica progressiva em animais pré-alimentados com o mesmo antígeno. O fenômeno é baseado na comparação entre a atividade imunológica específica de pelo menos dois grupos: um que recebe o antígeno pela via oral antes de ser imunizado parenteralmente e outro grupo, somente imunizado. Espera-se que os animais que receberam o antígeno pela via oral antes de serem imunizados mostrem uma diminuição da reatividade específica quando comparados com os animais somente imunizados. A atividade imunológica específica a ser observada pode ser de dois ramos da atividade linfocitária: a relacionada aos linfócitos T, como na hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) e a relativa a atividade de linfócitos B, ou seja, a produção de anticorpos específicos. Qual a reatividade *in vivo* que pode ser

analisada depende do tipo de adjuvante utilizado. Isto porque cada adjuvante vai favorecer um tipo de resposta: ou mais celular ou mais humoral (produção de anticorpos). O hidróxido de alumínio não induz a uma reação de hipersensibilidade de tipo tardio (DTH) pois os tipos celulares e as citocinas envolvidas favorecem uma resposta do tipo Th2, ou seja, com maior produção de IL-4 e menor produção de IFN- γ e IL-12.

O modelo de indução de tolerância oral à imunização parenteral com ovalbumina, além de ser o mais usado nos estudos de tolerância oral, permite uma redução no tempo experimental e uma facilidade na observação dos fenômenos imunológicos específicos que se encontram inibidos. O uso de clara de ovo como fonte de ovalbumina para o tratamento oral dos camundongos foi demonstrado ser mais efetiva na indução de tolerância oral do que a ovalbumina purificada (dados não publicados). No caso das imunizações e nos testes específicos usou-se a forma purificada da ovalbumina.

A ingestão contínua e voluntária do antígeno pelos animais é mais eficaz para induzir a tolerância oral do que a gavagem intragástrica (Faria, Maron *et al.*, 2003) além de ser, obviamente, a forma mais fisiológica de encontro com os antígenos da dieta. O intervalo entre a administração oral e a imunização parenteral pode variar, podendo-se obter resultados de tolerização com intervalo de até 1 dia apenas (dados não publicados). Entretanto, outros estudos mostraram que há uma graduação na eficácia da indução de tolerância oral de acordo com o intervalo utilizado entre a ingestão do antígeno e a imunização primária, sendo o melhor resultado encontrado com o intervalo de 7 dias (Strobel e Mowat, 1998). Por este motivo, este foi o intervalo usado em nossos experimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a atividade imunológica sistêmica envolvida no fenômeno de Tolerância Oral.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Analisar a reatividade imunológica específica a ovalbumina em animais normais, tolerantes e imunizados usando como parâmetros a medida de anticorpos séricos específicos totais e dos isotipos IgG1, IgM, IgE e IgA;
2. Comparar a frequência e número de linfócitos B ativados (CD19+CD69+) e T CD4+ ativados (CD4+CD69+ e CD4+CD44^{hi}) e reguladores (CD4+CD25+CD45RB^{low}, CD4+CD25+LAP+, CD4+Foxp3+) no baço e linfonodos mesentéricos entre camundongos tolerantes e imunizados após a imunização secundária com o antígeno tolerado;
3. Comparar o número de células secretoras de imunoglobulinas totais no baço e na medula óssea dos isotipos IgG, IgM e IgA em animais tolerantes e imunizados após a imunização secundária com ovalbumina (OVA);
4. Analisar a reatividade imunológica global em animais normais, tolerantes e imunizados usando como parâmetros a medida de anticorpos séricos totais dos isotipos IgG1, IgM, IgE e IgA;
5. Comparar a produção das citocinas IL-2, IL4, IFN- γ , IL-10 e TGF- β produzidas pelas células do baço de camundongos tolerantes e imunizados após a imunização secundária com ovalbumina;
6. Determinar a cinética de aparecimento de linfócitos B ativados (CD19+CD69+) e T CD4+ ativados (CD4+CD69+ e CD4+CD44^{high}) e reguladores (CD4+CD25+CD45RB^{low}, CD4+CD25+LAP+, CD4+Foxp3+) de animais tolerantes e imunizados com 1, 2, 4 e 7 dias após a imunização primária com ovalbumina e hidróxido de alumínio;
7. Determinar a cinética de produção das citocinas IL-2, IL4, IFN- γ , IL-10 e TGF- β pelas células do baço de camundongos tolerantes e imunizados com 1, 2, 4 e 7 dias após a imunização primária com ovalbumina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos adultos jovens (entre 8 e 10 semanas de idade), fêmeas, da linhagem C57BL/6 obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO).

Durante todo o experimento, os camundongos foram mantidos sob condições adequadas no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG, alimentados com ração padrão para camundongos, água *ad libitum* e ciclo de luz de 12 horas. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (ver Anexo 1).

3.2 ANTÍGENO

Para as imunizações usou-se Ovalbumina (OVA) 3 vezes cristalizada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Para o tratamento oral foi utilizada solução de clara de ovo diluída em água na proporção de 1:5.

3.3 TRATAMENTO ORAL PARA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA

Para indução de tolerância oral a OVA, os camundongos receberam, *ad libitum*, uma solução de clara de ovo diluída 1:5 em água, durante 3 dias consecutivos, como única fonte de líquido, 7 dias antes da imunização primária. O consumo diário médio estimado foi de aproximadamente 20mg OVA/ camundongo. As garrafas contendo a solução de clara de ovo foram trocadas diariamente para evitar contaminação. Camundongos do grupo controle receberam apenas água como fonte de líquido durante todo o experimento.

3.4 IMUNIZAÇÕES PARENTERAIS

Imunizações parenterais foram realizadas 7 dias após o tratamento oral utilizando 10 µg de OVA e 1 mg de Al(OH)₃ (hidróxido de alumínio comercial

genérico) diluídos em 0,2 mL de salina fisiológica (0,85%) por via intraperitoneal (i.p.). Quatorze dias após, os camundongos receberam uma imunização secundária contendo 10 µg de OVA diluídos em 0,2 mL de salina, sem adjuvante, por via intraperitoneal.

3.5 OBTENÇÃO DE SORO SANGUÍNEO

Para obtenção do soro sanguíneo de forma seriada nos mesmos animais, retiramos 200µl de sangue através do plexo retro-orbitário. Analogamente, ao final do experimento os animais foram anestesiados utilizando 100µl de solução de Cloridrato de Ketamina (1,7 mg/Kg) e Xilazina (0,33mg/Kg). Em seguida, o sangue foi coletado através de uma incisão na veia axilar e coletado em tubos de centrifugação de 1,5 mL. Após a retração dos coágulos, o soro foi separado através de centrifugação das amostras, durante 10 minutos, a 300 g. O soro foi armazenado a -20°C para ser utilizado posteriormente nos ensaios de ELISA.

3.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA MEDIDA DE ANTICORPOS SÉRICOS

3.6.1 ELISA PARA MEDIDA DE ANTICORPOS ANTI-OVA

A avaliação dos anticorpos específicos anti-OVA presentes no soro dos camundongos foi realizada através do método ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4°C com 100µl de uma solução de OVA (20µg/ml para anticorpos séricos) em tampão de cobertura (tampão carbonato pH 9,6). No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200 µl PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente duas vezes em salina-Tween e incubadas com soro dos camundongos em diluição seriada de 1:100 a 1:12800 em PBS-caseína durante uma hora a 37°C. Como controle positivo e negativo, foram utilizados um soro imune e um soro normal,

respectivamente. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas com 100 μ l de uma solução de anticorpo de cabra anti-IgG1, IgM ou IgA de camundongo conjugado à peroxidase (Southern Biotechnology Ass, Inc.) na diluição de 1:15000 por uma hora à 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com 100 μ l de uma solução contendo 0,2 μ l/ml de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 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 μ l/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄). A absorbância (λ = 490 nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). Resultados expressos como ELISA* (ELISA-score), obtido através do somatório das densidades ópticas das 8 diluições (1/100 a 1/12800) multiplicadas por 1000. Essa forma de expressar os resultados é equivalente a mostrar curvas de titulação ou selecionar a absorbância em uma diluição particular como representativa, como já descrito em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Carvalho, *et al.*, 1994). Os resultados expressos nos gráficos foram obtidos pelo cálculo da média de cada grupo experimental (\pm erro padrão).

3.6.2 ELISA PARA MEDIDA DE ANTICORPOS TOTAIS

As placas de ELISA foram incubadas com solução (1mg/ml - 100 μ l/poço) contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos (*Southern Biotechnology*) diluídos (1:2000) em tampão carbonato pH=9,6 por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito aplicando-se 200 μ l/poço de uma solução de PBS-caseína 0,25% por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-Tween 0,05% por duas vezes. Para a dosagem de IgG1, IgM sérica o soro foi diluído 1:2000 e 1:100 para IgA sérica. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2) com o soro em PBS-caseína 0,25%, e as placas foram incubadas durante uma hora a 37°C. Anticorpos de cabra anti-IgG1, IgM ou IgA de camundongo conjugados com biotina 0,5mg/ml (*Southern Biotechnology*) e diluídos (1:10000) em PBS-caseína 0,25% foram adicionados aos poços (100 μ l/poço). As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37°C. A seguir,

foram lavadas e adicionou-se uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma) diluída à 1:15000 (100µl/poço) em PBS-caseína 0,25% durante uma hora a 37°C. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/mL de H₂O₂ e 4 mg/mL de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ($\lambda = 490$ nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

3.6.3 ELISA PARA MEDIDA DE IGE ANTI-OVA

As placas foram incubadas com solução (50µl/poço) contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongos 0,5 mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:250) em tampão carbonato (pH=9,6) por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 µl/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por duas vezes. O soro dos animais (50 µL) foi incubado por 2h em temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram novamente lavadas e realizada a incubação com Ovalbumina (OVA) biotinilada, 1µg/50µL PBS/poço, por 1h. As placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05%Tween e incubadas com peroxidase associada a estreptavidina (Sigma), 50µL/poço na concentração de 1:15000, por 1 hora. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H₂O₂ e 4 mg/mL de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato (pH 5,0) até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ($\lambda = 490$ nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

3.6.4 ELISA PARA MEDIDA DE IGE TOTAL

As placas foram incubadas com solução (50 μ l/poço) contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongos 0,5mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:250) em tampão carbonato (pH=9,6) por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 μ l/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por duas vezes. O soro dos animais (50 μ L soro) foi incubado por 2h em temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram novamente lavadas e realizada a incubação com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo conjugado à biotina, 50 μ L/poço, por 1h. As placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05%Tween e incubadas com estreptavidina ligada a peroxidase (Sigma), 50 μ L/poço na concentração de 1:15000, por 1 hora. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 μ L/mL de H₂O₂ e 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 μ l/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância (λ = 490 nm) de cada reação foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

3.7 ENUMERAÇÃO DAS CÉLULAS SECRETORAS DE IMUNOGLOBULINAS POR ELISPOT

A quantificação das células produtoras de anticorpos foi realizada por ELISPOT (ELISA SPOT ASSAY – ESA) das células do baço e medula óssea segundo o método descrito por Sedgwick e Holt e ligeiramente modificado pelo prof Tomaz Mota Santos do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Dia 1

Incubar, durante a noite a 4°C microplacas de poliestireno (NUNC) com anticorpos policlonais de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongo (2 μ g/ml; Southern Biotechnology, Birmingham, AL) diluído em tampão K1K2

(pH8,0 – 0,05M), 50µl/poço. Não adicionar o anticorpo em uma das linhas da placa para que esta sirva como controle negativo.

Dia 2

- a) Lavar as placas 3 vezes em PBS, mergulhando as placas numa cuba por 5 min;
- b) Saturar a placa (200µl/poço) com PBS caseína 0,25%, por 1 h à temperatura ambiente;
- c) Preparar a suspensão de células do baço;
- d) Contar as células viáveis;
- e) Preparar as diluições

Após as contagens, fazer os cálculos para ajustar as diluições. Para fazer as diluições, calcular apenas para a primeira diluição: Ig total (5×10^4 células no primeiro poço)

- f) Lavar as placas 3 vezes em PBS, mergulhando-as numa cuba sem esperar durante as lavagens;
- g) Colocar 100µl de meio completo em toda a placa, exceto no poço referente à primeira diluição. Neste poço colocar 200µl da suspensão de células na concentração adequada. Fazer as diluições seriadas (fator 0,5) na placa, a partir da primeira linha (200µl^o até a última, desprezando os 100µl finais, de forma que haja 100µl/poço da suspensão celular diluída em RPMI completo por toda a placa.

Não adicionar células em alguns poços para que estes sejam o controle negativo em relação às células.

- h) Incubar a placa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 horas. Durante a incubação ter o cuidado para não movimentar a placa.
- i) Lavar a placa uma vez em água contendo 0,05% de Tween 20 (para lisar as células), mergulhando-a rapidamente por 30 segundos aproximadamente.
- j) Lavar as placas 3 vezes em PBS-Tween 0,05%, mergulhando numa cuba por 5 min, para retirar os detritos da lise celular.
- k) Adicionar anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo (totais ou isotipos-específicos) marcados com biotina (50µl/poço) diluídos em PBS caseína 0,25%. Incubar as placas durante a noite a 4°C

Dia 3

- l) lavar as placas 3 vezes em PBS-Tween 0,05% usando uma cuba, por 5 min.
- m) Adicionar streptavidina-fosfatase (50µl/poço) na diluição indicada pelo fabricante (1:8000) e incubar por 1 horas a 37°C. Diluir a streptavidina em PBS-caseína 0,25%.
- n) Colocar 20mg de BCIP-Sigma B-6149 em 20ml de solução do substrato diluída e deixar agitando à temperatura ambiente e protegendo da luz por 1 horas.
- o) Lavar 5 vezes em PBS-Tween 0,05% por 5 min.
- p) Adicionar a solução com BCIP (50µl/poço) na placa e incubar durante a noite a 4 °C.
- q) Contar os spots e expressá-los como nº de spots/nº constante de células (nºspots/10⁶ células).

3.8 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Os baços foram retirados de cada animal e mantidos em meio de cultura incompleto em tubos FALCON de 15mL mantidos em gelo e ambiente estéril até o plaqueamento das células. Os baços foram macerados em um macerador de vidro estéril em 3mL de meio RPMI incompleto. As suspensões foram então transferidas para os tubos FALCON de 15mL e centrifugadas durante dez minutos a 300g, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e as hemácias presentes no *pellet* foram lisadas acrescentando-se 9 ml de água estéril seguida de PBS concentrado 10x. As suspensões celulares foram centrifugadas durante 10 minutos a 300g, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI completo.

O número de células viáveis nessa suspensão foi obtido contando-se alíquotas misturadas com uma solução de eritrocina em câmara de Neubauer. As concentrações das suspensões foram então todas padronizadas pela adição do volume necessário de meio RPMI completo para se obter 1x 10⁶ células/well/100µl para cultura de células.

As células foram plaqueadas (100 μ L/poço) em placas de 96 poços (Falcon, Lincon Park) e incubadas por 24 ou 48 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. As células foram estimuladas em cultura adicionando-se anticorpo anti-CD3 (1 micrograma/poço). Ao final do período de cultura as células foram usadas para quantificação de citocinas por RT- qPCR.

3.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) – PCR QUANTITATIVO

Extração de RNA total

A extração de RNA total de suspensão celular provenientes de cultura de células de baço murinos foi feito utilizando a técnica de fenol-clorofórmio na presença do reagente TRIzol (Invitrogen). O reagente TRIzol é uma solução monofásica de fenol e isotilcianato de guanidina correspondente a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski & Sacchi (1987).

Resumidamente, durante a homogeneização ou lise o reagente TRIzol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve seus componentes. A adição de clorofórmio seguida de centrifugação determina a separação das fases aquosa e orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, podendo, portanto, ser transferido com facilidade para outro recipiente, precipitado com Isopropanol e posteriormente ressuspendido em tampão TE. A simplicidade do método de extração utilizando o reagente TRIzol permite o processamento simultâneo de um grande número de amostras em curto espaço de tempo. O RNA total isolado com TRIzol é livre de proteínas e de contaminação com DNA. O rendimento das extrações utilizando-se 1mg de tecido (ou 10⁶ células em suspensão) varia entre 1.0 e 3.0 μ g/ μ l, podendo chegar a 7.0 μ g/ μ l dependendo do tecido a ser extraído.

Análise da integridade das amostras de RNA utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose

A integridade das amostras de RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1.0% contendo 0.5 μ g/ml de brometo de etídeo. O gel foi submerso em tampão TAE 1X, a eletroforese realizada a 100V por aproximadamente 50

minutos e a visualização feita em aparelho transiluminador na presença de luz ultravioleta.

Quantificação das amostras de RNA total por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 e 280nm (Nanodrop)

A quantificação das amostras de RNA total foi realizada por espectrofotometria no equipamento *NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific)*. A quantidade de RNA total em cada amostra experimental foi determinada medindo-se a absorbância a 260nm, considerando-se 1 DO equivalente a 50µg/ml de DNA e 30µg/ml de RNA. A determinação do grau de pureza, por sua vez, foi obtida, pela razão entre as leituras A260/A280 sendo esperado um valor próximo de 1.8.

Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) é uma fita complementar de DNA sintetizado pela ação da enzima transcriptase reversa a partir de uma sequência molde mRNA. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2µL de RNA total das amostras descritas anteriormente. Foram utilizados 1µL de *primer* oligo (dT) e 2µL de água livre de RNase/DNase. Posteriormente foram incubados à 70°C por 5 minutos, resfriando-a em gelo por 5 minutos. Depois de retiradas do gelo as amostras receberam 4µL de *ImProm-II™ 5X reaction buffer*; 1,2µL de MgCl₂ (25mM); 1µL de dNTP mix (10mM cada dNTP); 0,5µL de RNAsin; 1,0µL da enzima transcriptase reversa (RT), completando o volume com água livre de RNase/DNase para um volume final de 20µL. A transcrição reversa foi realizada a 25°C por 5 minutos (fase de anelamento), seguindo de 42°C por 1 hora (fase de extensão) e procedendo-se à inativação da enzima a 70°C por 15 minutos.

No final deste processo teremos a primeira fita de cDNA de todos os mRNAs presentes na amostra de RNA total que foram selecionados a partir da cauda poliA. Em seguida foi feita um PCR usando a *Taq* polimerase convencional e *primers* gene específico para avaliar a qualidade do cDNA e otimizar a reação de PCR.

Avaliação da expressão do RNAm por PCR em tempo real (qPCR)

O PCR em tempo real realiza a quantificação dos ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o

limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (CT). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência.

Na reação, utilizamos o reagente SYBR Green. Preparamos um mix para o número de amostras de cDNA contendo SYBR Green, *primers forward e reverse*, completamos com água e adicionamos cDNA, para um volume final de 10 μ L. Utilizamos os *primers β -actina*, IL2, IL4, IL10, Foxp3, INF γ e TGF- β para a realização do qPCR, conforme apresentado na tabela abaixo. Utilizamos a temperatura 94°C por 5 minutos; 40 ciclos para: 94°C por 1 minuto, x°C para cada *primer* por 1 minuto (onde x, é a temperatura específica do *primer* para amplificação do gene de interesse) e 72°C por 1 minuto; e 72°C por 10 minutos. Para a realização da PCR foi utilizando o equipamento *7.500 Real Time PCR System (AB – Life Technologies)*.

Tabela 1: Tabela descritiva dos primers utilizados, suas respectivas sequências de anelamento e temperaturas de amplificação

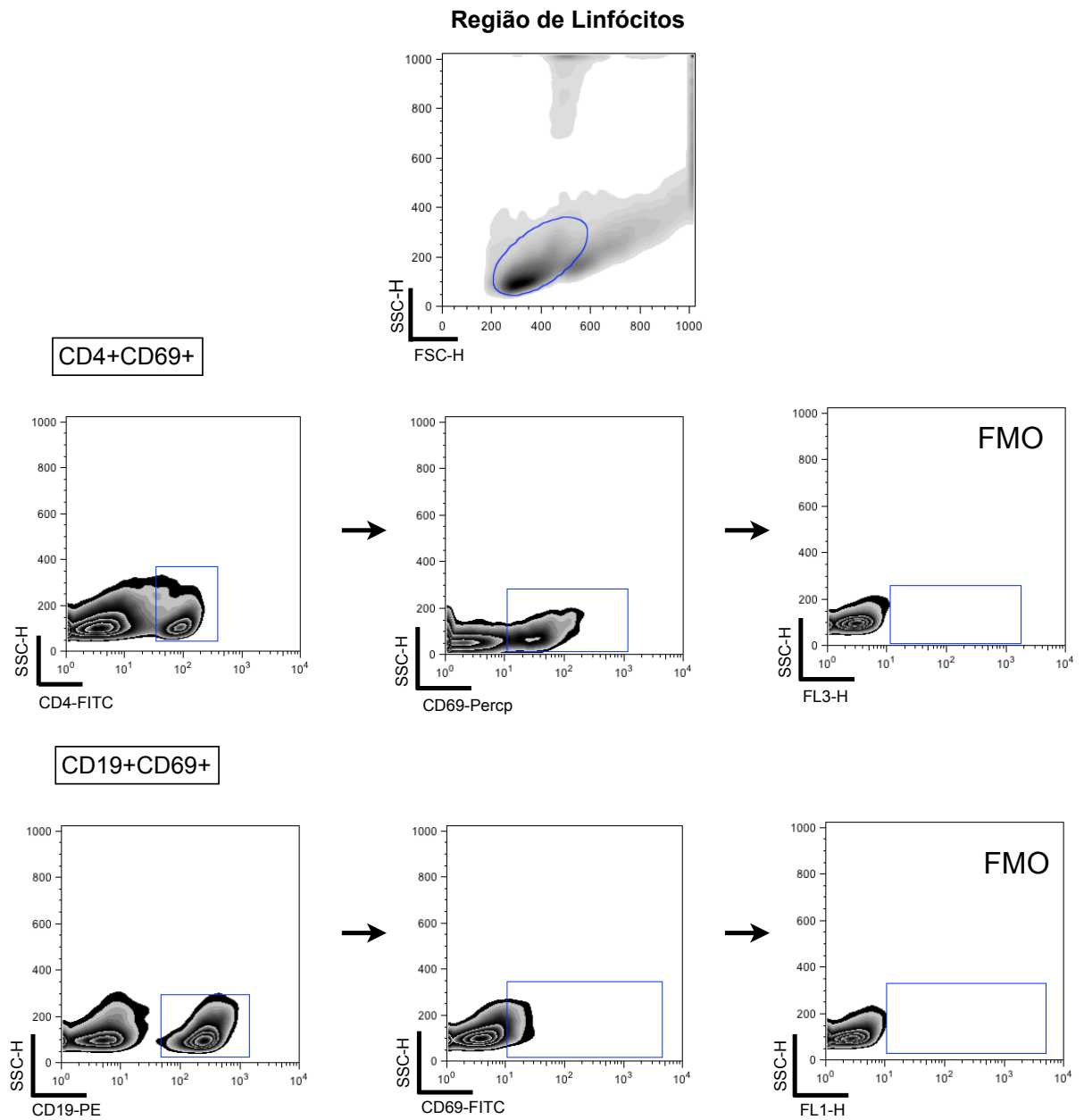
Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Temperatura de anelamento
β -actina	For: 5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3' Rev: 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	61°C
IL-2	For: 5'-CTCCTGAGCAGGATGGAGAATT-3' Rev: 5'-CGCAGAGGTCCAAGTGTAGCT-3'	66°C
IL-4	For: 5'-CATCGGCATTTTGAACGAGGTCA-3' Rev: 5'-CTTATCGATGAATCCAGGCATCG-3'	68°C
IL-10	For: 5'-AAGCTGAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGCG-3' Rev: 5'-AGCTATCCCAGAGCCCCAGATCCGATTTTGG-3'	97°C
TGF- β 1	For: 5'-GCAACATGTGGAAGTCTACCAG-3' Rev: 5'-CAGCCACTCAGGCGTATCA-3'	63°C
INF- γ	For: 5'-CAGCAACAGCAAGGCGAAA-3' Rev: 5'-CGCTTCCTGAGGCTGGATT-3'	59°C

3.10 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS DO BAÇO E DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após a retirada dos linfonodos mesentéricos e baço seguiram-se os seguintes passos.

Em uma placa de 96 poços de fundo em U foram colocados 25 μ L de suspensão celular (250.000 – 500.000 células/well) e 10 μ L de anticorpos (na diluição padronizada) conjugados com fluorocromos – PE (ficoeritrina), FITC (fluoresceína) ou CyChrome (Cy) – que se ligam às moléculas de interesse, tais como CD4, CD8, CD25, Foxp3, CD44 e LAP, expressas nas células de camundongos. As placas foram então encubadas a 4°C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foram então acrescentados 200 μ l de PBS-azida/poço para lavagem da placa que foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 300g. Essa lavagem foi realizada por três vezes. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuspensionado em 200 μ L de paraformaldeído 1% e as suspensões armazenadas a 4°C protegidas de luz até aquisição dos dados no equipamento BD 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 10 μ L 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 utilizamos o kit de fixação e marcação da eBioscience, conforme protocolo fornecido pelo fabricante. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuspensionado em 200 μ l de paraformaldeído 1% e as suspensões armazenadas a 4°C e protegidas de luz até aquisição dos dados no citômetro BD FACScan. Em todos os órgãos foram utilizados os anticorpos IgG1 ou IgG2 FITC, PE ou CyChrome para controle de isotipo. Também foram realizados controles para melhor determinação da região (*gate*) ideal foram feitos controles do tipo fluorescência menos um (*Fluorescence minus one*) onde todos os anticorpos do *pool* estão presentes menos aquele de interesse para a marcação em questão (Herzenberg, Tung *et al.*, 2006). A estratégia de *gating* e os controles FMO estão demonstrados na figura 1. A aquisição dos dados foi realizada utilizando um BD FACScan de três cores (Becton Dickison,

Mountain View, Califórnia). A porcentagem de células positivas e a média de intensidade de fluorescência foram analisadas com o auxílio do programa FlowJo (TreeStar).



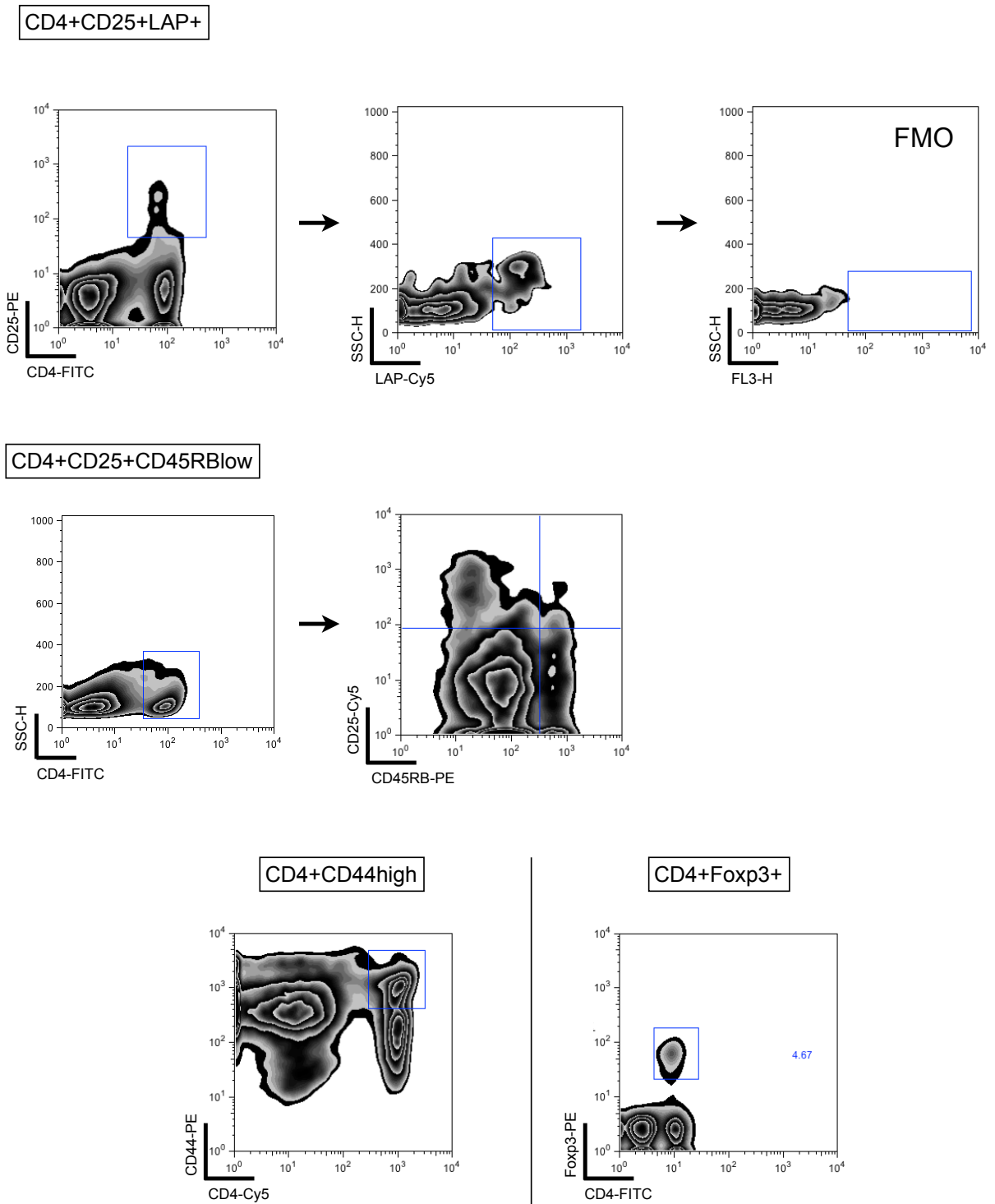


Figura 1: Estratégia de *gating* para os experimentos de citometria de fluxo. Células de baço ou de linfonodos mesentéricos foram coletadas e submetidas a análise de citometria de fluxo. A região de linfócitos foi estabelecida com base no tamanho relativo (*forward light scatter*) e complexidade citoplasmática (*side angle scatter*). A sequência de regiões (*gates*) foi estabelecida de acordo com as marcações. A definição das regiões (*gate*) de interesse foi baseada em controles de fluorescência menos um (do inglês *fluorescence minus one* – FMO) onde as células são marcadas com todos os anticorpos menos aquele de interesse para o *gating*.

tabelas no Microsoft Word ® parte integrante do pacote Office 2008 para Mac OSX. Utilizamos como nível de significância mínima 5%. Classificamos a significância através de símbolos da seguinte forma:

*	#	p<0,05
**	##	p<0,01
***	###	p<0,001

4. RESULTADOS

4.1 INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL À OVALBUMINA

Como o objetivo de nosso estudo foi avaliar a atividade global do sistema imune durante o desenvolvimento da tolerância oral, o primeiro passo foi verificar a presença do estado tolerogênico, ou seja, a inibição da produção de anticorpos específicos à ovalbumina. Para este fim, medimos os títulos de anticorpos séricos anti-Ova antes e após as imunizações (primária e secundária) em animais tolerantes, imunes e normais (Fig. 3).

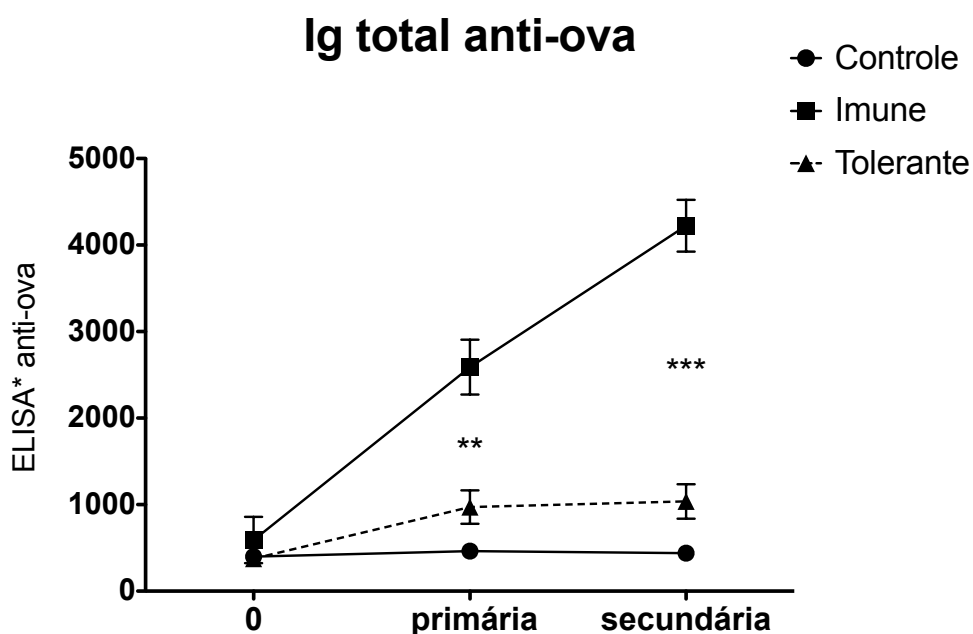


Figura 3: Títulos séricos de Ig total anti-Ova. Foram obtidos soros de Camundongos C57BL/6 antes do protocolo de imunização e após cada imunização. Animais Tolerantes (▲) receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados intraperitonealmente (i.p.) com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados (■) passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo anteriormente. Animais controle (●) foram imunizados somente com salina. Os títulos de Ig sérica anti-ova estão expressos em ELISA score (ver materiais e métodos). Significância estatística medida por ANOVA com pós-teste de Tukey.

Podemos observar que os títulos de anticorpos séricos anti-ova aumentaram progressivamente nos animais imunizados após cada imunização. Contrariamente, os títulos séricos de anticorpos anti-ova nos animais tolerantes não aumentaram, mantendo-se estatisticamente indistinguíveis dos títulos observados em animais controle.

Este dado confirma que o nosso modelo de tolerância oral estava funcional e permitiu-nos verificar a fase após imunização secundária como sendo a ideal para a melhor distinção entre animais tolerantes e imunizados.

Para averiguar se a inibição de anticorpos específicos se estendia a todas as classes de imunoglobulinas medimos os títulos séricos de anticorpos anti-ova das classes IgE, IgG1, IgM e IgA após a imunização secundária (Fig. 4).

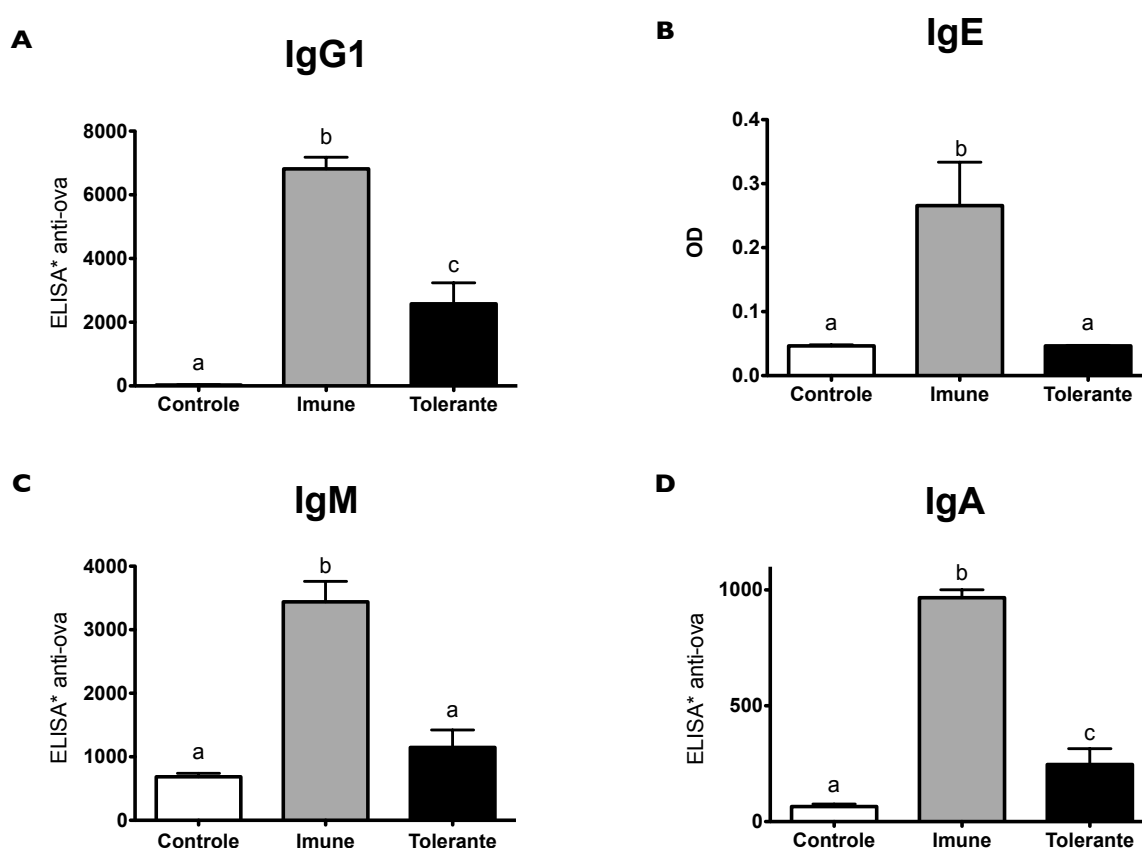


Figura 4: Títulos séricos de IgG1, IgE, IgM e IgA anti-Ova em animais Controle, Imunizados e Tolerantes após a imunização secundária. Animais Tolerantes receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo anteriormente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Os títulos de Ig sérica anti-ova estão expressos em ELISA score (ver materiais e métodos). OD = densidade óptica (*optical density*). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós teste de Tukey (P<0,05).

Verificamos que a supressão da reatividade específica ocorre em todas as classes de Ig. As classes IgG1 e IgE são tipicamente induzidas neste modelo de imunização com hidróxido de alumínio, sendo a resposta de IgE a mais facilmente inibida. Ocorre também supressão da IgM e IgA anti-ova (Fig. 4 C-D). Nota-se que os animais tolerantes possuem maiores títulos de IgA e IgG1 específicos que animais controle (Fig. 4). Ou seja, a inibição da reatividade específica no tolerante é geral – ocorrem em todas as classes – mas não é absoluta, pelo menos em nosso modelo e referentes a estas duas classes de imunoglobulinas.

4.2 PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS EM ANIMAIS TOLERANTES E IMUNIZADOS APÓS A IMUNIZAÇÃO SECUNDÁRIA

Com a confirmação do estado de tolerância nos camundongos em estudo, nosso próximo passo foi verificar o perfil de linfócitos ativados no baço e linfonodos mesentéricos após a imunização secundária, quando ocorre a maior diferença entre a reatividade imunológica específica entre tolerantes e imunizados.

Para cumprir tal objetivo, removemos as células do baço e dos linfonodos mesentéricos 7 dias após a imunização secundária. Submetemos as células a análise fenotípica por citometria de fluxo, marcando linfócitos T CD4+CD69+ e B CD19+CD69+ (linfócitos recém ativados), linfócitos T CD4+CD44^{hi} (efetores/memória) e os linfócitos T reguladores CD4+CD25+CD45RB^{low}, CD4+CD25+LAP+ e CD4+Foxp3+. Os dados estão apresentados tanto em porcentagens de células quanto em número absoluto das mesmas (Fig. 5 e 7). Apresentamos também gráficos de citometria representativos de cada grupo (Fig. 6 e 8).

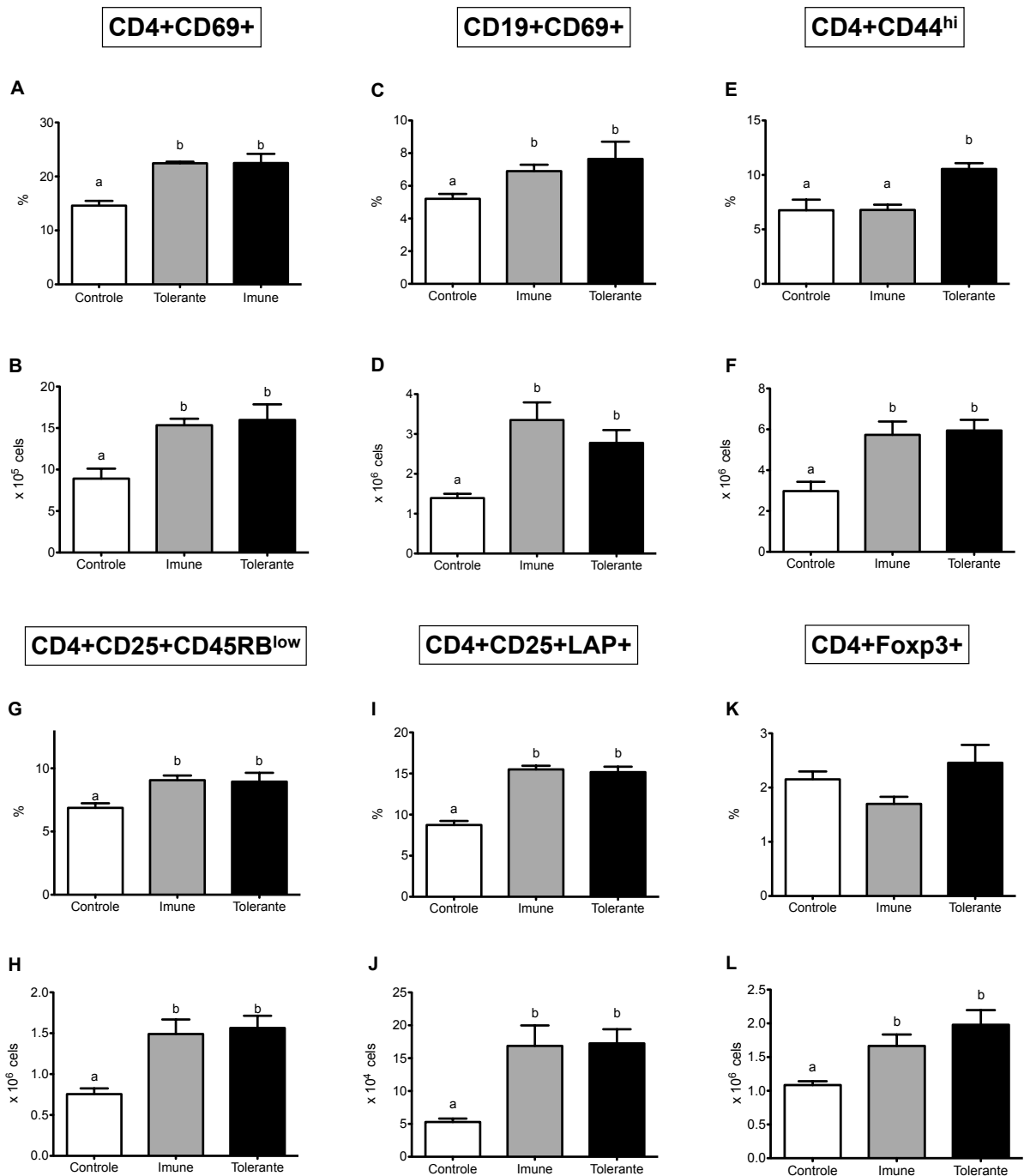


Figura 5: Fenótipo de linfócitos ativados no baço de animais Controles, Imunizados e Tolerantes após a imunização secundária. Animais Tolerantes receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo anteriormente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram mortos e tiveram seus baços retirados para análise fenotípica por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em porcentagem e número absoluto de células. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey (P<0,05).

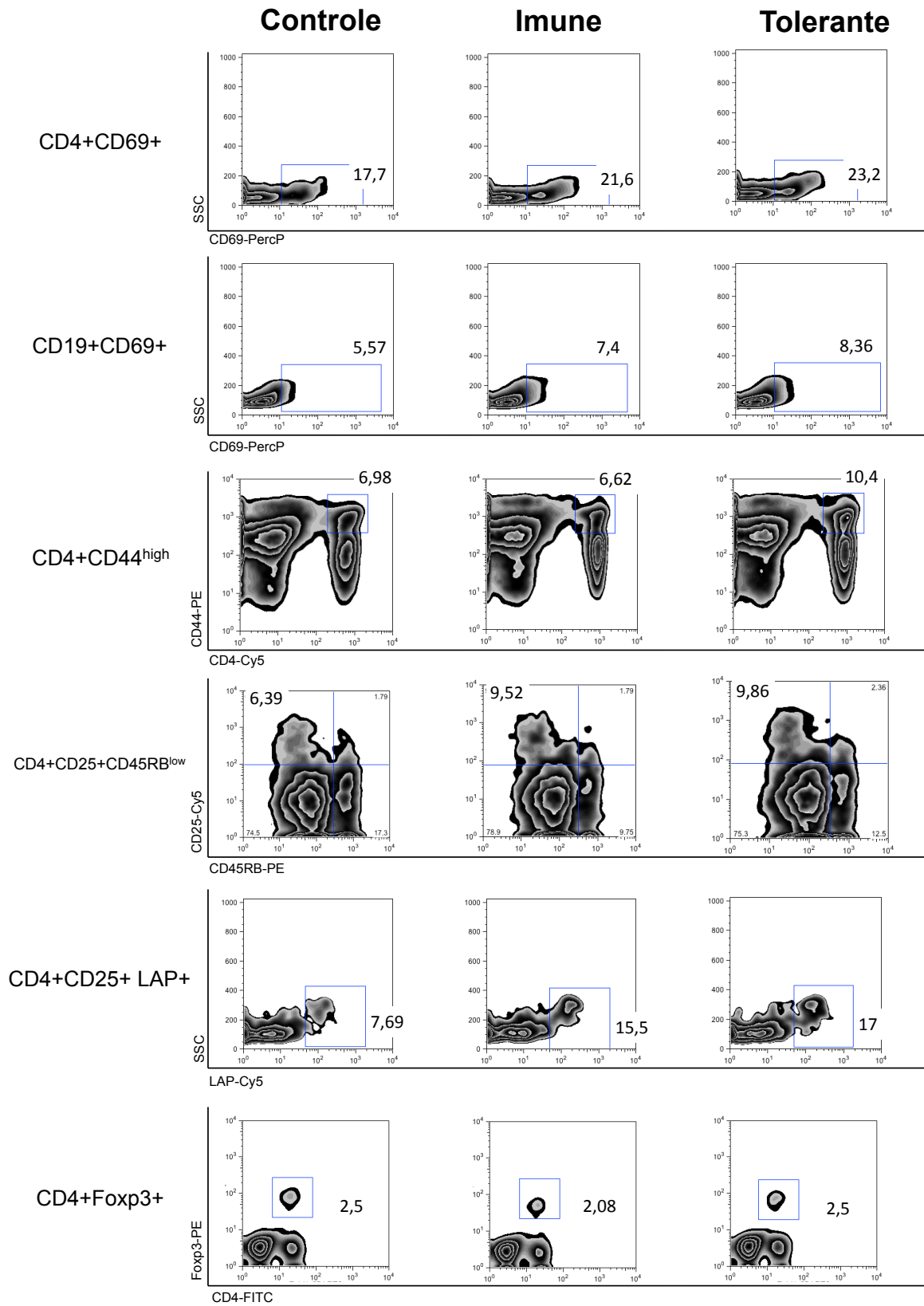


Figura 6: Gráficos *dotplots* representativos dos fenótipos de linfócitos no baço, apresentados na figura 5.

Com relação aos linfócitos presentes no baço, os animais tolerantes e imunizados apresentam um aumento similar no número e porcentagem de linfócitos recém ativados (T CD4+CD69+ e B CD19+CD69+) e de linfócitos T reguladores (CD4+CD25+CD45RB^{low}, CD4+CD25+LAP+ e CD4+Foxp3+) quando comparados aos animais controles (Fig. 5). Apesar de não haver diferença entre as porcentagens dos linfócitos T CD4+Foxp3+ entre os grupos nesta fase, o número absoluto destas células apresentam-se aumentados tanto em animais tolerantes quanto em imunizados, quando comparados aos animais controles (Fig. 5 K,L). Os animais tolerantes mostraram ainda uma maior porcentagem de linfócitos T CD4+CD44^{high} porém com um número de células igual ao dos animais imunizados (Fig. 5F). Assim, os animais tolerantes apresentam uma ativação linfocitária abundante, similar a dos animais imunizados, ao mesmo tempo em que mostram inibição da reatividade específica. É importante salientar que os animais imunizados possuem o mesmo número de linfócitos T reguladores observados em animais tolerantes.

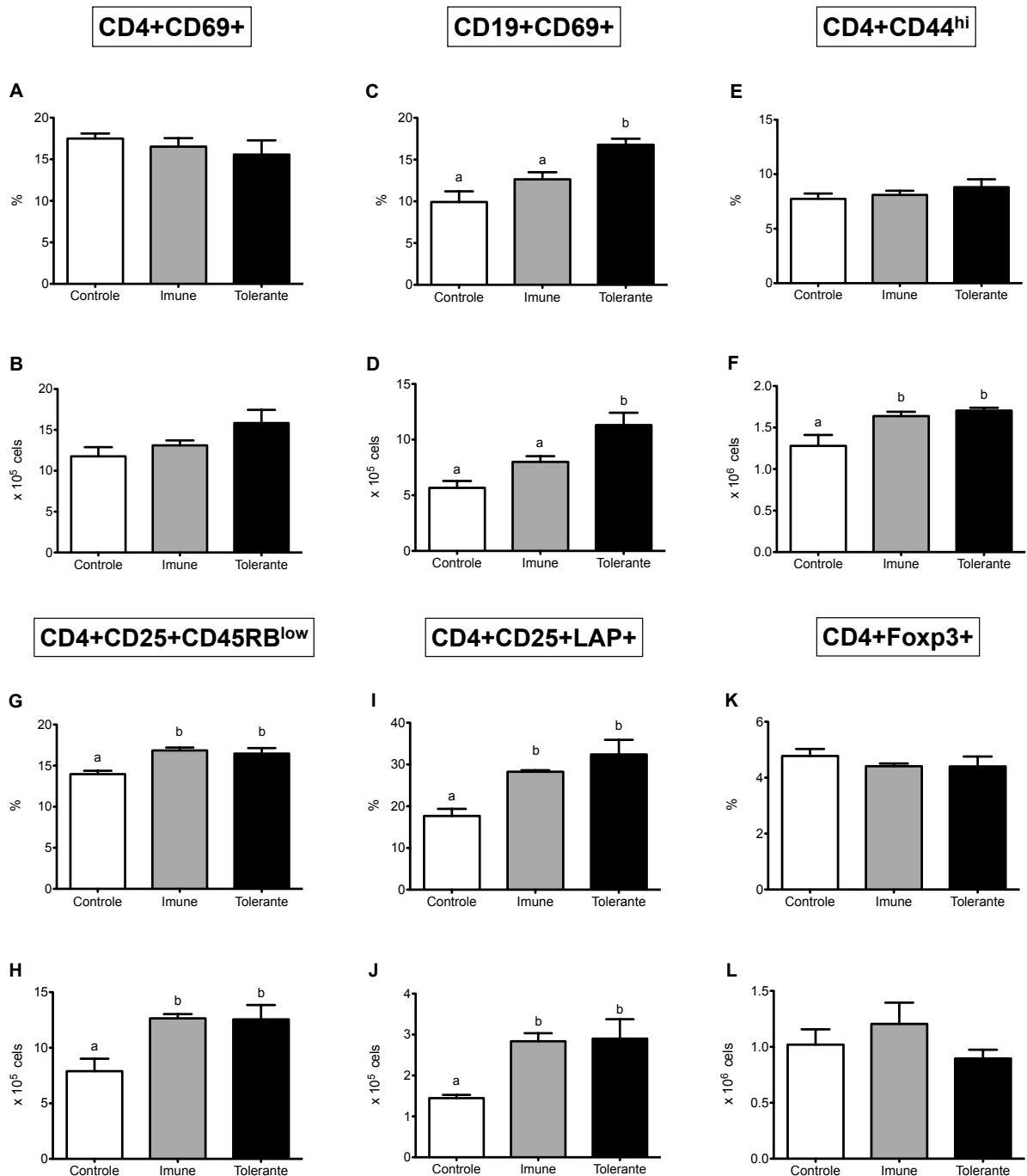


Figura 7: Fenótipo de linfócitos ativados nos linfonodos mesentéricos de animais Controles, Imunizados e Tolerantes após a imunização secundária. Animais Tolerantes receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Quatorze dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais Imunizados passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo previamente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Sete dias após a imunização secundária, os animais foram mortos e tiveram seus baços retirados para análise fenotípica por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em porcentagem e número absoluto de células. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey (P<0,05).

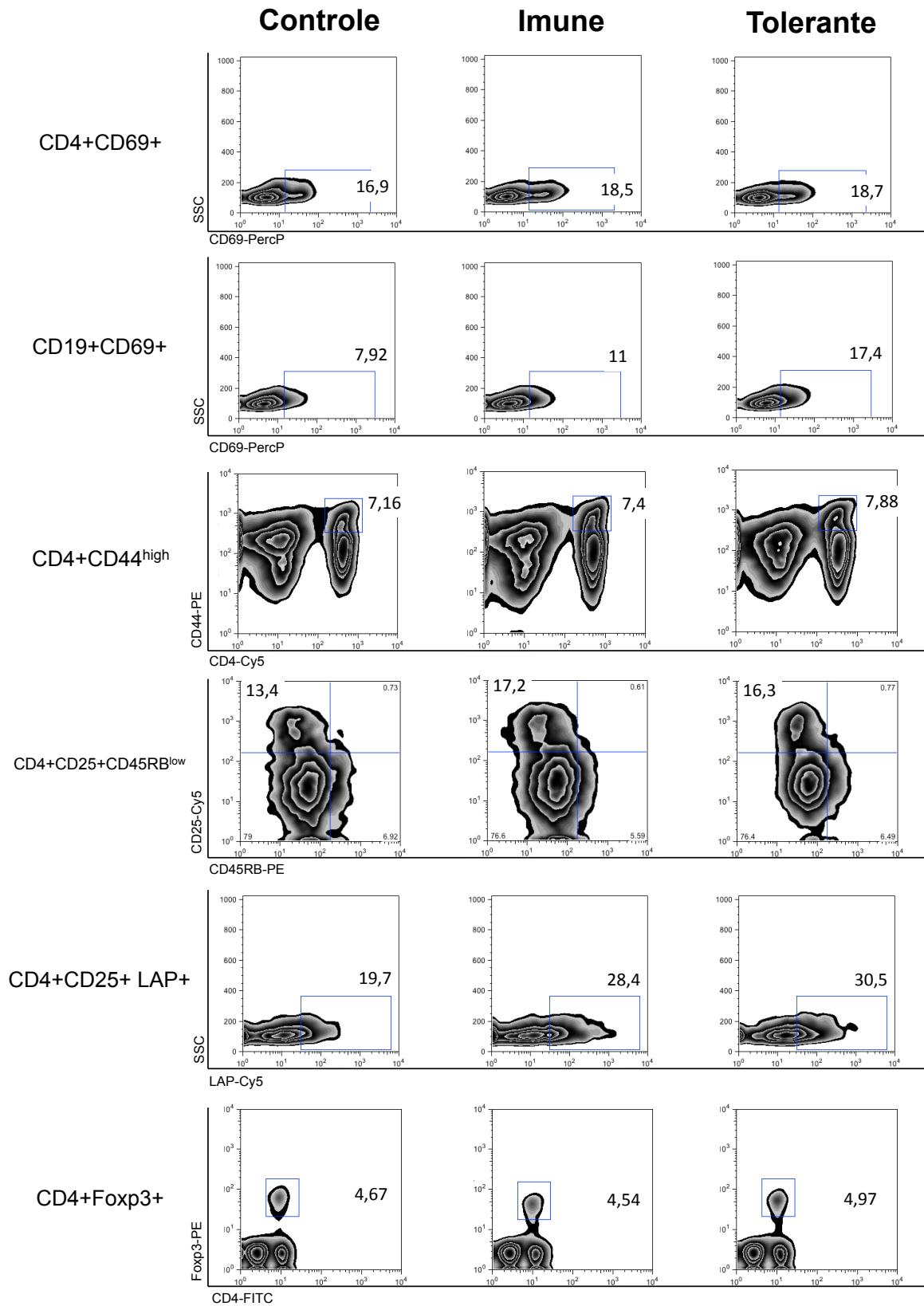


Figura 8: Gráficos *dotplots* representativos dos resultados de fenótipos de linfócitos em linfonodos mesentéricos, apresentados na figura 7.

Nos linfonodos mesentéricos não observamos diferenças nos números de células e porcentagens de linfócitos T CD4+CD69+ entre os grupos. Entretanto os animais tolerantes apresentam maior número de linfócitos B recém ativados (CD19+CD69+). Tanto animais imunizados e tolerantes apresentam maior número de linfócitos T CD4+CD44^{hi} do que animais normais, apesar de não haver diferença entre as porcentagens destes grupos.

Assim como no baço, o número de linfócitos T reguladores (CD4+CD25+CD45RB^{low} e CD4+CD25+LAP+) nos linfonodos mesentéricos de animais tolerantes e imunizados estão aumentados quando comparados aos camundongos controles mas não diferem entre si (Fig. 7 G-J). Não foram observadas diferenças significativas na frequência ou número de células T CD4+Foxp3+ entre os grupos (Fig. 7 K,L).

Até aqui vimos que os animais tolerantes e imunizados apresentam uma manifesta similaridade no número e porcentagens tanto de linfócitos ativados quanto de células T reguladoras, tanto no baço quanto nos linfonodos mesentéricos. As únicas exceções sendo os linfócitos B recém ativados nos linfonodos mesentéricos, que estão presentes em maior frequência e número em animais tolerantes (Fig. 7 C,D).

A similaridade dos números de linfócitos T reguladores entre tolerantes e imunizados no baço foi um achado aparentemente desafiador pois poderia se esperar que justamente na fase onde os animais tolerantes apresentam maior inibição da reatividade específica, estas células deveriam estar em maior número nestes animais.

Quais seriam as diferenças inerentes ao sistema imune destes animais que pudessem dar conta de explicar estas inconsistências?

4.3 ATIVIDADE LINFOCITÁRIA GLOBAL EM ANIMAIS IMUNIZADOS E TOLERANTES

A igualdade observada no fenótipo de linfócitos ativados entre animais tolerantes e imunizados, mesmo diante da inibição da reatividade específica, nos levou a quantificar as células secretoras de imunoglobulinas (CSI) no baço e na medula óssea por Elispot. Mensuramos as CSI secretoras de Ig total após a imunização primária e após a imunização secundária (Fig. 9). Após a imunização secundária, quantificamos as CSI secretoras de Ig total e IgG, IgM e IgA tanto no baço (Fig. 10 A-C) quanto na medula óssea (Fig. 10 D-F). Paralelamente, dosamos as imunoglobulinas séricas totais nestes animais (Fig. 9).

Ao analisarmos as células secretoras de imunoglobulinas (CSI) no baço e na medula óssea observamos que os animais tolerantes possuem o mesmo número de CSI que os animais imunizados após a imunização primária (Fig. 9 A e C). Após a imunização secundária, o número de CSI nos tolerantes supera o dos animais imunizados (Fig. 9 B e D) nos dois órgãos linfóides. Ao discriminar o perfil de classes de imunoglobulinas produzidas por estas células verificamos que os animais tolerantes possuem mais CSI secretando IgA e IgM no baço (Fig. 10 B,C) e IgG e IgM (Fig. 10 D,E) na medula óssea, enquanto que os animais imunizados tem sua produção de Igs focadas em IgGs no baço (Fig. 10 A).

Portanto, os animais tolerantes apresentam uma produção crescente de células secretoras de imunoglobulinas ao longo das imunizações parenterais com o antígeno tolerado. Entretanto, a produção de imunoglobulinas está distribuída nas classes IgM e IgA no baço e IgG e IgM na medula óssea.

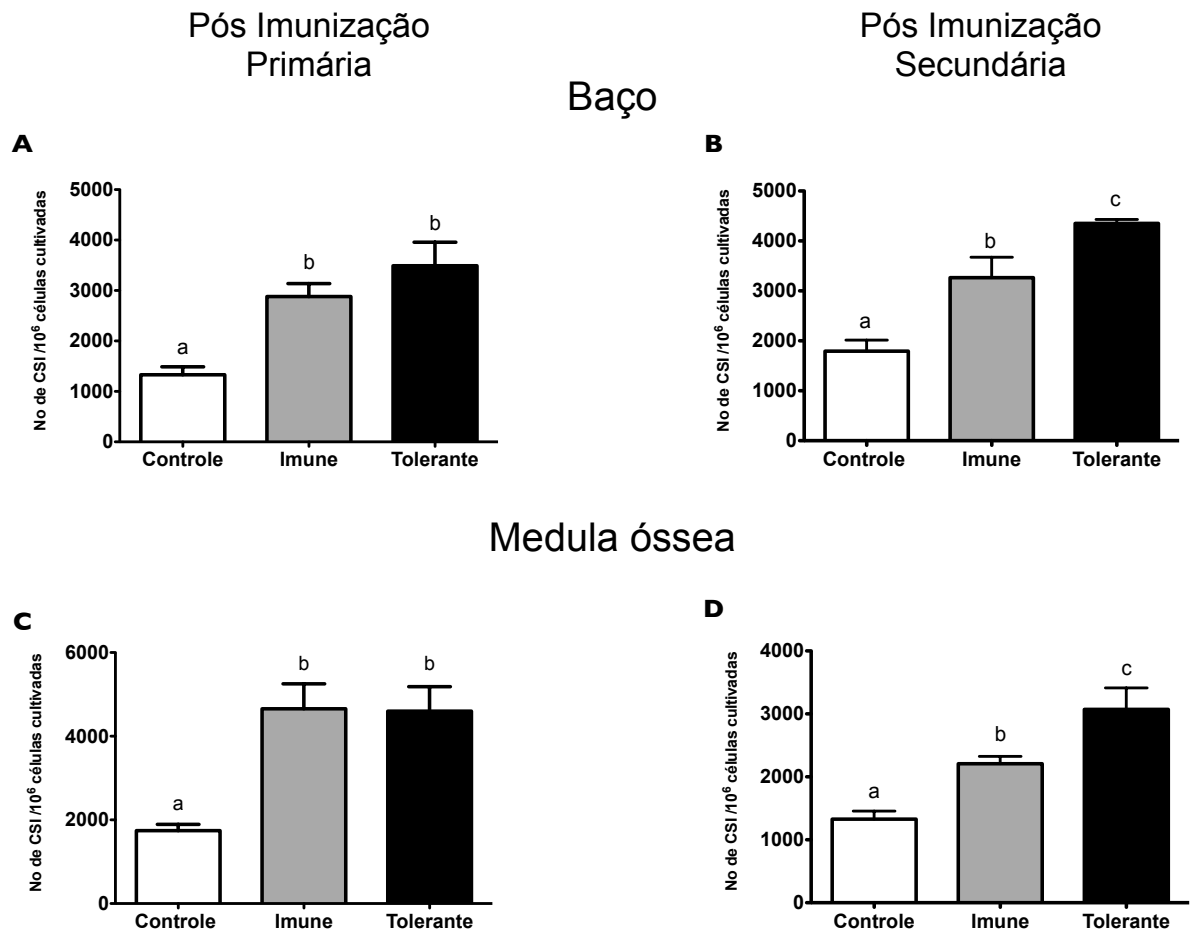


Figura 9: Células secretoras de imunoglobulinas totais (CSI) mensuradas por Elispot. Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos Tolerante, Imunizado e Controle. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10 μ g de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Células de baço e de medula óssea foram coletadas após a imunização primária ou após a secundária e cultivadas para obter o número de CSI totais. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

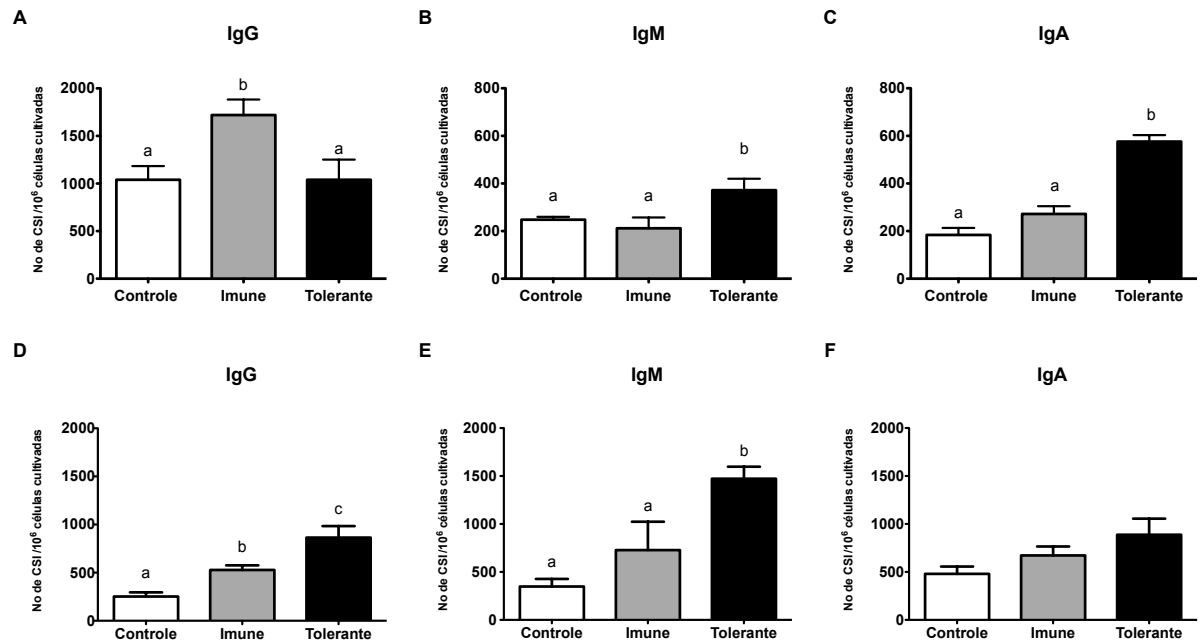


Figura 10: Células secretoras de imunoglobulinas totais (CSI) mensuradas por Elispot. Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos Tolerante, Imunizado e Controle. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10 μ g de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Foram obtidos os números de CSI produzindo IgG, IgM e IgA a partir do baço (A-C) ou da medula óssea (D-F) dos animais após a imunização secundária. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em seguida analisamos o perfil de imunoglobulinas séricas totais das classes IgG1, IgE, IgM e IgA (Fig. 11). A medida de Ig séricas totais inclui os anticorpos específicos e as imunoglobulinas não específicas. Conforme visto anteriormente, os animais tolerantes tem todas as respostas específicas inibidas. As imunoglobulinas séricas totais das classes IgG1 e IgE encontram-se inibidas nos animais tolerantes (Fig. 11 A e B). Entretanto, camundongos tolerantes possuem níveis maiores de IgM que os animais imunizados (Fig. 11 C) e seus níveis de IgA são similares (Fig. 11 D). Este resultado corrobora os dados sobre número de células secretoras de imunoglobulinas em animais tolerantes, onde predominam células produtoras de IgM e IgA (Fig. 10 B,C e E).

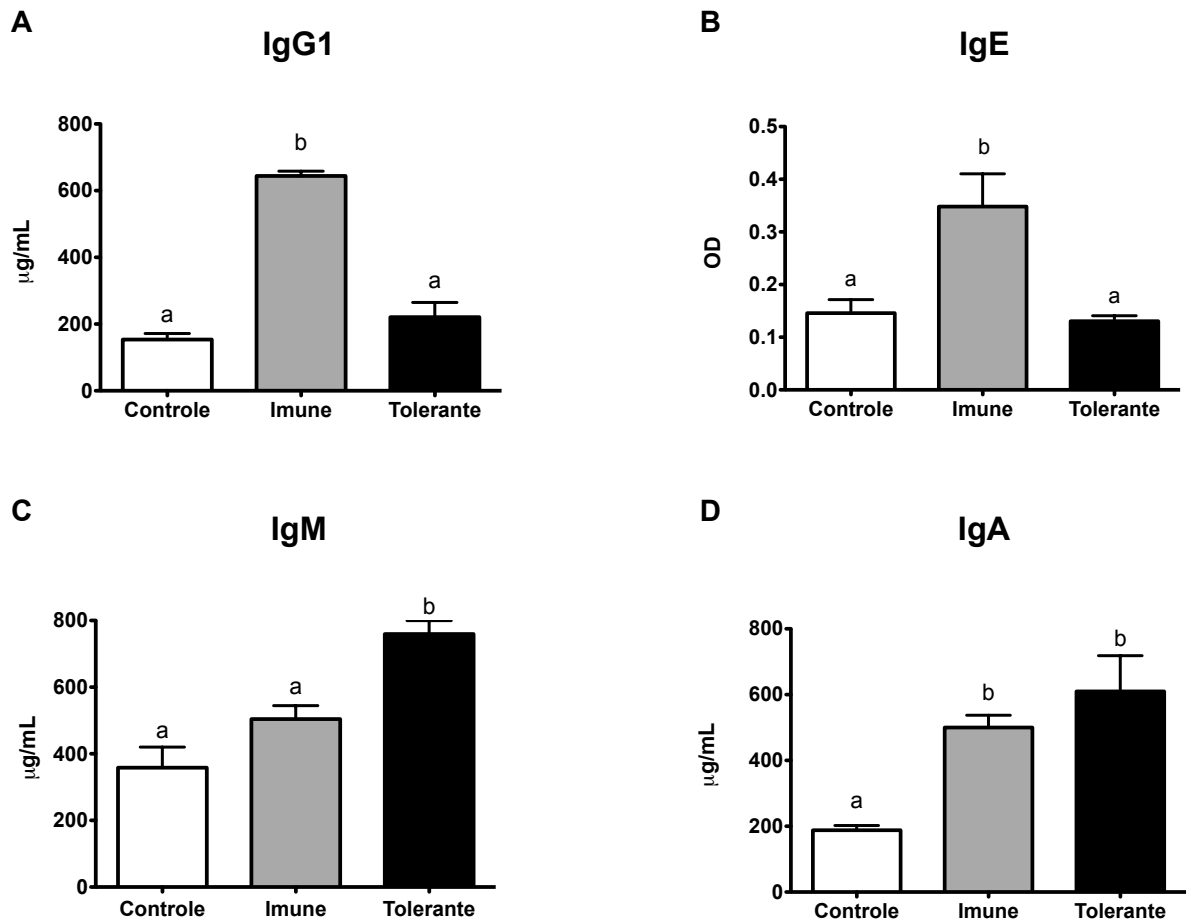


Figura 11: Títulos séricos de Imunoglobulinas totais IgG1, IgE, IgM e IgA após imunização secundária. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10µg de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10µg de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Os dados estão apresentados como concentração de Igs (µg/mL) para IgG1, IgM e IgA e como densidade óptica (490nm) para IgE. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas avaliadas por ANOVA com pós-teste de Tukey (P<0,05).

4.4 PERFIL DE CITOCINAS PRODUZIDAS EM CULTURA DE CÉLULAS DO BAÇO EM ANIMAIS TOLERANTES E IMUNIZADOS

Como o evento determinante da tolerância oral é a inibição da reatividade específica, as citocinas que são mais relacionadas com o estado tolerogênico são aquelas com atividades reguladoras e/ou anti-inflamatórias. Duas citocinas são conhecidas por participarem na imunorregulação: TGF- β e a IL-10. Durante a tolerância oral diversas citocinas pró-inflamatórias mostram-se inibidas, dependendo do modelo utilizado. Em modelos de inflamação alérgica, a produção de IL-4 encontra-se inibida em animais tolerantes enquanto que em modelos de doenças autoimunes com presença de linfócitos Th1, ocorre inibição de IL12 e aumento de IL-4 e IL-10.

Para medir as citocinas produzidas sistemicamente por animais tolerantes e imunizados medimos por RT-qPCR a expressão das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10 e TGF- β (Fig. 12). Observamos que os animais tolerantes expressam mais TGF- β do que animais imunizados (Fig. 12 D), o que está de acordo com o papel desta citocina na imunoregulação característica deste animal. A menor expressão de IL-4 e IFN- γ nestes animais decorre de seu potencial inflamatório reduzido (Fig. 12 B e C).

No entanto, camundongos tolerantes possuem expressão de IL-2 similares a de animais imunizados (Fig. 12 A). Este dado assinala que estes animais possuem uma atividade imunológica tão intensa quanto a dos imunizados, porém com um perfil de ativação diverso, tendo em vista a produção diferenciada de citocinas. Este resultado vai ao encontro do grande número de linfócitos ativados encontrados em animais tolerantes.

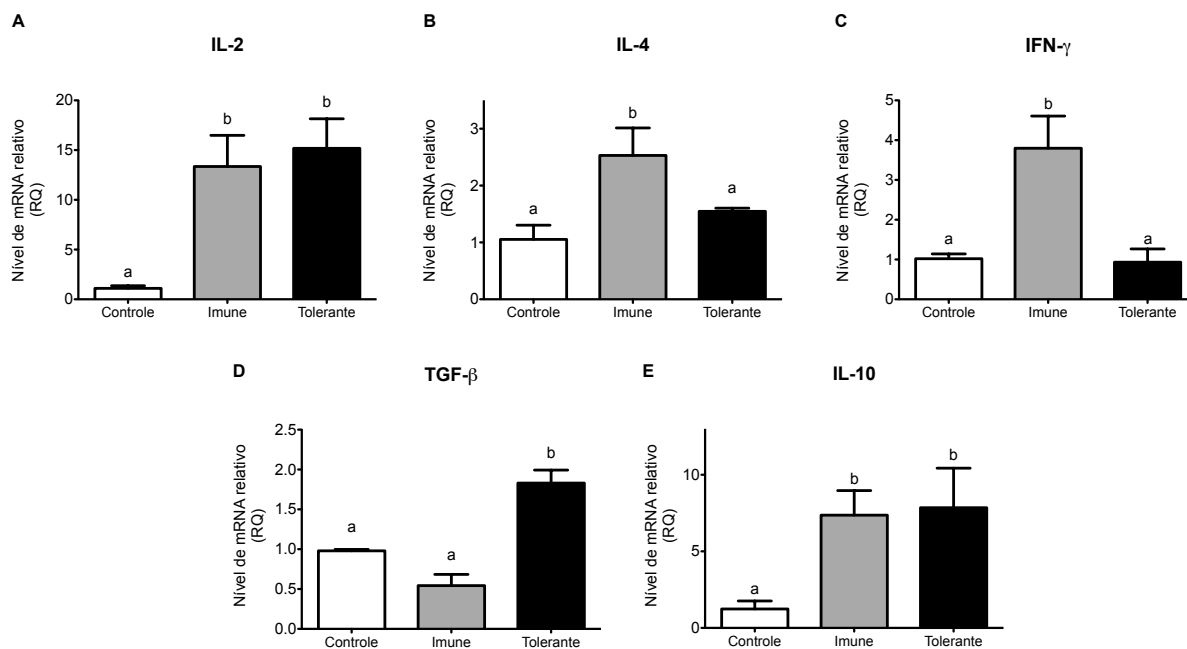


Figura 12: Perfil de expressão de citocinas em células do baço após imunização secundária. Animais tolerantes e Imunizados receberam imunização primária com 10 μ g de Ova em 1mg de hidróxido de alumínio por via i.p. e 14 dias depois receberam imunização secundária com 10 μ g de Ova em salina. Animais tolerantes receberam solução de clara de ovo em água (1:5) por 3 dias consecutivos uma semana antes da imunização primária. Animais controle foram imunizados com salina. Sete dias após a imunização secundária as células do baço foram coletadas e cultivadas por 48 horas. Após este tempo coletou-se o RNA total das células para medir expressão de citocinas por RT-qPCR. Resultados estão expressos como quantidades médias relativas, e seus respectivos erros-padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellems et al. (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão dos animais controles. Letras diferentes sobre as barras representam diferenças estatisticamente significativas (P<0,05) medidas por ANOVA com pós-teste de Tukey.

4.5 CINÉTICA DE APARECIMENTO DE LINFÓCITOS ATIVADOS NO BAÇO

Até aqui nossos resultados mostraram a grande ativação de linfócitos presentes em animais tolerantes a despeito da inibição da reatividade específica. O fato de que animais tolerantes e imunizados possuem o mesmo número de linfócitos ativados e de células T reguladoras nos levou a verificar como se dava a cinética de aparecimento destas células no baço durante o desenvolvimento da tolerância oral.

Apesar da supressão específica, característica da tolerância oral, ser melhor observada após a imunização secundária com o antígeno tolerado, a primeira imunização é essencial para a indução da tolerância oral. O intervalo entre a administração oral do antígeno e a imunização primária pode determinar a fixação da tolerância, que pode durar toda a vida do indivíduo. A tolerância pode se perder caso a primeira imunização ocorra mais de um mês após a dose oral do antígeno. Portanto, é neste momento que vários eventos celulares ocorrem na indução sistêmica do estado tolerogênico do animal.

Escolhemos, portanto, avaliar a cinética de aparecimento de linfócitos ativados e reguladores no baço dos camundongos logo após a imunização primária com o antígeno em adjuvante. Resolvemos também analisar o perfil de células do animal tolerante 7 dias após receber o antígeno (tempo 0) e sem ser submetido à imunização. Com isso tentamos examinar a população de linfócitos no baço somente sob o efeito da administração oral do antígeno. Após a imunização os animais foram mortos nos dias 1, 2, 4 e 7, quando suas células do baço foram coletadas e submetidas a análise fenotípica por citometria de fluxo. Avaliamos as seguintes marcações: linfócitos T CD4+CD69+, CD4+CD44^{high}, linfócitos B CD19+CD69+ e os linfócitos T reguladores CD4+CD25+LAP+ e CD4+Foxp3+.

Primeiramente é digno de nota que os animais tolerantes apresentam alterações nas populações linfocitárias mesmo antes da imunização primária. Sete dias após o antígeno oral, camundongos tolerantes possuem maior frequência e

número de linfócitos T CD4+CD69+ (Fig.13 A e B) e maior número de linfócitos T reguladores LAP+ (Fig. 13 H) do que animais controle, não manipulados.

Após a imunização primária a frequência dos linfócitos T CD4+CD69+ manteve-se similar ao longo da cinética, havendo somente um maior número destas células em animais tolerantes no quarto dia (Fig. 13 B). Os linfócitos B recém ativados (CD19+CD69+) possuem uma cinética similar em ambos os grupos, observando-se que a imunização induz um aumento na frequência destas células logo no primeiro dia. A única diferença encontrada entre os grupos foi no dia 4 quando os animais imunizados apresentaram maior frequência de linfócitos B CD19+CD69+ que animais tolerantes. Entretanto não foram observadas diferenças com relação ao número de células durante a cinética (Fig. 13 D).

Os animais tolerantes apresentam uma expansão tanto da frequência quanto do número de linfócitos T CD4+CD44^{high} um dia após a imunização, enquanto que os animais imunizados somente aumentam a frequência destas células no dia 4. Ao final da cinética, aos 7 dias, não são observadas diferenças na frequência e número destes linfócitos entre camundongos tolerantes e imunizados.

Os linfócitos T reguladores LAP+, que já estão em maior frequência em animais tolerantes um dia após a imunização, apresentam um aumento significativo de sua frequência em animais imunizados e tolerantes no quarto dia da cinética, observando-se uma igualdade em ambos os grupos nos dois últimos dias (Fig. 13 G). Entretanto, o número absoluto de linfócitos T reguladores LAP+ dos animais imunizados não se iguala ao de animais tolerantes durante a cinética.

Durante a cinética de linfócitos T reguladores CD4+Foxp3+ observamos que os animais tolerantes apresentam uma expansão no número e na frequência destas células dois dias após a imunização enquanto que em animais imunizados esta expansão ocorre somente após o quarto dia (Fig. 13 I,J). Ressaltamos que os animais imunizados possuem maior frequência e número de linfócitos T CD4+Foxp3+ ao final da cinética, 7 dias após a imunização.

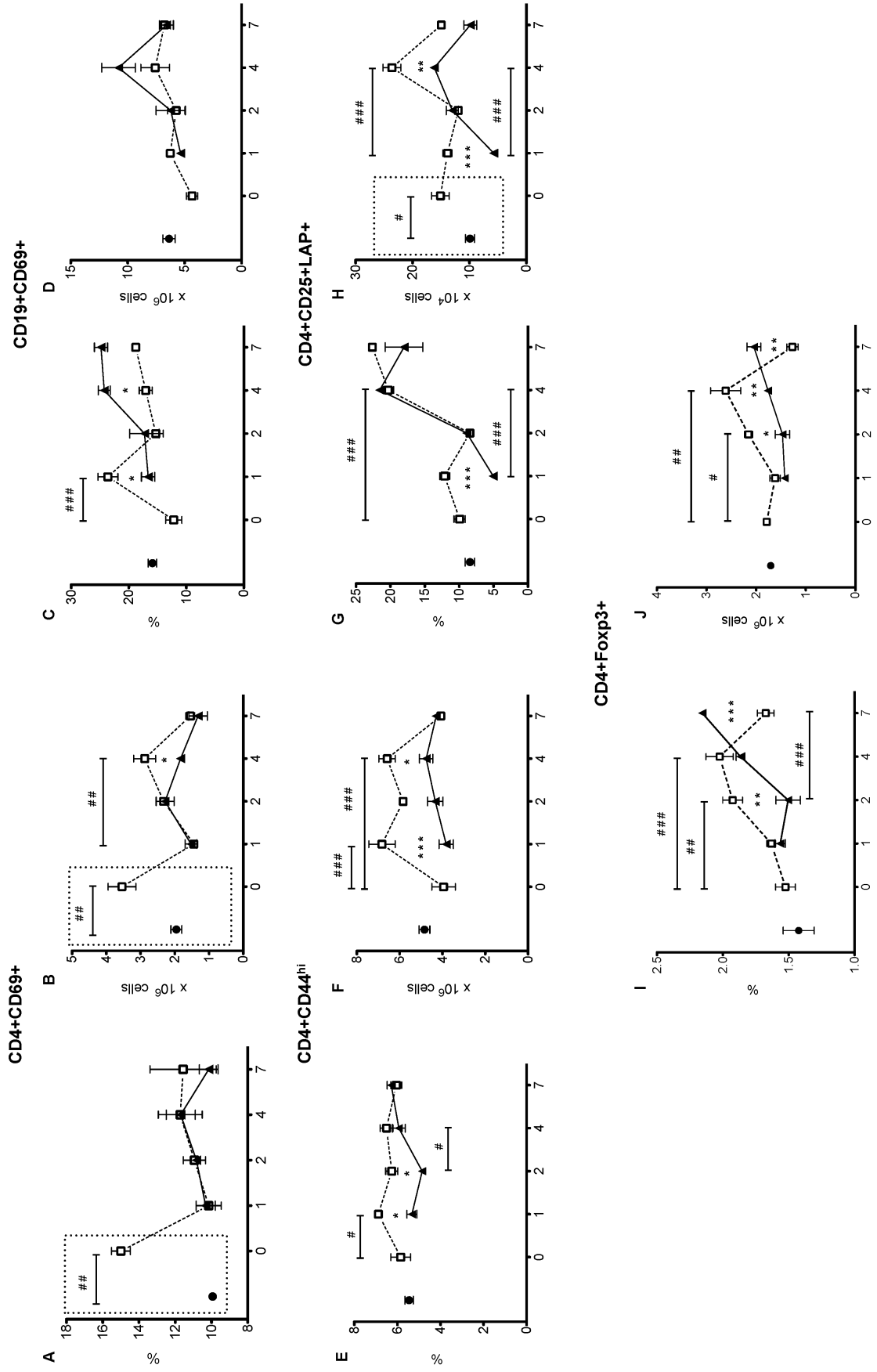


Figura 13 (página anterior): Cinética de aparecimento de linfócitos no baço após imunização primária. Animais Tolerantes (linhas pontilhadas - □) receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Animais Imunizados (linhas contínuas - ▲) passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo previamente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Os animais foram mortos em intervalos de 1, 2, 4 e 7 dias após a imunização primária e um grupo de animais tolerantes foi morto antes da imunização primária (tempo 0). Células de baços foram coletadas para análise fenotípica por citometria de fluxo. Os dados estão expressos em porcentagem e número absoluto de células para cada marcação. Asteriscos representam diferenças estatísticas (ANOVA com pós-teste de Tukey) entre animais tolerantes e imunizados em cada tempo da cinética (* = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001). As diferenças entre pontos distintos da cinética estão representadas por # (# = P<0,05; ## = P<0,01; ### = P<0,001).

Dias após Imunização primária

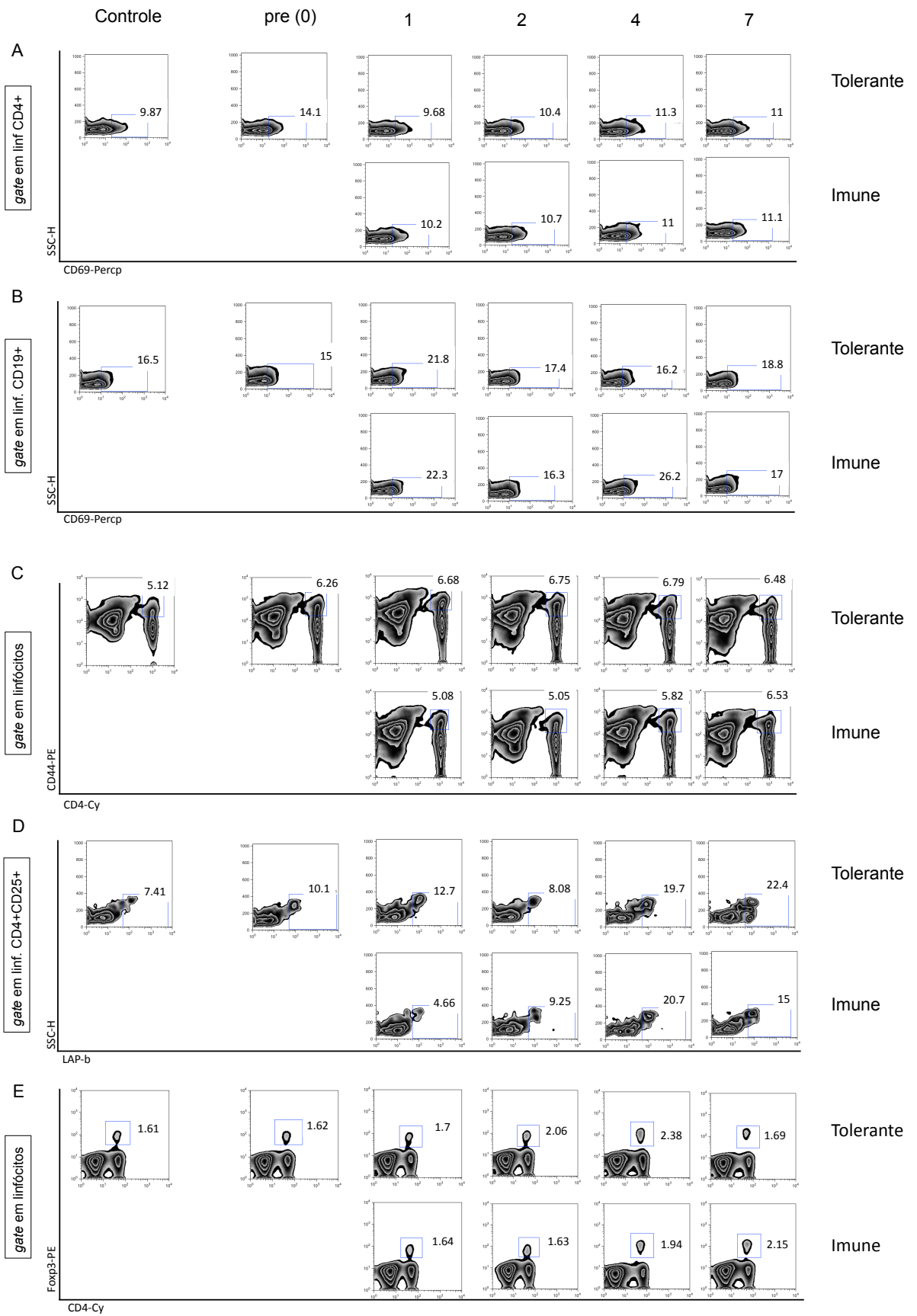


Figura 14 (página anterior): Gráficos *dotplots* representativos dos resultados de fenótipos de linfócitos no baço, apresentados na figura 13.

4.6 CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CULTURA DE CÉLULAS DE BAÇO

Paralelamente à cinética de aparecimento de linfócitos no baço avaliamos também a cinética de expressão de citocinas medidas por RT-qPCR a partir de RNA total obtido de células de baço em cultura celular (Fig. 15). Medimos a expressão das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10 e TGF- β em todos os tempos da cinética e também nos animais que receberam o antígeno pela via oral porém não foram imunizados (tolerante – tempo 0). Todos os resultados são colocados como aumento da expressão destas citocinas tendo como referência a expressão em animais controles.

As diferenças mais evidentes na expressão das citocinas entre tolerantes e imunizados ocorre do quarto ao sétimo dia da cinética, quando os animais imunizados mostram uma expressão de IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β maior que a de animais tolerantes (Fig. 15 A-E). No entanto várias diferenças podem ser observadas nos primeiros dias da cinética. Para melhor visualização destacamos estes resultados em gráficos laterais onde estão presentes somente os primeiros dias da cinética (Fig. 15 F-J).

Os animais tolerantes tem uma expressão elevada de IL-2 mesmo antes da imunização primária, quando comparados a animais controle (Fig. 15 F). Dois dias após a imunização, ocorre um outro pico de expressão de IL-2 em camundongos tolerantes, retornando posteriormente a níveis basais de expressão. Ao final da cinética, no dia 7, ocorre um novo aumento na expressão de IL-2 em tolerantes, porém esta encontra-se muito menor daquela observada em animais imunizados neste mesmo dia.

A expressão de IL-4 somente ultrapassa a expressão basal em animais imunizados, a partir do quarto dia após a imunização. O fato de que animais tolerantes não aumentam a expressão de IL-4 é condizente com o seu estado

tolerogênico obtido neste modelo de inflamação alérgica ou Th2, típica da imunização com hidróxido de alumínio.

Outras citocinas que tem sua expressão aumentada em animais tolerantes antes da imunização são a IL-10 e o TGF- β (Fig. 15 I,J), quando comparados a animais controle. Camundongos tolerantes ainda mantêm a expressão elevada de IL-10 um dia após a imunização. No quarto e sétimo dia estes animais apresentam aumento da expressão de IL-10, porém os animais imunizados induzem uma expressão ainda maior desta citocina, permanecendo superior ao dos tolerantes até o sétimo dia. Animais tolerantes apresentam um pico de expressão de TGF- β antes da imunização (Fig. 15 J), não sofrendo diferenças significativas até o fim da cinética. Por outro lado, camundongos imunizados apresentam um aumento consistente na expressão desta citocina.

Observou-se um pico da expressão de IFN- γ um dia após a imunização tanto em animais tolerantes quanto em imunizados (Fig. 15 H). Entretanto, camundongos imunizados apresentam elevada expressão de IFN- γ no quarto dia da cinética, que contudo não se manteve no mesmo nível ao sétimo dia. Já os animais tolerantes tem a expressão de IFN- γ aumentada novamente aos 7 dias após a imunização, igualando a expressão desta citocina a de animais imunizados.

Estes resultados mostram que animais tolerantes produzem citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β) mesmo antes da imunização parenteral, a qual induz uma expressão transiente de citocinas efetoras (IFN- γ e IL-2) nestes camundongos. Os animais imunizados, por outro lado, induzem a expressão de citocinas reguladoras e efetoras juntamente, porém mais tardiamente do que os tolerantes.

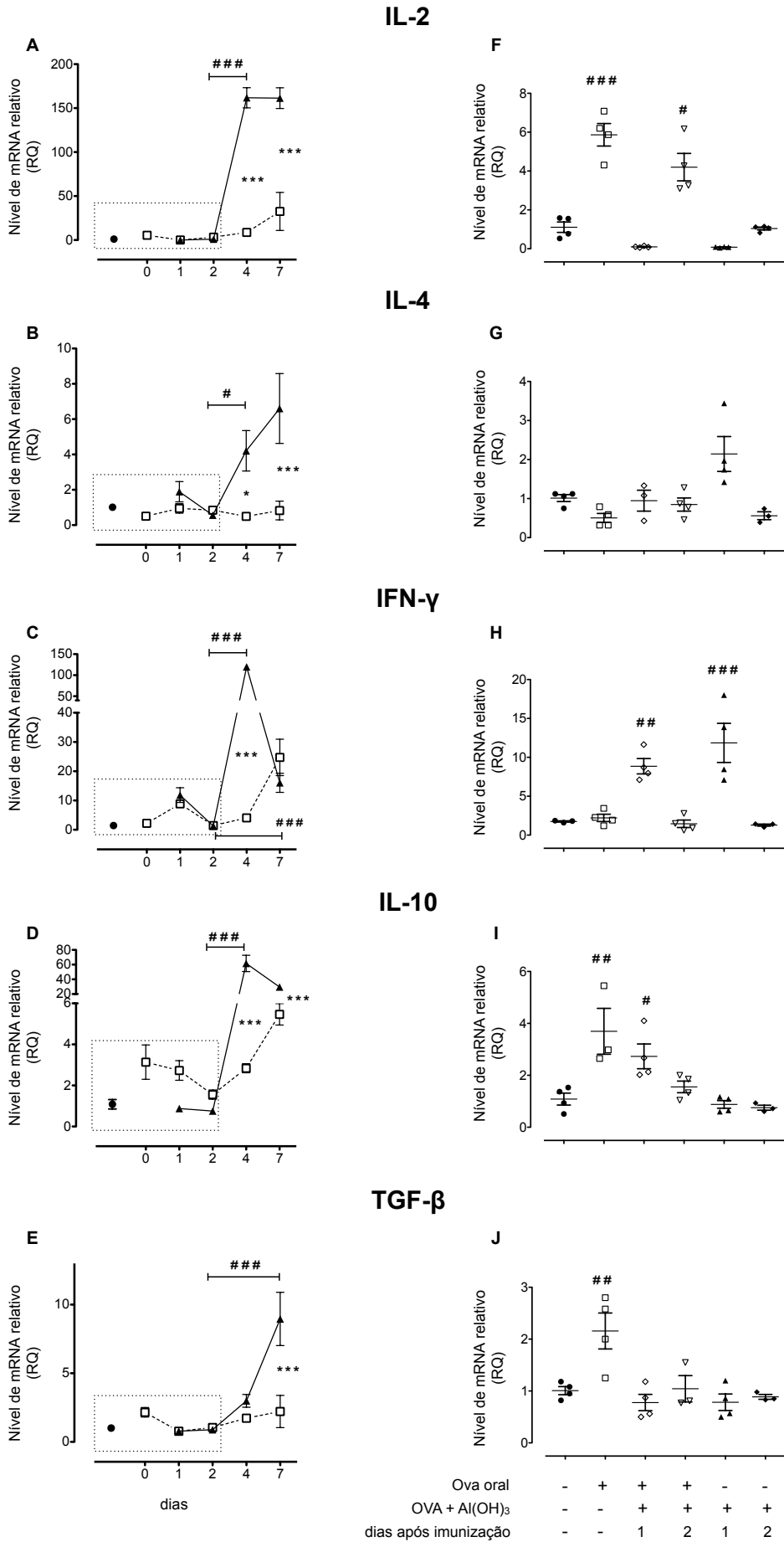


Figura 15 (página anterior): Cinética da expressão de citocinas em células do baço após imunização primária. Animais Tolerantes (linhas pontilhadas) receberam solução de clara de ovo (1:5) como única fonte de líquido por 3 dias consecutivos. Após 7 dias foram imunizados por via i.p. com 10 μ g de Ovalbumina e 1mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃) diluídos em salina. Animais Imunizados (linhas contínuas) passaram pelo mesmo protocolo de imunização porém não receberam clara de ovo previamente. Animais controle foram imunizados somente com salina. Os animais foram mortos em intervalos de 1, 2, 4 e 7 dias após a imunização primária e um grupo de animais tolerantes foi morto antes da imunização primária (tempo 0). Células do baço foram coletadas em cada tempo e cultivadas por 48 horas. Após este tempo coletou-se o RNA total das células para medir expressão de citocinas por RT-qPCR. Gráficos à direita (F-J) representam dados dos dias 0, 1 e 2 da cinética, destacados por um retângulo nos gráficos à esquerda. Tolerantes (símbolos claros - \triangle \square \diamond), Imunizados (símbolos escuros - \blacktriangle \blacklozenge) e Controles (\bullet). Resultados estão expressos como quantidades médias relativas, e seus respectivos erros padrão, de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans et al. (2007) usando como calibrador a média dos dados de expressão dos animais controles. Para os gráficos da esquerda os asteriscos representam diferenças estatísticas (ANOVA) entre animais tolerantes e imunizados em cada tempo da cinética (* = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001). As diferenças entre pontos distintos da cinética para um mesmo grupo (tolerante ou imunizado) estão representadas por # (# = P<0,05; ## = P<0,01; ### = P<0,001). Os dados dos gráficos da direita foram analisados por ANOVA, com pós-teste de Tukey, entre todos os grupos.

5. DISCUSSÃO

A grande maioria dos contatos do organismo com proteínas potencialmente imunogênicas ocorre no intestino com antígenos alimentares e derivados da microbiota. Considerando que os contatos por via parenteral geralmente envolvem o desenvolvimento da produção de anticorpos específicos e memória imunológica, considerada a base da imunidade anti-infecciosa, as consequências dos contatos por via oral com antígenos são frequentemente descritas como inibidoras da resposta imune específica. Isso tem sido repetidamente descrito como sendo necessário para garantir a ausência de resposta a antígenos inofensivos da dieta e da flora intestinal.

As influências sistêmicas da tolerância oral tem sido resumidas a inibição da reatividade imunológica específica aos antígenos previamente administrados pela via oral. Normalmente os mecanismos propostos são recessivos, como anergia ou deleção clonal, ou ativos, como a geração de linfócitos T reguladores. Hoje admite-se que o principal mecanismo da tolerância oral seja a imunorregulação, uma vez que o ambiente intestinal tem características especiais que facilitam a geração de linfócitos T reguladores locais, os quais garantem a inibição da reatividade específica, supostamente protegendo o organismo da indução de alergias alimentares ou de doenças inflamatórias intestinais. Muito tem sido descrito sobre como o microambiente intestinal favorece a geração de linfócitos T reguladores mas pouco tem sido descrito sobre os aspectos sistêmicos da tolerância oral.

Nosso trabalho decorreu da observação constante de que animais imunizados possuíam linfócitos T reguladores em quantidade similar a de animais tolerantes e que estes também apresentavam um grande número de linfócitos ativados no baço após a imunização secundária, onde a supressão da reatividade específica é facilmente identificada. Assim a simples presença de linfócitos reguladores não garante a inibição da reatividade sistêmica, enquanto que a presença de linfócitos ativados não é sinônimo de imunidade progressiva. Com este trabalho tentamos harmonizar esses dois aspectos da tolerância oral: alta atividade linfocitária em animais tolerantes e a inibição da reatividade específica.

Se o fato marcante do fenômeno de tolerância oral é a inibição da reatividade específica poderia a tolerância correlacionar com um aumento da atividade linfocitária? Em nosso trabalho mostramos que sim. Animais tornados tolerantes a ovalbumina tem sua reatividade específica inibida para todas as classes de

imunoglobulinas (IgG, IgE, IgM e IgA) porém possuem grande quantidade de linfócitos T e B ativados no baço, além de células secretoras de imunoglobulinas (CSI) em número elevado no baço e medula óssea. Animais tolerantes possuem um perfil diferenciado de produção de Igs. No baço prevalecem células secretoras de IgM e IgA enquanto que na medula óssea predominam células secretoras de IgG e IgM. Os animais imunizados, por sua vez, possuem produção prioritária de IgG no baço. A medula óssea é considerada o principal sítio produtor de imunoglobulinas séricas (Benner, Hijmans *et al.*, 1981) e também a principal fonte de IgA específica durante a indução de tolerância oral (Alley, Kiyono *et al.*, 1986). Entretanto, nós medimos células secretoras de imunoglobulinas totais, não específicas, e encontramos um grande número destas secretando IgA no baço.

O papel da IgA na tolerância oral tem sido controverso, seja em relação a IgA secretória ou a IgA sérica. Como a IgA é o principal isotipo produzido e secretado nas mucosas, uma associação foi sugerida anteriormente entre a tolerância oral e a produção de IgA secretória específica: a tolerância sistêmica ocorre paralelamente a imunização local (Challacombe e Tomasi, 1980). Entretanto, os resultados anteriores do nosso grupo (Santiago, Fernandes *et al.*, 2008) e de outros grupos (Christensen, Kjaer *et al.*, 2003) mostraram que a produção de IgA secretória também é reduzida em camundongos tolerantes orais. Em nosso trabalho observamos inibição dos níveis séricos de IgA anti-ova (Fig. 4D) e não encontramos IgA secretória específica nem mesmo em animais imunizados. Por outro lado a IgA sérica total em animais tolerantes alcançou nível similar ao de animais imunizados, corroborando a grande quantidade de células secretoras de IgA nestes animais. Este aumento de IgA não específica reflete uma influência sistêmica da tolerância oral e é condizente com as ações conhecidas destas imunoglobulinas. A IgA não possui atividade inflamatória, pois não é capaz de fixar complemento, e não induz a produção de citocinas inflamatórias (Cunningham-Rundles, 2001; Mantis, Rol *et al.*, 2011).

Células secretoras de IgM também estão em maior número no baço e na medula óssea de camundongos tolerantes após a imunização secundária. A IgM é a principal classe de imunoglobulinas naturais, ou seja, que são produzidas na ausência de imunização ou exposição a antígenos exógenos (Coutinho, Kazatchkine *et al.*, 1995; Avrameas, Ternynck *et al.*, 2007). Essas imunoglobulinas estão envolvidas em muitas atividades fisiológicas, tais como: retirada de células

senescentes, apoptóticas ou tumorais; e na regulação das células B e T (Lutz, Binder *et al.*, 2009). Foram descritos anticorpos naturais capazes de modular a ativação de linfócitos T e B em diversas espécies (Adelman, Schluter *et al.*, 2007). Anticorpos naturais IgM anti-TCR podem inibir a ativação de células T, medida pela produção de IL-2, sugerindo uma função imunomoduladora de anticorpos naturais contra epitopos da região variável do TCR (Robey, Schluter *et al.*, 2002). Portanto, o aumento de células produtoras de IgM no baço e medula óssea de animais tolerantes podem refletir mudanças na atividade fisiológica das células capazes de tamponar reações inflamatórias desencadeadas pela imunização parenteral.

Cada grupo de animais possui um perfil de citocinas característico nesta fase da tolerância oral. Em animais tolerantes prevalece a expressão de TGF- β enquanto que nos imunizados a expressão de IL-4 e IFN- γ encontra-se aumentada. Entretanto a expressão de IL-2 está aumentada em ambos os grupos, corroborando a grande ativação de linfócitos em animais tolerantes. A diferença no tipo de ativação linfocitária de animais tolerantes e imunizados encontra-se portanto no perfil amplo de citocinas produzidas e não na presença ou ausência de citocinas específicas.

Nosso próximo passo foi verificar a cinética de aparecimento de linfócitos ativados e reguladores no baço após a imunização primária. Pode-se pensar que esta imunização seria somente para se certificar do estado tolerogênico dos animais, uma vez que a tolerância é um fenômeno comparativo entre dois grupos de animais igualmente imunizados. Entretanto a primeira imunização com o antígeno em adjuvante é responsável por fixar o fenótipo tolerante, mantendo-o até o final da vida do organismo. Se esta imunização primária for administrada em um intervalo maior que 3 meses, o animal não se torna tolerante, passando a reagir ao antígeno como um animal normal, somente imunizado. Por isso, os fenômenos celulares que ocorrem nessa fase são essenciais para o estabelecimento da tolerância oral (Faria, Ficker *et al.*, 1998).

Surpreendentemente, animais tolerantes orais já mostram número aumentado de linfócitos T CD4+CD69+ (recém ativados) e T CD4+CD25+LAP+ (reguladores) mesmo antes da imunização primária, sete dias após a administração oral do antígeno. Isto significa que a entrada do antígeno pela via oral dispara a ativação de linfócitos e geração de células reguladoras que migram para o baço. A geração de linfócitos ativados e reguladores em animais tolerantes já foi demonstrada em

modelos de transferência de linfócitos com TCR transgênico anti-Ova porém não em animais isogênicos não transgênicos.

De modo geral a imunização primária induz uma rápida expansão de linfócitos T de memória (CD4+CD44^{high}) e linfócitos T reguladores (CD4+Foxp3+) em animais tolerantes. Ocorre expansão dessas células também em animais imunizados porém com um atraso de um a dois dias. Importante notar que as células T CD4+Foxp3+ aumentam em frequência e número de células em animais imunizados ao final da cinética, ultrapassando os níveis encontrados em animais tolerantes. Os linfócitos T CD4+CD25+LAP+ também sofrem expansão em ambos os grupos, tolerantes e imunizados, após a imunização mas permanecem em maior número nos animais tolerantes.

O rápido desenvolvimento de linfócitos T reguladores pode estar relacionado a geração prévia destas células pela exposição oral ao antígeno. Essa exposição ativa linfócitos no intestino, que podem migrar sistemicamente, alterando interações posteriores com o antígeno. De fato, sabe-se que a geração de linfócitos T reguladores ocorre nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos em até 48 horas após a entrada do antígeno e podem migrar para o baço (Hauet-Broere, Unger *et al.*, 2003; Sun, 2003).

Em um modelo experimental de asma em camundongos transgênicos que possuem somente um clone de célula T CD4+ e um clone de célula B em fundo genético RAG^{-/-}, Mucida e colaboradores também descreveram uma expansão inicial de linfócitos T reguladores (CD4+CD25+CD45RB^{low}) nos linfonodos mesentéricos de animais tolerantes 4 dias após a imunização parenteral. Em nosso trabalho, mostramos uma expansão de linfócitos T CD4+Foxp3+ no baço de camundongos C57BL/6 dois dias após a imunização primária. O nosso trabalho reforça a conclusão de que a importância das células T reguladoras na tolerância oral deve-se ao seu aparecimento precoce em animais tolerantes após a imunização parenteral, o que é resultado do contato prévio com o antígeno através de um microambiente tolerogênico presente no intestino normal.

De fato, a geração de linfócitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3+ ocorre nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos 48 horas após a entrada do antígeno (Hauet-Broere, Unger *et al.*, 2003). Ocorre ativação de linfócitos T específicos, após a entrada do antígeno pela via oral, não somente no tecido linfóide do intestino como

também em linfonodos periféricos (Smith, Davidson *et al.*, 2002). A imunização parenteral também induz ativação de linfócitos T específicos no baço e linfonodos periféricos, que produzem IFN- γ quando re-estimulados *in vitro*, indicando a presença de linfócitos T ativados em outros compartimentos linfóides além do GALT (Parameswaran, Samuvel *et al.*, 2004).

Em nosso trabalho, células do baço de animais tolerantes apresentam expressão aumentada de IL-2, IL-10 e TGF- β , tendo sido expostos apenas à entrada do antígeno pela via oral, mesmo antes da imunização. Esta é outra evidência de que o antígeno induziu ativação de linfócitos que migraram sistemicamente e passaram a expressar citocinas efetoras e reguladoras. O perfil cinético da expressão de citocinas em animais imunizados revela uma expressão elevada de citocinas efetoras (IL-2, IL-4) e expressão tardia de citocinas reguladoras (TGF- β e IL-10) enquanto que em animais tolerantes ocorre expressão prévia de citocinas reguladoras antes mesmo da imunização e expressão transitória de citocinas efetoras (Fig. 15).

O TGF- β é uma das principais citocinas envolvidas na imunoregulação. No intestino, essa citocina é produzida por células estromais e por linfócitos locais, sendo essencial para a troca de classe para IgA nas mucosas. O TGF- β também induz a expressão do Foxp3 em células T virgens CD4⁺CD25⁻ transformando-as em reguladoras (Chen, Jin *et al.*, 2003; Oida, Zhang *et al.*, 2003; Zheng, Wang *et al.*, 2004) e inibe a diferenciação de linfócitos Th1 e Th2 ao bloquear a expressão de fatores de transcrição específicos destas linhagens, respectivamente T-bet e GATA-3 (Gorelik, Fields *et al.*, 2000; Lin, Martin *et al.*, 2005; Wan e Flavell, 2007).

A IL-10 é outra citocina chave na imunoregulação, sendo produzida por células T reguladoras, células epiteliais, macrófagos ativados, células dendríticas e linfócitos B1. A IL-10 age diretamente nas células apresentadoras de antígenos inibindo a secreção de IL-12, a expressão de MHC classe II e de moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 (Skeen, Miller *et al.*, 1996; Asseman, Mauze *et al.*, 1999). Estas ações nas células dendríticas inibem indiretamente a ativação de linfócitos T. A importância desta citocina para a imunomodulação na mucosa foi demonstrada pela inflamação intestinal espontânea em animais deficientes em IL-10 (Kuhn, Lohler *et al.*, 1993).

Vários subtipos de células T reguladoras têm sido envolvidos na tolerância oral: células Tr1 produtoras de IL-10, células T CD4⁺ produtoras de TGF- β e células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de ocorrência natural (Faria e Weiner, 2005). Treg específicas são observadas nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos do intestino 24h após a administração oral do antígeno (Hauet-Broere, Unger *et al.*, 2003). Células apresentadoras de antígenos (APC) que desencadeiam essa resposta tolerogênica existem constitutivamente no GALT e podem migrar para linfonodos mesentéricos de forma dependente de CCR7. No entanto, os gânglios linfáticos distais, como linfonodos inguinais são isolados deste processo tolerogênico (Worbs, Bode *et al.*, 2006). Os efeitos sistêmicos da tolerância oral parece depender da mobilidade das células T antígeno específico que circulam no corpo após serem ativadas no tecido linfóide intestinal (Tsuji e Kosaka, 2008).

A importância da migração de linfócitos oriundos do intestino para o estabelecimento da tolerância oral pode advir de dois achados recentes. O primeiro foi a descrição de que a tolerância oral depende da migração de células dendríticas para os linfonodos mesentéricos, dependente de CCR7, porém estas DC não são encontradas em linfonodos periféricos ou no baço (Worbs, Bode *et al.*, 2006). Essas células dendríticas intestinais expressam a integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) (Schulz, Jaensson *et al.*, 2009) e são capazes de produzir o metabólito de vitamina A, ácido retinóico. Linfócitos T ativados nos linfonodos mesentéricos expressam a integrina $\alpha 4\beta 7$ e CCR9, ambos considerados moléculas de direcionamento (*homing*) para o intestino.

Outro achado importante foi a descoberta de que a tolerância oral não ocorre em animais deficientes para a integrina $\alpha 4\beta 7$, MADCAM1 ou CCR9. Assim, só é possível obter tolerância oral se os linfócitos ativados nos linfonodos mesentéricos puderem migrar de volta ao intestino (Hadis, Wahl *et al.*, 2011; Cassani, Villablanca *et al.*, 2012). A transferência de linfócitos com expressão normal dessas moléculas restabelece a capacidade de indução da tolerância oral. Estes resultados levaram a proposta pelos autores de um modelo em dois passos para a indução da tolerância oral. O primeiro passo seria a indução de células T reguladoras Foxp3⁺ nos linfonodos mesentéricos após a administração oral do antígeno. Entretanto a geração destas células não garante uma tolerância funcional, necessitando de um segundo passo. Esse passo necessita do endereçamento dessas células T

reguladoras de volta ao intestino. Uma vez na *lamina propria* intestinal, esses linfócitos reguladores poderiam reconhecer antígenos apresentados por células epiteliais e células dendríticas locais recebendo sinais para a sua proliferação, regulando o *pool* destas células no local. Ainda um terceiro passo, considerado hipotético pelos autores, seria a importância da disseminação sistêmica das células T reguladoras pelo corpo.

Em nossos resultados apontamos que este passo é essencial para o modelo de tolerância oral que utilizamos, tendo em vista que encontramos linfócitos ativado e reguladores no baço 7 dias após a ingestão do antígeno. E é justamente a presença destas células antes da imunização primária que diferencia o caminho diferenciado que o sistema imune do animal tolerante seguirá.

Nossos resultados apontam para uma direção similar aos resultados de Bandeira e colaboradores (1989) sobre a tolerância ao transplante alogênico, demonstrando que em camundongos injetados com células alogênicas no período neonatal, foi encontrado maior número de células B e T ativadas em animais que subsequentemente aceitaram enxerto de pele, mas não nos camundongos que rejeitaram o enxerto. Como visto por esses autores, a tolerância é um fenômeno ativo e correlacionado a altos níveis de ativação de linfócitos, e não apenas em sua inibição.

Em resumo, nós mostramos que a tolerância oral correlaciona com uma alta atividade de linfócitos T e B coexistindo com a inibição da reatividade específica. A indução e expansão precoce de células T reguladoras em animais tolerantes e sua maior diversificação na produção de imunoglobulinas nos leva a propor uma hipótese alternativa para o estado tolerogênico. As células T reguladoras seriam responsáveis na geração da diversidade da ativação de linfócitos, característica dos animais tolerantes.

Em apoio a esta hipótese, Winstead e colaboradores demonstraram recentemente que durante a proliferação de linfócitos em condições de linfopenia a presença de células T reguladoras condicionou uma maior diversidade clonal dos linfócitos T em expansão (Winstead, Reilly *et al.*, 2010). Adicionalmente, Haribhai e colaboradores descreveram que as células T reguladoras induzidas na periferia agem em concerto com as células Treg naturais para reforçar a tolerância, ao expandir o repertório de TCR das respostas reguladoras (Haribhai, Williams *et al.*,

2011). Em outro trabalho, observou-se que a supressão eficiente de GvH requer células Treg com repertório altamente diversificado (Fohse, Suffner *et al.*, 2011).

Recentemente, destacamos a correlação entre oligoclonalidade de linfócitos T e imunopatologia baseado em inúmeros exemplos em alergia, imunodeficiências e doenças autoimunes (Pordeus, Ramos *et al.*, 2009). Por outro lado, a policlonalidade de células T prevalece no estado fisiológico. Assim, a distribuição da atividade imunológica observada em animais tolerantes seria derivada de uma maior diversidade de clones de linfócitos sendo ativados, contrastando com uma menor diversidade clonal (oligoclonalidade) em animais imunizados. Nesta forma de ver, a tolerância oral não é apenas a regulação ou supressão da resposta imune específica, mas sim uma manifestação de um fenômeno imunológico sistêmico mais abrangente e distribuído.

6. CONCLUSÕES

- Os níveis de anticorpos séricos anti-Ova de animais tolerantes encontra-se inibidos em todas as classes analisadas: IgG, IgM, IgE, IgA.
- Animais tolerantes e imunizados possuem mesmo número e frequência de linfócitos T e B ativados (CD4+CD69+, CD4+CD44^{high}, CD19+CD69+) e T reguladores (CD4+CD25+CD45RB^{low}, CD4+CD25+LAP+ e CD4+Fox3+) no baço após a imunização secundária;
- Animais tolerantes possuem maior número de células secretoras de imunoglobulinas (CSI) do que animais imunizados após a imunização secundária. Em animais tolerantes prevalecem CSI produzindo IgM e IgA no baço e IgG e IgA na medula óssea. Por outro lado, animais imunizados possuem CSI produzindo prioritariamente IgG no baço e na medula óssea;
- Apesar da inibição de anticorpos específicos, animais tolerantes apresentam níveis maiores de IgM sérica total do que o de animais imunizados e títulos semelhantes de IgA sérica total;
- Linfócitos T ativados e reguladores apresentam uma cinética de aparecimento peculiar no baço de animais tolerantes. Células T efectoras CD4+CD44^{high} e T reguladoras CD4+Foxp3+ expandem precocemente em animais tolerantes com um e dois dias após a imunização primária. Mesmo antes da imunização, animais tolerantes possuem maior número de linfócitos T CD4+CD69+ e T CD4+CD25+LAP+ no baço, sete dias após a administração oral do antígeno. Ocorre aumento na frequência e número de linfócitos T reguladores (CD4+Foxp3+) em camundongos imunizados após o quarto dia da cinética chegando a ultrapassar os níveis de animais tolerantes no sétimo dia;
- Ocorre expressão de citocinas reguladoras (TGF- β e IL-10) e de IL-2 em animais tolerantes mesmo antes da imunização primária. Após a imunização, camundongos tolerantes apresentam expressão transitória de citocinas efectoras (IL-2 e IFN- γ). A expressão de citocinas reguladoras (TGF- β e IL-10) em animais imunizados supera a de tolerantes ao final da cinética, no sétimo dia.
- Em resumo, mostramos que animais tolerantes possuem intensa atividade linfocitária sistêmica, concomitante a inibição da reatividade específica, com diferenças qualitativas e temporais. Qualitativamente, animais tolerantes

mostram uma produção mais diversificada de Imunoglobulinas totais no baço e na medula óssea; temporalmente apresentam uma rápida mobilização de linfócitos ativados e reguladores.

7. BIBLIOGRAFIA

- ADELMAN, M. K., S. F. SCHLUTER, I. F. ROBEY e J. J. MARCHALONIS (2007). "Natural and autoantibodies to human T-cell receptor Vbeta segments: potential roles in immunomodulation." **Crit Rev Immunol** 27(3): 221-232.
- ALLEY, C. D., H. KIYONO e J. R. MCGHEE (1986). "Murine bone marrow IgA responses to orally administered sheep erythrocytes." **Journal of Immunology** 136(12): 4414-4419.
- AMARAL, J. F., D. A. FOSCHETTI, F. A. ASSIS, J. S. MENEZES, N. M. VAZ e A. M. FARIA (2006). "Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation." **Braz J Med Biol Res** 39(12): 1581-1586.
- ANDRÉ, C., J. F. HEREMANS, J. P. VAERMAN e C. L. CAMBIASO (1975). "A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes." **The Journal of experimental medicine** 142(6): 1509-1519.
- ARAKAWA, T., J. YU, D. K. CHONG, J. HOUGH, P. C. ENGEN e W. H. LANGRIDGE (1998). "A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes." **Nat Biotechnol** 16(10): 934-938.
- ARAMAKI, Y., Y. FUJII, H. SUDA, I. SUZUKI, T. YADOMAE e S. TSUCHIYA (1994). "Induction of oral tolerance after feeding of ragweed pollen extract in mice." **Immunol Lett** 40(1): 21-25.
- AROEIRA, L. G. S., F. CARDILLO, D. A. DE ALBUQUERQUE, N. M. VAZ e J. MENGEL (1995). "Anti-IL-10 treatment does not block either the induction or the maintenance of orally-induced tolerance to Ova." **Scand.J.Immunol.** 41: 319-323.
- ASHERSON, G. L., M. ZEMBALA, M. A. PERERA, B. MAYHEW e W. R. THOMAS (1977). "Production of immunity and unresponsiveness in the mouse by feeding contact sensitizing agents and the role of suppressor cells in the peyer's patches, mesenteric lymph nodes and other lymphoid tissues." **Cell Immunol** 33(1): 145-155.
- ASSEMAN, C., S. MAUZE, M. W. LEACH, R. L. COFFMAN e F. POWRIE (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." **J Exp Med** 190(7): 995-1004.
- AVRAMEAS, S., T. TERNYNCK, I. A. TSONIS e P. LYMBERI (2007). "Naturally occurring B-cell autoreactivity: a critical overview." **J Autoimmun** 29(4): 213-218.
- BANDEIRA, A., A. COUTINHO, C. CARNAUD, F. JACQUEMART e L. FORNI (1989). "Transplantation tolerance correlates with high levels of T- and B-lymphocyte activity." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 86(1): 272-276.
- BANDEIRA, A., E. L. LARSSON, L. FORNI, P. PEREIRA e A. COUTINHO (1987). "'In vivo' activated splenic T cells are refractory to interleukin 2 growth 'in vitro'." **Eur J Immunol** 17(7): 901-908.
- BANDEIRA, A., J. MENGEL, O. BURLLEN-DEFRAUX e A. COUTINHO (1991). "Proliferative T cell anergy to Mls-1^a does not correlate with *in vivo* tolerance." **Int. Immunol.** 3: 923-931.

- BAZIN, H. e B. PLATEAU (1976). "Production of reaginic IgE antibodies by oral administration of ovalbumin to rats." **Immunology** 30: 679-684.
- BAZIN, H. e B. PLATEAU (1977). "Oral feeding can make rats tolerant to intraperitoneal injections of DNP-ovalbumin and B. pertussis vaccine." **Biochem. Soc. Trans.** 5: 1571-1573.
- BEN-SASSON, S. Z., G. LE GROS, D. H. CONRAD, F. D. FINKELMAN e W. E. PAUL (1990). "IL-4 production by T cells from naive donors. IL-2 is required for IL-4 production." **J Immunol** 145(4): 1127-1136.
- BENNER, R., W. HIJMANS e J. J. HAAIJMAN (1981). "The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation." **Clinical and Experimental Immunology** 46(1): 1-8.
- BERUMEN, L., O. HALLE-PANNENKO e H. FESTENSTEIN (1983). "Strong histocompatibility and cell-mediated cytotoxic effects of a single Mls difference demonstrated using a new congenic mouse strain." **Eur J Immunol** 13(4): 292-300.
- BESREDKA, A. (1909). "De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anapjylaxie lactique." **Ann.Inst.Pasteur** 23: 166-174.
- BIENENSTOCK, J., N. JOHNSTON e D. Y. PEREY (1973). "Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics." **Lab Invest** 28(6): 686-692.
- BIENENSTOCK, J., M. MCDERMOTT e A. D. BEFUS (1979). A common mucosal immune system. **Immunology of Breast Milk**. P. L. Ogra e D. Dayton. New York, Raven Press: 171-182.
- BILLINGHAM, R. E., L. BRENT e P. B. MEDAWAR (1953). "'Actively acquired tolerance" of foreign cells." **Nature** 172: 603-606.
- BLACKMAN, M., J. KAPPLER e P. MARRACK (1990). "The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells." **Science** 248(4961): 1335-1341.
- BOURNE, F. J., T. J. NEWBY e J. W. CHIDLOW (1975). "The influence of route of vaccination on the systemic and local immune response in the pig." **Res Vet Sci** 18(3): 244-248.
- BRANDTZAEG, P. (2009). "'ABC' of mucosal immunology." **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program** 64: 23-38; discussion 38-43, 251-257.
- BRANDTZAEG, P., T. S. HALSTENSEN, K. KETT, P. KRAJCI, D. KVALE, T. O. ROGNUM, H. SCOTT e L. M. SOLLID (1989). "Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes." **Gastroenterol.** 97: 1562-1584.
- BRIMNES, J., M. ALLEZ, I. DOTAN, L. SHAO, A. NAKAZAWA e L. MAYER (2005). "Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease." **J Immunol** 174(9): 5814-5822.
- BRUCE, M. G. e A. FERGUSON (1986). "The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice." **Immunology** 59(2): 295-300.
- BRUCE, M. G. e A. FERGUSON (1986). "Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen." **Immunology** 57(4): 627-630.

- BRUCE, M. G., S. STROBEL, D. G. HANSON e A. FERGUSON (1987). "Irradiated mice lose the capacity to 'process' fed antigen for systemic tolerance of delayed type hypersensitivity." **Clin Exp Immunol** 70(3): 611-618.
- BURNET, F. M. (1957). "A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection." **Austr.J.Sci.** 20: 67-69.
- BURNET, F. M. e F. FENNER (1949). **The production of antibodies**. Melbourne, Macmillan.
- CAHILL, R. N., D. C. POSKITT, D. C. FROST e Z. TRNKA (1977). "Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes." **J Exp Med** 145(2): 420-428.
- CANTOR, H. M. e A. E. DUMONT (1967). "Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system." **Nature** 245: 744-745.
- CARRIER, Y., J. YUAN, V. K. KUCHROO e H. L. WEINER (2007). "Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice." **J Immunol** 178(1): 179-185.
- CARVALHO, C. R., H. L. LENZI, R. CORREA-OLIVEIRA e N. M. VAZ (2002). "Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs." **Braz J Med Biol Res** 35(10): 1195-1199.
- CARVALHO, C. R., B. A. VERDOLIN, A. V. DE SOUZA e N. M. VAZ (1994). "Indirect effects of oral tolerance in mice." **Scand J Immunol** 39(6): 533-538.
- CASSANI, B., E. J. VILLABLANCA, J. DE CALISTO, S. WANG e J. R. MORA (2012). "Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance." **Molecular Aspects of Medicine** 33(1): 63-76.
- CAULEY, L. S., K. A. CAULEY, F. SHUB, G. HUSTON e S. L. SWAIN (1997). "Transferable anergy: superantigen treatment induces CD4+ T cell tolerance that is reversible and requires CD4-CD8- cells and interferon gamma." **J Exp Med** 186(1): 71-81.
- CHALLACOMBE, S. J. e T. B. TOMASI (1980). "Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization." **J.Exp.Med.** 152: 1459-1465.
- CHALLACOMBE, S. J. e T. B. TOMASI, JR. (1980). "Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization." **J Exp Med** 152(6): 1459-1472.
- CHASE, M. (1946). "Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agents." **Proc.Soc.Exp.Biol.&Med.** 61: 257-262.
- CHASE, M. (1959). "Immunologic tolerance." **Annual Reviews in Microbiology** 13: 349.
- CHASE, M. W. (1946). "The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity." **J Bacteriol** 51: 643.
- CHASE, M. W. (1946). "Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent." **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)** 61(3): 257-259.
- CHEN, W., W. JIN, N. HARDEGEN, K. J. LEI, L. LI, N. MARINOS, G. MCGRADY e S. M. WAHL (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to

- CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." **J Exp Med** 198(12): 1875-1886.
- CHEN, Y., J. INOBE e H. L. WEINER (1997). "Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model." **Cell Immunol** 178(1): 62-68.
- CHEN, Y., J. INOBE e H. L. WEINER (1997). "Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model." **Cellular Immunology** 178(1): 62-68.
- CHEN, Y., J.-I. INOBE e H. L. WEINER (1995). "Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: Both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression." **J.Immunol.** 155: 910-916.
- CHEN, Y., J. I. INOBE, R. MARKS, GONELLA, P., V. K. KUCHROO e H. L. WEINER (1995). "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance." **Nature** 376: 177-1180.
- CHOMCZYNSKI, P. e N. SACCHI (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." **Anal Biochem** 162(1): 156-159.
- CHRISTENSEN, H. R., T. M. KJAER e H. FROKIAER (2003). "Low-dose oral tolerance due to antigen in the diet suppresses differentially the cholera toxin- adjuvantized IgE, IgA and IgG response." **Int Arch Allergy Immunol** 132(3): 248-257.
- CHUNG, Y. (2005). "Complementary role of CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF- in oral tolerance." **Journal of Leukocyte Biology** 77(6): 906-913.
- CLAESSEN, A. M., B. M. VON BLOMBERG, J. DE GROOT, D. A. WOLVERS, G. KRAAL e R. J. SCHEPER (1996). "Reversal of mucosal tolerance by subcutaneous administration of interleukin-12 at the site of attempted sensitization." **Immunology** 88(3): 363-367.
- COBBOLD, S. P., E. ADAMS, S. E. MARSHALL, J. D. DAVIES e H. WALDMANN (1996). "Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8." **Immunol Rev** 149: 5-33.
- COBBOLD, S. P., G. MARTIN e H. WALDMANN (1990). "The induction of skin graft tolerance in major histocompatibility complex-mismatched or primed recipients: primed T cells can be tolerized in the periphery with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies." **Eur J Immunol** 20(12): 2747-2755.
- COHN, M. (1994). "The wisdom of hindsight." **Annu Rev Immunol** 12: 1-62.
- CORNES, J. S. (1965). "Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine: Part I The development of Peyer's patches." **Gut** 6(3): 225-229.
- CORNES, J. S. (1965). "Peyer's patches in the human gut." **Proc R Soc Med** 58(9): 716.
- COSTA, R. A., V. RUIZ-DE-SOUZA, G. M. AZEVEDO, JR., E. GAVA, G. T. KITTEN, N. M. VAZ e C. R. CARVALHO (2011). "Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin." **Wound Repair Regen** 19(4): 487-497.
- COUTINHO, A., G. COUTINHO, A. GRANDIEN, M.-A. R. MARCOS e A. BANDEIRA (1992). "Some reasons why deletion and anergy do not satisfactorily account for natural tolerance." **Res. Immunol** 3: 143-366.
- COUTINHO, A., M. D. KAZATCHKINE e S. AVRAMEAS (1995). "Natural antibodies." **Curr. Op. Immunol.** 7: 812-818.

- CRAIG, S. W. e J. J. CEBRA (1971). "Peyer's patches: an enriched source of precursors of IgA-producing immunocytes in the rabbit." **J. Exp. Med.** 134: 188-200.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, C. (2001). "Physiology of IgA and IgA deficiency." **J Clin Immunol** 21(5): 303-309.
- DASGUPTA, A., K. V. KESARI, K. K. RAMASWAMY, P. S. AMENTA e K. M. DAS (2001). "Oral administration of unmodified colonic but not small intestinal antigens protects rats from hapten-induced colitis." **Clin Exp Immunol** 125(1): 41-47.
- DUNKLEY, M. L. e A. J. HUSBAND (1987). "Antigen-specific helper T cells in the intestine: origin and migration." **Adv Exp Med Biol** 216A: 119-130.
- EHRlich, P. (1900). "On immunity, with special reference to cell life." **Proc.Roy.Soc. (London)** 66(432): 424-448.
- ELSON, C. O. e W. EALDING (1984). "Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen." **J Immunol** 133(6): 2892-2897.
- FAGARASAN, S. e T. HONJO (2003). "Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences." **Nat Rev Immunol** 3(1): 63-72.
- FAGARASAN, S., S. KAWAMOTO, O. KANAGAWA e K. SUZUKI (2010). "Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis." **Annu Rev Immunol** 28: 243-273.
- FARIA, A. M., S. M. FICKER, E. SPEZIALI, J. S. MENEZES, B. STRANSKY, V. SILVA RODRIGUES e N. M. VAZ (1998). "Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice." **Mech Ageing Dev** 102(1): 67-80.
- FARIA, A. M., R. MARON, S. M. FICKER, A. J. SLAVIN, T. SPAHN e 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(2): 135-145.
- FARIA, A. M. e H. L. WEINER (2005). "Oral tolerance." **Immunological Reviews** 206: 232-259.
- FARIA, A. M. C., R. MARON, S. M. FICKER, A. J. SLAVIN, T. SPAHN e H. L. WEINER (2003). "Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor- β /interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis." **Journal of Autoimmunity** 20(2): 135-145.
- FELTON, L. D. e B. OTTINGER (1942). "Pneumococcus polysaccharide as a paralyzing agent on the mechanism of immunity in white mice." **J.Bacteriol.** 43: 94-95 (Abstract).
- FISHMAN-LOBELL, J., A. FRIEDMAN e H.-L. WEINER (1994). "Different kinetic patterns of cytokine gene expression *in vivo* in orally tolerant mice." **Eur. J. Immunol.** 24: 2720-2724.
- FOHSE, L., J. SUFFNER, K. SUHRE, B. WAHL, C. LINDNER, C. W. LEE, S. SCHMITZ, J. D. HAAS, S. LAMPRECHT, C. KOENECKE, A. BLEICH, G. J. HAMMERLING, B. MALISSEN, S. SUERBAUM, R. FORSTER e I. PRINZ (2011). "High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells." **Eur J Immunol** 41(11): 3101-3113.

- FONTENOT, J. D., M. A. GAVIN e A. Y. RUDENSKY (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." **Nat Immunol** 4(4): 330-336.
- FORD, W. L. e R. C. ATKINS (1971). "Specific unresponsiveness of recirculating lymphocytes after exposure to histocompatibility antigen in F 1 hybrid rats." **Nat New Biol** 234(49): 178-180.
- FRANCO, M. A. e H. B. GREENBERG (1997). "Immunity to rotavirus in T cell deficient mice." **Virology** 238(2): 169-179.
- FRIEDMAN, A. e H. L. WEINER (1994). "Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91(14): 6688.
- GARSDIE, P., M. STEEL, F. Y. LIEW e A. M. MOWAT (1995). "CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance." **Int Immunol** 7(3): 501-504.
- GARSDIE, P., M. STEEL, E. A. WORTHEY, P. J. KEWIN, S. E. HOWIE, D. J. HARRISON, D. BISHOP e A. M. MOWAT (1996). "Lymphocytes from orally tolerized mice display enhanced susceptibility to death by apoptosis when cultured in the absence of antigen in vitro." **The American journal of pathology** 149(6): 1971-1979.
- GERSHON, R. K. e K. KONDO (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." **Immunology** 18(5): 723-737.
- GERSHON, R. K. e K. KONDO (1971). "Infectious immunological tolerance." **Immunology** 21(6): 903-914.
- GLAISTER, J. R. (1973). "Some effects of oral administration of oxazolone to mice." **Int Arch Allergy Appl Immunol** 45(6): 828-843.
- GOLDBLUM, R. M., S. AHLSTEDT, B. CARLSSON, L. A. HANSON, U. JODAL, G. LIDIN-JANSON e A. SOHL-AKERLUND (1975). "Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunisation." **Nature** 257(5529): 797-798.
- GOMES-SANTOS, A. C., T. G. MOREIRA, A. B. CASTRO-JUNIOR, B. C. HORTA, L. LEMOS, D. N. CRUZ, M. A. GUIMARAES, D. C. CARA, D. M. MCCAFFERTY e A. M. FARIA (2012). "New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa." **Clin Dev Immunol** 2012: 560817.
- GORELIK, L., P. E. FIELDS e R. A. FLAVELL (2000). "Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression." **J Immunol** 165(9): 4773-4777.
- GOWANS, J. D., I. EVANGELISTA e M. A. O'SULLIVAN (1964). "Familial Factors in Rheumatoid Arthritis." **Arch Intern Med** 113: 744-747.
- GRACA, L., S. THOMPSON, C. Y. LIN, E. ADAMS, S. P. COBBOLD e H. WALDMANN (2002). "Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance." **J Immunol** 168(11): 5558-5565.
- GRADMANN, C. (2000). "Invisible enemies: bacteriology and the language of politics in imperial Germany." **Sci Context** 13(1): 9-30.
- GROUX, H. e E. AL. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." **Nature** 389: 737-740.

- GUERRA, R. (1991). "Specific antibodies in mouse milk after ovalbumin ingestion." **Braz J Med Biol Res** 24(1): 107-109.
- HADIS, U., B. WAHL, O. SCHULZ, M. HARDTKE-WOLENSKI, A. SCHIPPERS, N. WAGNER, W. MÜLLER, T. SPARWASSER, R. FÖRSTER e O. PABST (2011). "Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria." **Immunity** 34(2): 237-246.
- HALSTEAD, T. E. e J. G. HALL (1972). "The homing of lymph-borne immunoblasts to the small gut of neonatal rats." **Transplantation** 14: 339-346.
- HANSON, D., N. M. VAZ, L. C. MAIA, M. M. HORNBROOK, J. M. LYNCH e C. A. ROY (1977). "Inhibition of specific Immune response by feeding protein antigens." 55: 526-532.
- HANSON, D. G. (1981). "Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns." **Journal of Immunology** 127(4): 1518-1524.
- HANSON, D. G. e S. D. MILLER (1982). "Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. V. Induction of the tolerant state in the absence of specific suppressor T cells." **J Immunol** 128(5): 2378-2381.
- HANSON, D. G., N. M. VAZ, L. C. MAIA, M. M. HORNBROOK, J. M. LYNCH e C. A. ROY (1977). "Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens." **International Archives of Allergy and Applied Immunology** 55(1-6): 526-532.
- HANSON, D. G., N. M. VAZ, L. C. S. MAIA, M. M. HONRBROOK, J. M. LYNCH e C. A. ROY (1977). "Inhibition of specific immune response by feeding protein antigens." **Inter. Archs. Allergy** 55: 526-532.
- HANSON, D. G., N. M. VAZ, L. A. RAWLINGS e J. M. LYNCH (1979). "Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Effects of prior passive and active immunization." **J Immunol** 122(6): 2261-2266.
- HANSON, L. A. e S. E. HOLM (1961). "Precipitating antibodies in human sera from different age groups and in colostrum as determined by streptococcal antigens with diffusion-in-gel methods." **Acta Paediatr** 50: 7-16.
- HAPFELMEIER, S., M. A. LAWSON, E. SLACK, J. K. KIRUNDI, M. STOEL, M. HEIKENWALDER, J. CAHENZLI, Y. VELYKOREDKO, M. L. BALMER, K. ENDT, M. B. GEUKING, R. CURTISS, 3RD, K. D. MCCOY e A. J. MACPHERSON (2010). "Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses." **Science** 328(5986): 1705-1709.
- HARIBHAI, D., J. B. WILLIAMS, S. JIA, D. NICKERSON, E. G. SCHMITT, B. EDWARDS, J. ZIEGELBAUER, M. YASSAI, S. H. LI, L. M. RELLAND, P. M. WISE, A. CHEN, Y. Q. ZHENG, P. M. SIMPSON, J. GORSKI, N. H. SALZMAN, M. J. HESSNER, T. A. CHATILA e C. B. WILLIAMS (2011). "A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity." **Immunity** 35(1): 109-122.
- HASEK, M. (1953). "Vegetative hybridization of animals by joining their blood circulations during embrionic life." **Czech. Biol.** 2: 265.
- HAUET-BROERE, F., W. W. UNGER, J. GARSSSEN, M. A. HOIJER, G. KRAAL e 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(10): 2801-2810.
- HAUET-BROERE, F., W. W. UNGER, J. GARSSSEN, M. A. HOIJER, G. KRAAL e 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." **European Journal of Immunology** 33(10): 2801-2810.
- HEPPELL, L. M. e P. J. KILSHAW (1982). "Immune responses in guinea pigs to dietary protein. I. Induction of tolerance by feeding with ovalbumin." **Int Arch Allergy Appl Immunol** 68(1): 54-59.
- HEREMANS, J. F., M.-T. HEREMANS e H. E. SCHULTZE (1959). "Isolation and description of a few properties of the beta-2A globulin in secretions." **Clin. Chem. Acta** 4: 96-107.
- HERMAN, A., J. W. KAPPLER, P. MARRACK e A. M. PULLEN (1991). "Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses." **Annu Rev Immunol** 9: 745-772.
- HERZENBERG, L. A., J. TUNG, W. A. MOORE e D. R. PARKS (2006). "Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed." **Nat Immunol** 7(7): 681-685.
- HEYMAN, M. e J. F. DESJEUX (2000). "Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease." **Ann N Y Acad Sci** 915: 304-311.
- HEYMAN, M., R. DUCROC, J. F. DESJEUX e J. L. MORGAT (1982). "Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro." **Am J Physiol** 242(6): G558-564.
- HIRAHARA, K., T. HISATSUNE, K. NISHIJIMA, H. KATO, O. SHIHO e 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(12): 6238-6245.
- HUBER, S., C. SCHRAMM, H. A. LEHR, A. MANN, S. SCHMITT, C. BECKER, M. PROTSCHKA, P. R. GALLE, M. F. NEURATH e M. BLESSING (2004). "Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells." **J Immunol** 173(11): 6526-6531.
- HUSBY, S., J. MESTECKY, Z. MOLDOVEANU, S. HOLLAND e C. O. ELSON (1994). "Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding." **J Immunol** 152(9): 4663-4670.
- JERNE, N. K. (1955). "The Natural-Selection Theory of Antibody Formation." **Proc Natl Acad Sci U S A** 41(11): 849-857.
- KADAOU, K. A. e B. CORTHESEY (2007). "Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment." **J Immunol** 179(11): 7751-7757.
- KAGNOFF, M. F. (1978). "Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. II. Suppression of delayed-type hypersensitivity reactions." **J Immunol** 120(5): 1509-1513.
- KAPPLER, J., N. ROEHM e P. MARRACK (1987). "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." **Cell** 49: 271-273.
- KAPPLER, J. W., N. ROEHM e P. MARRACK (1987). "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." **Cell** 49(2): 273-280.

- KAPPLER, J. W., U. STAERZ, J. WHITE e P. C. MARRACK (1988). "Self-tolerance eliminates T cells specific for MIs-modified products of the major histocompatibility complex." **Nature** 332(6159): 35-40.
- KARLSSON, M. R., F. E. JOHANSEN, H. KAHU, A. MACPHERSON e P. BRANDTZAEG (2010). "Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system." **Allergy** 65(5): 561-570.
- KATO, H., K. FUJIHASHI, R. KATO, Y. YUKI e J. R. MCGHEE (2001). "Oral tolerance revisited: prior oral tolerization abrogates cholera toxin-induced mucosal IgA responses." **J Immunol** 166(5): 3114-3121.
- KEARNEY, E. R., K. A. PAPE, D. Y. LOH e M. K. JENKINS (1994). "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo." **Immunity** 1(4): 327-339.
- KELLY, K. A. e C. C. WHITACRE (1996). "Oral tolerance in EAE: reversal of tolerance by T helper cell cytokines." **J Neuroimmunol** 66(1-2): 77-84.
- KHOURY, S. J., W. W. HANCOCK e H. L. WEINER (1992). "Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain." **J Exp Med** 176(5): 1355-1364.
- KIM, J. M. e A. RUDENSKY (2006). "The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells." **Immunol Rev** 212: 86-98.
- KORN, T., E. BETTELLI, W. GAO, A. AWASTHI, A. JAGER, T. B. STROM, M. OUKKA e V. K. KUCHROO (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." **Nature** 448(7152): 484-487.
- KRAUS, T. A. e L. MAYER (2005). "Oral tolerance and inflammatory bowel disease." **Curr Opin Gastroenterol** 21(6): 692-696.
- KRAUS, T. A., L. TOY, L. CHAN, J. CHILDS e L. MAYER (2004). "Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease." **Gastroenterology** 126(7): 1771-1778.
- KROEMER, G. e C. MARTINEZ (1992). "Mechanisms of self tolerance." **Immunol Today** 13(10): 401-404.
- KUHN, R., J. LOHLER, D. RENNICK, K. RAJEWSKY e W. MULLER (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." **Cell** 75(2): 263-274.
- LANDSTEINER, K. (1945). **The specificity of serological reactions**. Boston, Harvard University Press.
- LEDERBERG, J. (1959). "Genes and antibodies." **Science** 129(3364): 1649-1653.
- LEE, S., N. SCHERBERG e L. J. DEGROOT (1998). "Induction of oral tolerance in human autoimmune thyroid disease." **Thyroid** 8(3): 229-234.
- LIDER, O., L. M. SANTOS, C. S. LEE, P. J. HIGGINS e H. L. WEINER (1989). "Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes." **J Immunol** 142(3): 748-752.
- LILLIEHOOK, B., H. JACOBSSON e H. BLOMGREN (1975). "Specifically decreased MLC response of lymphocytes from CBA mice injected with cells from the H-2-

- compatible, M-antigen-incompatible strain C3H. Lack of such effect after injection of H-2-disparate C3H-hybrid cells." **Scand J Immunol** 4(3): 209-216.
- LIN, J. T., S. L. MARTIN, L. XIA e J. D. GORHAM (2005). "TGF-beta 1 uses distinct mechanisms to inhibit IFN-gamma expression in CD4+ T cells at priming and at recall: differential involvement of Stat4 and T-bet." **J Immunol** 174(10): 5950-5958.
- LUTZ, H. U., C. J. BINDER e S. KAVERI (2009). "Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease." **Trends in Immunology** 30(1): 43-51.
- MA, S. W., D. L. ZHAO, Z. Q. YIN, R. MUKHERJEE, B. SINGH, H. Y. QIN, C. R. STILLER e A. M. JEVNIKAR (1997). "Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance." **Nat Med** 3(7): 793-796.
- MACDONALD, T. T. e J. SPENCER (1990). "Ontogeny of the mucosal immune response." **Springer Semin Immunopathol** 12(2-3): 129-137.
- MACPHERSON, A. J., K. D. MCCOY, F. E. JOHANSEN e P. BRANDTZAEG (2008). "The immune geography of IgA induction and function." **Mucosal Immunol** 1(1): 11-22.
- MANTIS, N. J., M. C. CHEUNG, K. R. CHINTALACHARUVU, J. REY, B. CORTHESEY e M. R. NEUTRA (2002). "Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor." **J Immunol** 169(4): 1844-1851.
- MANTIS, N. J., N. ROL e B. CORTHESEY (2011). "Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut." **Mucosal Immunol** 4(6): 603-611.
- MARTH, T., M. ZEITZ, B. R. LUDVIKSSON, W. STROBER e B. L. KELSALL (1999). "Extinction of IL-12 signaling promotes Fas-mediated apoptosis of antigen-specific T cells." **J Immunol** 162(12): 7233-7240.
- MASON, D. e F. POWRIE (1990). "Memory CD4+ T cells in man form two distinct subpopulations, defined by their expression of isoforms of the leucocyte common antigen, CD45." **Immunology** 70(4): 427-433.
- MCDERMOTT, M. R. e J. BIENENSTOCK (1979). "Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues." **J Immunol** 122(5): 1892-1898.
- MCWILLIAMS, M., J. M. PHILLIPS-QUAGLIATA e M. E. LAMM (1977). "Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis." **J Exp Med** 145(4): 866-875.
- MEDAWAR, P. B. (1946). "Immunity to homologous grafted skin. I The suppression of cell division in grafts transplanted to immunized animals." **British journal of experimental pathology** 27: 9-14.
- MEDAWAR, P. B. (1946). "Immunity to homologous grafted skin. II The relationship between the antigens of blood and skin." **British journal of experimental pathology** 27: 15-24.
- MELAMED, D., J. FISHMAN LOVELL, Z. UNI, H. L. WEINER e A. FRIEDMAN (1996). "Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin." **Int Immunol** 8(5): 717-724.

- MELAMED, D. e A. FRIEDMAN (1994). "In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression." **Eur J Immunol** 24(9): 1974-1981.
- MENARD, S., N. CERF-BENSUSSAN e M. HEYMAN (2010). "Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens." **Mucosal Immunol** 3(3): 247-259.
- MENEZES, J. S., D. S. MUCIDA, D. C. CARA, J. I. ALVAREZ-LEITE, M. RUSSO, N. M. VAZ e A. M. DE FARIA (2003). "Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system." **Int Immunol** 15(3): 447-455.
- MESTECKY, J. (2005). **Mucosal immunology**. Amsterdam ; Boston, Elsevier Academic Press.
- MEYER, A. L., J. BENSON, F. SONG, N. JAVED, I. E. GIENAPP, J. GOVERMAN, T. A. BRABB, L. HOOD e C. C. WHITACRE (2001). "Rapid depletion of peripheral antigen-specific T cells in TCR-transgenic mice after oral administration of myelin basic protein." **J Immunol** 166(9): 5773-5781.
- MIGITA, K. e A. OCHI (1994). "Induction of clonal anergy by oral administration of staphylococcal enterotoxin B." **Eur J Immunol** 24(9): 2081-2086.
- MILLER, A., O. LIDER, A. B. ROBERTS, M. B. SPORN e 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." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 89(1): 421-425.
- MILLER, J. F. (1961). "Immunological function of the thymus." **Lancet** 2(7205): 748-749.
- MILLER, S. D. e D. G. HANSON (1979). "Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin." **J Immunol** 123(5): 2344-2350.
- MODIGLIANI, Y., A. COUTINHO, P. PEREIRA, N. LE DOUARIN, V. THOMAS-VASLIN, O. BURLIN-DEFRANOUX, J. SALAUN e A. BANDEIRA (1996). "Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium." **Eur J Immunol** 26(8): 1807-1815.
- MODIGLIANI, Y., P. PEREIRA, V. THOMAS-VASLIN, J. SALAUN, O. BURLIN-DEFRANOUX, A. COUTINHO, N. LE DOUARIN e A. BANDEIRA (1995). "Regulatory T cells in thymic epithelium-induced tolerance. I. Suppression of mature peripheral non-tolerant T cells." **Eur J Immunol** 25(9): 2563-2571.
- MODIGLIANI, Y., V. THOMAS-VASLIN, A. BANDEIRA, M. COLTEY, N. M. LE DOUARIN, A. COUTINHO e J. SALAUN (1995). "Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype." **Proc Natl Acad Sci U S A** 92(16): 7555-7559.
- MONTGOMERY, P. C., A. AYYILDIZ, I. M. LEMAITRE-COELHO, J. P. VAERMAN e J. H. ROCKEY (1983). "Induction and expression of antibodies in secretions: the ocular immune system." **Ann N Y Acad Sci** 409: 428-440.

- MONTGOMERY, P. C., S. A. KHALEEL, J. GOUDSWAARD e G. VIRELLA (1977). "Selective transport of an oligomeric IgA into canine saliva." **Immunol Commun** 6(6): 633-642.
- MONTGOMERY, P. C., B. R. ROSNER e J. COHN (1974). "The secretory antibody response. Anti-DNP antibodies induced by dinitrophenylated type 3 pneumococcus." **Immunol Commun** 3(2): 143-156.
- MOSKOPHIDIS, D., E. LAINE e R. M. ZINKERNAGEL (1993). "Peripheral clonal deletion of antiviral memory CD8+ T cells." **Eur J Immunol** 23(12): 3306-3311.
- MUCIDA, D. S., D. RODRIGUEZ, A. C. KELLER, E. GOMES, J. S. MENEZES, A. M. DE FARIA e M. RUSSO (2004). "Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet." **Ann N Y Acad Sci** 1029: 361-365.
- MUELLER, D. L., M. K. JENKINS e R. H. SCHWARTZ (1989). "Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy." **Annu Rev Immunol** 7: 445-480.
- NAKAO, A., M. KASAI, K. KUMANO, H. NAKAJIMA, K. KURASAWA e I. IWAMOTO (1998). "High-dose oral tolerance prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways." **Int Immunol** 10(4): 387-394.
- NEURATH, M. F., I. FUSS, B. L. KELSALL, D. H. PRESKY, W. WAEGELL e W. STROBER (1996). "Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance." **J Exp Med** 183(6): 2605-2616.
- NEUTRA, M. R., N. J. MANTIS e J. P. KRAEHENBUHL (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." **Nat Immunol** 2(11): 1004-1009.
- NEWBY, T. J. e F. J. BOURNE (1976). "Relative resistance of bovine and porcine immunoglobulins to proteolysis." **Immunol Commun** 5(7-8): 631-635.
- NGAN, J. e L. S. KIND (1978). "Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin." **J Immunol** 120(3): 861-865.
- NOSSAL, G. J. e B. L. PIKE (1975). "Evidence for the clonal abortion theory of B-lymphocyte tolerance." **J Exp Med** 141(4): 904-917.
- OBATA, T., Y. GOTO, J. KUNISAWA, S. SATO, M. SAKAMOTO, H. SETOYAMA, T. MATSUKI, K. NONAKA, N. SHIBATA, M. GOHDA, Y. KAGIYAMA, T. NOCHI, Y. YUKI, Y. FUKUYAMA, A. MUKAI, S. SHINZAKI, K. FUJIHASHI, C. SASAKAWA, H. IIJIMA, M. GOTO, Y. UMESAKI, Y. BENNO e H. KIYONO (2010). "Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis." **Proc Natl Acad Sci U S A** 107(16): 7419-7424.
- OGRA, S. S. e P. L. OGRA (1978). "Immunologic aspects of human colostrum and milk. II. Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different times after the onset of lactation." **J Pediatr** 92(4): 550-555.
- OHASHI, P. S., S. OEHEN, K. BUERKI, H. PIRCHER, C. T. OHASHI, B. ODERMATT, B. MALISSEN, R. M. ZINKERNAGEL e H. HENGARTNER

- (1991). "Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice." **Cell** 65(2): 305-317.
- OHKI, H., C. MARTIN, C. CORBEL, M. COLTEY e N. M. LE DOUARIN (1987). "Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds." **Science** 237(4818): 1032-1035.
- OIDA, T. e H. L. WEINER (2010). "TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction." **PLoS One** 5(11): e15523.
- OIDA, T., X. ZHANG, M. GOTO, S. HACHIMURA, M. TOTSUKA, S. KAMINOGAWA e H. L. WEINER (2003). "CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism." **J Immunol** 170(5): 2516-2522.
- OWEN, R. D. (1945). "Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins." **Science** 102: 400-401.
- PARAMESWARAN, N., D. J. SAMUVEL, R. KUMAR, S. THATAI, V. BAL, S. RATH e A. GEORGE (2004). "Oral tolerance in T cells is accompanied by induction of effector function in lymphoid organs after systemic immunization." **Infect Immun** 72(7): 3803-3811.
- PARMELY, M. J., A. E. BEER e R. E. BILLINGHAM (1976). "In vitro studies on the T-lymphocyte population of human milk." **J Exp Med** 144(2): 358-370.
- PENG, H. J., M. W. TURNER e S. STROBEL (1989). "Failure to induce oral tolerance to protein antigens in neonatal mice can be corrected by transfer of adult spleen cells." **Pediatr Res** 26(5): 486-490.
- PEREIRA, P., E. L. LARSSON, L. FORNI, A. BANDEIRA e A. COUTINHO (1985). "Natural effector T lymphocytes in normal mice." **Proc Natl Acad Sci U S A** 82(22): 7691-7695.
- PETERSON, D. A., N. P. MCNULTY, J. L. GURUGE e J. I. GORDON (2007). "IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis." **Cell Host Microbe** 2(5): 328-339.
- PIKE, B. L., J. ABRAMS e G. J. NOSSAL (1983). "Clonal anergy: inhibition of antigen-driven proliferation among single B lymphocytes from tolerant animals, and partial breakage of anergy by mitogens." **Eur J Immunol** 13(3): 214-220.
- PORDEUS, V., G. C. RAMOS, C. R. CARVALHO, A. B. CASTRO JUNIOR, A. P. CUNHA e N. M. VAZ (2009). "Immunopathology and oligoclonal T cell expansions. Observations in immunodeficiency, infections, allergy and autoimmune diseases." **Current Trends in Immunology** 10: 21-29.
- POWRIE, F. e D. MASON (1990). "OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset." **J Exp Med** 172(6): 1701-1708.
- POWRIE, F., S. MAUZE e R. L. COFFMAN (1997). "CD4+ T-cells in the regulation of inflammatory responses in the intestine." **Res Immunol** 148(8-9): 576-581.
- QIN, S., S. P. COBBOLD, H. POPE, J. ELLIOTT, D. KIOUSSIS, J. DAVIES e H. WALDMANN (1993). ""Infectious" transplantation tolerance." **Science** 259(5097): 974-977.
- RAMMENSEE, H. G., R. KROSCHEWSKI e B. FRANGOULIS (1989). "Clonal anergy induced in mature V beta 6+ T lymphocytes on immunizing Mls-1b mice with Mls-1a expressing cells." **Nature** 339(6225): 541-544.

- RAMOS, G. C., S. DALBO, D. P. LEITE, E. GOLDFEDER, C. R. CARVALHO, N. M. VAZ e J. ASSREUY (2012). "The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing." **Autoimmunity** 45(3): 233-244.
- RAMOS, G. C., C. M. RODRIGUES, G. M. AZEVEDO JR, V. PINHO, C. R. CARVALHO e N. M. VAZ (2009). "Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins." **Immunology** 126(3): 354-362.
- READ, S., V. MALMSTROM e F. POWRIE (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." **J Exp Med** 192(2): 295-302.
- RESCIGNO, M., M. URBANO, B. VALZASINA, M. FRANCOLINI, G. ROTTA, R. BONASIO, F. GRANUCCI, J. P. KRAEHENBUHL e P. RICCIARDI-CASTAGNOLI (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." **Nat Immunol** 2(4): 361-367.
- RICHMAN, L. K. (1979). Immunological unresponsiveness after enteric administration of protein antigens. **Immunology of breast milk**. P. L. Ogra e D. Dayton. N. York, Raven Press: 49-61.
- RICHMAN, L. K., J. M. CHILLER, W. R. BROWN, D. G. HANSON e N. M. VAZ (1978). "Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins." **J Immunol** 121(6): 2429-2434.
- RICHMAN, L. K., A. S. GRAEFF, R. YARCHOAN e W. STROBER (1981). "Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding." **J Immunol** 126(6): 2079-2083.
- ROBEY, E. e J. URBAIN (1991). "Tolerance and immune regulation." **Immunol Today** 12(6): 175-177.
- ROBEY, I. F., S. F. SCHLUTER, E. AKPORIAYE, D. E. YOCUM e J. J. MARCHALONIS (2002). "Human monoclonal natural autoantibodies against the T-cell receptor inhibit interleukin-2 production in murine T cells." **Immunology** 105(4): 419-429.
- ROCHA, B., A. GRANDIEN e A. A. FREITAS (1995). "Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance." **J Exp Med** 181(3): 993-1003.
- RODRIGUES, C. M., O. A. MARTINS-FILHO, N. M. VAZ e C. R. CARVALHO (2006). "Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis." **Immunology** 117(4): 517-525.
- ROUX, M. E., M. MCWILLIAMS, J. M. PHILLIPS-QUAGLIATA, P. WEISZ-CARRINGTON e M. E. LAMM (1977). "Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland." **J Exp Med** 146(5): 1311-1322.
- RUDDLE, N. H. e E. M. AKIRAV (2009). "Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response." **J Immunol** 183(4): 2205-2212.

- RUDZIK, R., R. L. CLANCY, D. Y. PEREY, R. P. DAY e J. BIENENSTOCK (1975). "Repopulation with IgA-containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patch and bronchial lymphocytes." **J Immunol** 114(5): 1599-1604.
- RUSSO, M., S. JANCAR, A. L. PEREIRA DE SIQUEIRA, J. MENGEL, E. GOMES, S. M. FICKER e A. M. CAETANO DE FARIA (1998). "Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance." **Immunol Lett** 61(1): 15-23.
- SAKAGUCHI, S., N. SAKAGUCHI, M. ASANO, M. ITOH e M. TODA (1995). "Immunological self-tolerance is maintained by activated T cell expressing Il-2 receptor α -chains (CD25) - Breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases." **Journal of Immunology** 155: 1151-1164.
- SAKAGUCHI, S., T. TAKAHASHI e Y. NISHIZUKA (1982). "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis." **J Exp Med** 156(6): 1577-1586.
- SAKAGUCHI, S., T. TAKAHASHI e Y. NISHIZUKA (1982). "Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer." **J Exp Med** 156(6): 1565-1576.
- SAKLAYEN, M. G., A. J. PESCE, V. E. POLLAK e J. G. MICHAEL (1984). "Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen." **Int Arch Allergy Appl Immunol** 73(1): 5-9.
- SANTIAGO, A. F., R. M. FERNANDES, B. P. SANTOS, F. A. ASSIS, R. P. OLIVEIRA, C. R. CARVALHO e A. M. FARIA (2008). "Role of mesenteric lymph nodes and aging in secretory IgA production in mice." **Cell Immunol** 253(1-2): 5-10.
- SAYEGH, M. H., Z. J. ZHANG, W. W. HANCOCK, C. A. KWOK, C. B. CARPENTER e H. L. WEINER (1992). "Down-regulation of the immune response to histocompatibility antigens and prevention of sensitization by skin allografts by orally administered alloantigen." **Transplantation** 53(1): 163-166.
- SCHULZ, O., E. JAENSSON, E. K. PERSSON, X. LIU, T. WORBS, W. W. AGACE e O. PABST (2009). "Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions." **J Exp Med** 206(13): 3101-3114.
- SCHWARTZ, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." **Science** 248(4961): 1349-1356.
- SCHWARTZ, R. H., D. L. MUELLER, M. K. JENKINS e H. QUILL (1989). "T-cell clonal anergy." **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 54 Pt 2: 605-610.
- SHEVACH, E. M. (2000). "Regulatory T cells in autoimmunity*." **Annu Rev Immunol** 18: 423-449.
- SIMIONI, P. U., L. FERNANDES, D. L. GABRIEL e W. TAMASHIRO (2004). "Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin." **Scandinavian Journal of Immunology** 60(3): 257-266.
- SKEEN, M. J., M. A. MILLER, T. M. SHINNICK e H. K. ZIEGLER (1996). "Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo,

- restimulation in vitro, and modulation by other cytokines." **J Immunol** 156(3): 1196-1206.
- SMITH, K. M., J. M. DAVIDSON e P. GARSIDE (2002). "T-cell activation occurs simultaneously in local and peripheral lymphoid tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division." **Immunology** 106(2): 144-158.
- SMITH, R. T. e R. A. BRIDGES (1958). "Immunological unresponsiveness in rabbits produced by neonatal injection of defined antigens." **The Journal of experimental medicine** 108(2): 227-250.
- STEPHENS, L. A. e D. MASON (2000). "CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations." **J Immunol** 165(6): 3105-3110.
- STOKES, C. R., T. J. NEWBY, J. H. HUNTLEY, D. PATEL e F. J. BOURNE (1979). "The immune response of mice to bacterial antigens given by mouth." **Immunology** 38(3): 497-502.
- STOKES, C. R., E. T. SWARBRICK e J. F. SOOTHILL (1983). "Genetic differences in immune exclusion and partial tolerance to ingested antigens." **Clin Exp Immunol** 52(3): 678-684.
- STROBEL, S. e 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(7): 588-594.
- STROBEL, S. e A. FERGUSON (1987). "Persistence of oral tolerance in mice fed ovalbumin is different for humoral and cell-mediated immune responses." **Immunol.** 60: 317-318.
- STROBEL, S. e A. M. MOWAT (1998). "Immune responses to dietary antigens: oral tolerance." **Immunol Today** 19(4): 173-181.
- SUKO, M., A. MORI, K. ITO e H. OKUDAIRA (1995). "Oral immunotherapy may induce T cell anergy." **Int Arch Allergy Immunol** 107(1-3): 278-281.
- SUN, J. (2003). "Cell cycle block in anergic T cells during tolerance induction." **Cellular Immunology** 225(1): 33-41.
- SUN, J. B., J. HOLMGREN e C. CZERKINSKY (1994). "Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance." **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(23): 10795-10799.
- SUZUKI, K. e S. FAGARASAN (2009). "Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut." **Mucosal Immunol** 2(6): 468-471.
- SUZUKI, K., M. MARUYA, S. KAWAMOTO e S. FAGARASAN (2010). "Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity." **Immunol Rev** 237(1): 180-190.
- SUZUKI, K., B. MEEK, Y. DOI, M. MURAMATSU, T. CHIBA, T. HONJO e S. FAGARASAN (2004). "Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut." **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(7): 1981-1986.
- SWARBRICK, E. T., C. R. STOKES e J. F. SOOTHILL (1979). "Absorption of antigens after oral immunisation and the simultaneous induction of specific systemic tolerance." **Gut** 20(2): 121-125.

- TAAMS, L. S., A. J. VAN RENSEN, M. C. POELEN, C. A. VAN ELS, A. C. BESSELING, J. P. WAGENAAR, W. VAN EDEN e M. H. WAUBEN (1998). "Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell." **Eur J Immunol** 28(9): 2902-2912.
- TAKAHASHI, T., Y. KUNIYASU, M. TODA, N. SAKAGUCHI, M. ITOH, M. IWATA, J. SHIMIZU e 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(12): 1969-1980.
- TITUS, R. G. e J. M. CHILLER (1981). "Orally induced tolerance. Definition at the cellular level." **Int Arch Allergy Appl Immunol** 65(3): 323-338.
- TOBAGUS, I. T., W. R. THOMAS e P. G. HOLT (2004). "Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period." **Journal of Immunology** 172(4): 2274-2285.
- TRAUB, E. (1939). "Epidemiology of lymphocytic choriomeningitis in a mouse stock observed for four years." **J. Exp. Med.** 69: 801-817.
- TSUJI, N. M. e A. KOSAKA (2008). "Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells." **Trends in Immunology** 29(11): 532-540.
- TSUJI, N. M., K. MIZUMACHI e J. KURISAKI (2001). "Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance." **Immunology** 103(4): 458-464.
- VAN HOUTEN, N. e S. F. BLAKE (1996). "Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction." **Journal of Immunology** 157(4): 1337-1341.
- VAZ, N. e C. R. CARVALHO (1994). "Assimilation, tolerance and the end of innocence." **Ciencia e Cultura** 46(5/6): 351-357.
- VAZ, N. M., L. C. MAIA, D. G. HANSON e 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(2): 110-115.
- VAZ, N. M., L. C. MAIA, D. G. HANSON e J. M. LYNCH (1981). "Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance." **Mem Inst Oswaldo Cruz** 76(1): 83-91.
- VERDOLIN, B. A., S. M. FICKER, A. M. FARIA, N. M. VAZ e C. R. CARVALHO (2001). "Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction." **Braz J Med Biol Res.** 34(2): 211-219.
- VON BEHRING, E. e S. KITASATO (1890). "The mechanism of immunity in animals to diphtheria and tetanus." **Deutsche Medizinische Wochenschrift** 16: 1113-1114.
- WAN, Y. Y. e R. A. FLAVELL (2007). "'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation." **Immunol Rev** 220: 199-213.
- WEBB, S., C. MORRIS e J. SPRENT (1990). "Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity." **Cell** 63(6): 1249-1256.

- WEINER, H. L. (2001). "Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells." **Immunol Rev** 182: 207-214.
- WEINER, H. L. (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells." **Microbes Infect** 3(11): 947-954.
- WELLS, H. G. (1911). "Studies on the chemistry of anaphylaxis.III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg." **J.Inf.Dis.** 9: 147-171.
- WHITACRE, C. C., I. E. GIENAPP, C. G. OROSZ e D. M. BITAR (1991). "Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy." **Journal of Immunology** 147(7): 2155-2163.
- WIJBURG, O. L., T. K. UREN, K. SIMPFENDORFER, F. E. JOHANSEN, P. BRANDTZAEG e R. A. STRUGNELL (2006). "Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection." **J Exp Med** 203(1): 21-26.
- WINSTEAD, C. J., C. S. REILLY, J. J. MOON, M. K. JENKINS, S. E. HAMILTON, S. C. JAMESON, S. S. WAY e A. KHORUTS (2010). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia." **J Immunol** 184(9): 4749-4760.
- WORBS, T., U. BODE, S. YAN, M. W. HOFFMANN, G. HINTZEN, G. BERNHARDT, R. FORSTER e O. PABST (2006). "Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells." **Journal of Experimental Medicine** 203(3): 519-527.
- ZHENG, S. G., J. H. WANG, J. D. GRAY, H. SOUCIER e D. A. HORWITZ (2004). "Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10." **J Immunol** 172(9): 5213-5221.

8. ANEXOS

8.1 CERTIFICADO CETEA - UFMG



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 7/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Aspectos sistêmicos da ativação linfocitária na tolerância oral**", que tem como responsável(is) **Nelson Monteiro Vaz**, 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 **24/ 03/2010**.

Este certificado expira-se em **24/ 03/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 7/2010**, related to the project entitled "**Systemics aspects of lymphocyte activation in oral tolerance**", under the supervisors of **Nelson Monteiro Vaz**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 24, 2010**.

This certificate expires in **March 24, 2015**.

Belo Horizonte, 31 de Março de 2010.

Lucas A.M. Ferreira
Pl **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
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

8.2 ARTIGO PUBLICADO

CASTRO-JUNIOR, A. B., B. C. HORTA, A. C. GOMES-SANTOS, A. P. CUNHA, R. SILVA STEINBERG, D. S. NASCIMENTO, A. M. FARIA e N. M. VAZ (2012). "Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity." **Cell Immunol** 280(2): 171-181.



Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity

Archimedes Barbosa Castro-Junior^{a,*}, Bernardo Coelho Horta^a, Ana Cristina Gomes-Santos^a,
 Andre Pires Cunha^{a,1}, Raphael Silva Steinberg^b, Danielle Santiago Nascimento^c,
 Ana Maria Caetano Faria^a, Nelson Monteiro Vaz^a

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, IFF, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2011

Accepted 17 December 2012

Available online 5 January 2013

Keywords:

Oral tolerance

Lymphocyte activation

Regulatory T cells

Immunoglobulin-secreting cells

Kinetics

Cytokines

ABSTRACT

Oral tolerance is defined as an inhibition of specific immune responsiveness to a previously ingested antigen. Paradoxically, we found an increased lymphocyte activity in tolerant mice alongside the specific inhibition. Orally-tolerant mice presented higher number of immunoglobulin secreting cells (ISC) in spleen and bone marrow; showed a greater variety of Ig classes being produced: IgM and IgA in the spleen and IgG and IgM in the bone marrow. ISC from immunized mice produced mainly IgG. Despite having the same number of regulatory and activated T cells in the spleen after immunization, these cells appeared earlier in tolerant mice, right after the primary immunization. Also, tolerant mice showed a prompt expression of regulatory cytokines (TGF- β and IL-10) and a transient expression of effector cytokines (IL-2 and IFN- γ). Thus, in addition to an inhibited specific responsiveness, orally-tolerant mice displayed an early and widespread mobilization of activated and regulatory lymphocytes.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In the first decades of last century, several independent experiments showed that the ingestion of immunogenic proteins had the unexpected consequence of reducing specific immune reactions to subsequent immunization [1–4]. In 1946, Chase described a way to inhibit experimental drug allergy (contact sensitization) by prior feeding of the sensitizing agents [5]. As “negative” phenomena, these puzzling findings remained unexamined up to the mid 1970s, when they were again observed as powerful interferences of ingested proteins with subsequent immunization [6–8], which also included a natural relative unresponsiveness to the autochthonous microbiota [9].

Oral tolerance has been intensely investigated and is considered a special case of “peripheral tolerance”, i.e., as a subtractive phenomenon. First raised by Burnet and Fenner [10], the notion of “specific immune tolerance” became a central tenet of immunological theory [11] supported by experimental findings of Medawar and collaborators, who rendered neonatal mice “tolerant” to skin

allografts and suggested that this depended on the deletion or permanent inhibition (anergy) of allo-reactive lymphocytes [12]. In line with this reasoning, “oral tolerance” was interpreted as necessary to ensure unresponsiveness to harmless antigens (food proteins and commensal bacteria), however, retaining the ability to eliminate pathogens [13]. Oral tolerance can be adoptively transferred to syngeneic recipients by T cells [14] and, therefore, is not a subtractive phenomenon, but rather has positive, systemic aspects. More specifically, the transfer of special T cell subsets with regulatory phenotypes, such as CD4+CD25+CD45RB^{low} or CD4+CD25+Foxp3+, demonstrated the participation of these cells in oral tolerance induction [15]. Also, CD4+CD25+LAP+regulatory T cells, that have a membrane bound form of TGF- β named latent associated peptide (LAP), have been implicated in oral tolerance [16–18]. These T cells would restrict the specific immunological reactivity to food proteins and the gut microbiota through immunosuppressive cytokines, such as IL-10 and TGF- β [19,20]. Although the generation of regulatory T cells has been described as a dominant mechanism for oral tolerance induction, the majority of studies focus only on inhibition of specific lymphocyte activity. Furthermore, the original experiments by Medawar’s group were replicated and contradicted. As measured by the acceptance of an allogeneic skin graft, allograft tolerance correlates with high levels of T and B lymphocyte activity, rather than their unresponsiveness [21]. Mice that accepted the allograft had many more activated lymphocytes in their spleen than mice that rejected a similar

* Corresponding author. Address: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +55 31 3409 2640.

E-mail address: archimedesjunior@yahoo.com.br (A.B. Castro-Junior).

¹ Present address: Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women’s Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

graft. This suggested dominant tolerant mechanisms as opposed to a recessive, deletional mechanisms [22] and proposed another way to understand tolerance, not only as an inhibition of specific immunological reactivity, but as a reflection of systemic phenomena that buffer antigen perturbations with more global lymphocyte activity. Little attention has been given to these results and even less to global immunological activities proposed to be involved in oral tolerance.

Our aim in the present study was to analyze global profiles of lymphocyte activation of mice rendered orally-tolerant by the ingestion of ovalbumin (OVA) submitted to priming and booster immunizations. We showed that global lymphocyte activity in these tolerant animals was heighten, in spite of their reduced lymphocyte responsiveness to OVA. The frequency of immunoglobulin secreting cells (ISC) in the spleen and bone marrow of orally-tolerant mice was higher than that of immunized (non-tolerant) mice, with the prevalence of IgA and IgM (in spleen) or IgM and IgG (in bone marrow). Additionally, when compared to immunized mice after priming immunization, tolerant mice showed an earlier appearance of regulatory and activated T cells supported by a prompt expression of regulatory cytokine (IL-10 and TGF- β) alongside a transient expression of lymphocyte effector cytokines (IFN- γ and IL-2) when compared to immunized mice after priming immunization.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Female 8 week old C57BL/6 mice were obtained from our animal facility (CEBIO, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brazil) and maintained in our animal breeding unit throughout the experiments. The animals were handled according to the rules established by the Local Ethical Committee for animal research (CETEA-UFMG, Brazil). Each experimental group contained 4–5 mice. The experiments were repeated at least twice.

2.2. Antigen and adjuvant

Crystallized hen's egg albumin (OVA, grade V, Sigma, St. Louis, MO) was used as antigen on immunization protocols. Aluminum hydroxide [Al(OH)₃] was used as adjuvant.

2.3. Oral tolerance induction

Oral tolerance to OVA was induced by enforcing mice to drink, *ad libitum*, a 1/5 solution of hen egg white in drinking water for 3 consecutive days. Oral treatment was discontinued 7 days before parenteral immunization. The egg white solution was prepared in our laboratory from eggs bought at supermarkets. Daily average consumption was estimated at 20 mg OVA/mouse and this resulted in significant levels of tolerance. Bottles were changed every day to avoid contamination. Control groups received filtered tap water.

2.4. Parenteral immunizations

Mice were actively sensitized by an intraperitoneal (i.p.) injection of 0.2 ml of saline (0.9% NaCl) containing 10 μ g of OVA (Sigma, St. Louis, MO) adsorbed in 1 mg of aluminum hydroxide, Al(OH)₃. Fourteen days later, the animals received the same dose of OVA in saline. Control animals received 0.2 ml of sterile saline.

2.5. Analysis of Ig isotypes by ELISA

Levels of total and OVA-specific IgG1, IgE, IgM and IgA in the sera were determined by ELISA. Briefly, 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight with 2 μ g of OVA in 100 μ l/well of sodium carbonate buffer, pH 9.6, at 4 °C. To measure total levels of antibodies, plates were covered with unlabeled goat anti-mouse Ig (Southern Biotechnology). Plates were washed and blocked with 200 μ l of PBS contain 0.25% casein for 1 h at room temperature (RT). The plates were then washed again, and incubated for 1 h at RT with dilutions of mouse serum samples starting at 1/100 in PBS-casein. Plates were washed and then peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibodies against mouse IgG1, IgE, IgM or IgA (Southern Biotechnology) were added, and plates were incubated for 1 h at 37 °C. Color reaction was developed at room temperature with 100 μ l/well of orthophenylenediamine (1 mg/ml), 0.04% H₂O₂ substrate in sodium citrate buffer, pH 5.0 for 20 min. Reaction was stopped by the addition of 20 μ l/well of 2 N H₂SO₄. Absorbance was measured at 490 nm by an ELISA reader (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). ELISA scores (Elisa*) anti-OVA were computed by running sums of optical densities between 1:100 and 1:12,800 of serum dilutions in individual mice. Each score is shown as a mean \pm SEM of respective group.

2.6. Cell culture and isolation of total RNA

Spleen cells were cultured in 24-well plates at 5 \times 10⁶ cells/ml in RPMI medium supplemented with 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (GIBCO) and 5 \times 10⁻⁵ M 2-ME (Sigma). Cells were stimulated with 0.1 μ g/ml of anti-CD3 and maintained for 24–48 h in 5% of CO₂ humidified chamber. Then total RNA was extracted from cultured cells using TRIzol (Gibco BRL, USA) derived from the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi [23] according to manufacturer's protocol.

2.7. qPCR

The PCR technique was used to amplify the synthesized cDNA from cell culture employing the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI Prism 7500 fast sequence detection system (Applied Biosystems), as indicated by manufacturer. oligonucleotides pairs were synthesized as follows: for IL-2 – F: 5'-CTCCTGAGCAGGATGGAGAATT-3' and R: 5'-CGCAGAGGTCCAAGTGTAGCT-3'; IL-4 F: 5'-CATCGGCATTTGAACGAGGTCA-3' and R: 5'-CTTATCGATGAATCCAGGCATCG-3'; IL-10 F: 5'-AAGCTGAGAACAAGACCCAGACATCAAGGCG-3' and R: 5'-AGCTATCCCAGAGCCC-CAGATCCGATTTTGG-3'; TGF-B1 – F: 5'-GCAACATGTGGAAGTCTA CCAG-3' and R: 5'-CAGCCACTCAGGCGTATCA-3'; INF- γ : F: 5'-CAGCAACAGCAAGGCGAAA-3' and R: 5'-CGCTTCTGAGGCTGGATT-3'. The β -actin gene was used as internal control in all reactions (F: 5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3' and R: 5'-ACATCTGCTGGAAGTGGAC-3').

2.8. Flow cytometry

The immunophenotyping of murine spleen cells was analyzed by flow cytometry. Briefly, cells were washed twice in PBS containing 3% BSA and 0.1% sodium azide. Cells (3 \times 10⁵) were subsequently stained, according to standard methods. The mAbs used were as follows: rat anti-mouse CD4-PE, rat anti-mouse CD8-PE, rat anti-mouse CD45RB-PE, rat anti-mouse CD19-FITC, rat anti-CD25-biotin, rat anti-mouse CD69-PerCP, rat anti-mouse CD44-PE, all from BD Pharmingen. Rat anti-mouse LAP-biotin was purchased from eBioscience. Foxp3 staining and analysis were per-

formed using the Foxp3 staining set (clone FJK-16s; eBioscience) according to the manufacturer's instructions. For biotinylated antibodies an extra step with Cy5-conjugated streptavidin to stain cells. Stained cells were resuspended in PBS containing 3% BSA and 0.1% sodium azide. Cell samples were analyzed on a FACScan Flow Cytometry (Becton Dickinson). Analyses were performed using FlowJo™ software (Tree Star, Inc.) by gating the lymphocytes population on the basis of relative size (forward light scatter) and granularity (side angle scatter). Results were expressed as the percentage and absolute numbers of each lymphocyte population. The gating definition was based on fluorescence minus one (FMO) controls where cells are stained with all antibodies excluding the one of the interest for gating (see Supplementary Fig. 1) [47].

2.9. ELISPOT assay

The number of immunoglobulin-secreting cells (ISC) was determined in a modified version of Elisa spot assay described by Czerkinsky et al. [24]. Briefly, 96-well flat bottom microtitre plates (NUNC) were coated with anti-Ig heavy-chain specific antibody diluted in K1K2 buffer (pH 5.0). Spleen or bone marrow cells were harvested and plated at concentration of 50,000 cells in the first wells and submitted to serial dilutions (1:2) until 250 cells in final well. Plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ humidified cell chamber for 5 h. The cells were then lysed with distilled water and the plates were washed with PBS to remove cell debris. Subsequently the plates were incubated for 2 h with biotin-conjugated antibodies to mouse Ig heavy and light, μ , γ or α chains (Southern Biotechnology) at concentration of 1 μ g/ml in PBS-Casein 2%. Alkaline-phosphatase (AP) conjugated streptavidin were used for incubation before subsequent revelation. The plates were washed with PBS-Tween 0.05%, after which 100 μ l of substrate solution containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) in 1 mM AMP buffer (2-amino-2-methyl-1-propanolol). The plates were incubated at 37 °C until blue spots were visible, which were counted under a microscope (5-fold amplification).

2.10. Statistical methods

Standard error of the mean (SEM) and P values were determined using Prism™ software (GraphPad Software, Inc.). P values were calculated using appropriate 2-tailed *t* test or ANOVA analysis followed by Tukey post-test with a 95% confidence interval. The results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. Inhibition of anti-ova antibodies in tolerant mice was parallel to augmented serum levels of total IgM and equal levels of total IgA as compared to immunized mice

To compare the activation profile of lymphocytes from tolerant and immunized animals, C57BL/6 mice were rendered tolerant to OVA by oral administration in the drinking bottle of an egg-white solution for 3 days. Seven days after oral treatment mice were i.p. immunized with OVA in Al(OH)₃ and 14 days thereafter they received a booster immunization with OVA in saline. Animals not pre-treated with oral OVA were considered immunized mice. Control group consists of non-manipulated animals (Fig. 1A). Serum titers of specific antibodies (anti-OVA) were measured to evaluate tolerance induction. As shown in Fig 1B, immunized animals presented increasing levels of specific anti-OVA antibody responses while the levels of tolerant mice

remained low, closer to those from control, naive mice. The formation of anti-ova antibodies of all isotypes, IgG1, IgE, IgM and IgA in tolerant mice was inhibited (Fig. 1C–F). These data confirm the tolerant status of the mice by previously feeding ovalbumin. Next, we analyzed the serum levels of total (non-specific) IgG1, IgE, IgM and IgA. Total (non-specific) IgG1 and IgE levels in tolerant mice were lower as seen with specific antibodies (Fig 2A and B). However higher levels of IgM (Fig 2C) and similar levels of IgA (Fig 2D) were found in tolerant mice as compared to immunized mice.

3.2. Tolerant and immunized mice present similar pattern of lymphocyte activation after booster immunization with ovalbumin

As the best time to verify the inhibition of specific activity in tolerant animals is after booster immunization we decided to analyze phenotype spleen lymphocyte at this time point. We examined the presence of activated lymphocyte and regulatory T cells (Fig. 3).

Analysis of lymphocyte activation was unable to distinguish tolerant from immunized mice; both presented same frequency and number of CD4+CD69+T cells (Fig. 3A and B) as well as CD19+CD69+B cells (Fig. 3C and D). Tolerant mice showed higher frequency of CD4+CD44hi effector T cell but absolute numbers were similar when compared to immunized mice (Fig. 3E and F). Interestingly, immunized and tolerant mice also displayed similar frequency and number of regulatory T cells: CD4+CD25+CD45RB^{low} (Fig. 3G and H) and CD4+CD25+LAP+T cell at this time (Fig. 3I and J). Although no differences were found regarding the frequency of CD4+Foxp3+T cells between groups, tolerant and immunized mice showed elevated numbers of these cells as compared to control mice.

We also measured the cytokines levels in cultured spleen cells by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR). Immunized mice had more IL-4 and IFN- γ (Fig. 4B and C) and tolerant mice presented higher levels of TGF- β (Fig. 4E). Tolerant mice presented IL-2 levels similar to those of immunized mice (Fig. 4A). Interestingly, both immunized and tolerant mice showed similar higher levels of IL-10 (Fig. 4D). These results indicate that in spite of specific inhibition of lymphocyte activity, tolerant mice also showed similar levels of global lymphocyte activity. Nevertheless this activity has a different outcome mediated by distinctive cytokine profile.

3.3. Tolerant mice displayed higher numbers of immunoglobulin secreting cells (ISC) in spleen and bone marrow

We assessed the production of immunoglobulin-secreting cells (ISC) in spleen (Fig. 5A–E) and bone marrow (Fig. 5F–J) of mice after priming and booster immunization by ELISPOT. After priming immunization, with antigen in adjuvant, tolerant and immunized mice presented similar number of ISC either in spleen (Fig. 5A) or bone marrow (Fig. 5F). After booster immunization, tolerant mice have higher number of ISC both in spleen (Fig. 5B) and in bone marrow (Fig. 5G) compared to immunized mice. Moreover immunoglobulin class composition of these ISC differed between tolerant and immunized mice. In the spleen, immunized mice had more IgG-secreting ISC (Fig. 5C), while tolerant mice had more IgA- and IgM-secreting cells (Fig 5D and E). As compared to immunized mice, the bone marrow of tolerant mice had higher number of IgG- and IgM-secreting cells (Fig. 5H and I). These results reinforce the preceding one showing elevated serum levels of total IgM and IgA in tolerant mice (Fig. 2C and D) and point to a high functional activity of B cells in tolerant mice, in spite of specific antibody inhibition.

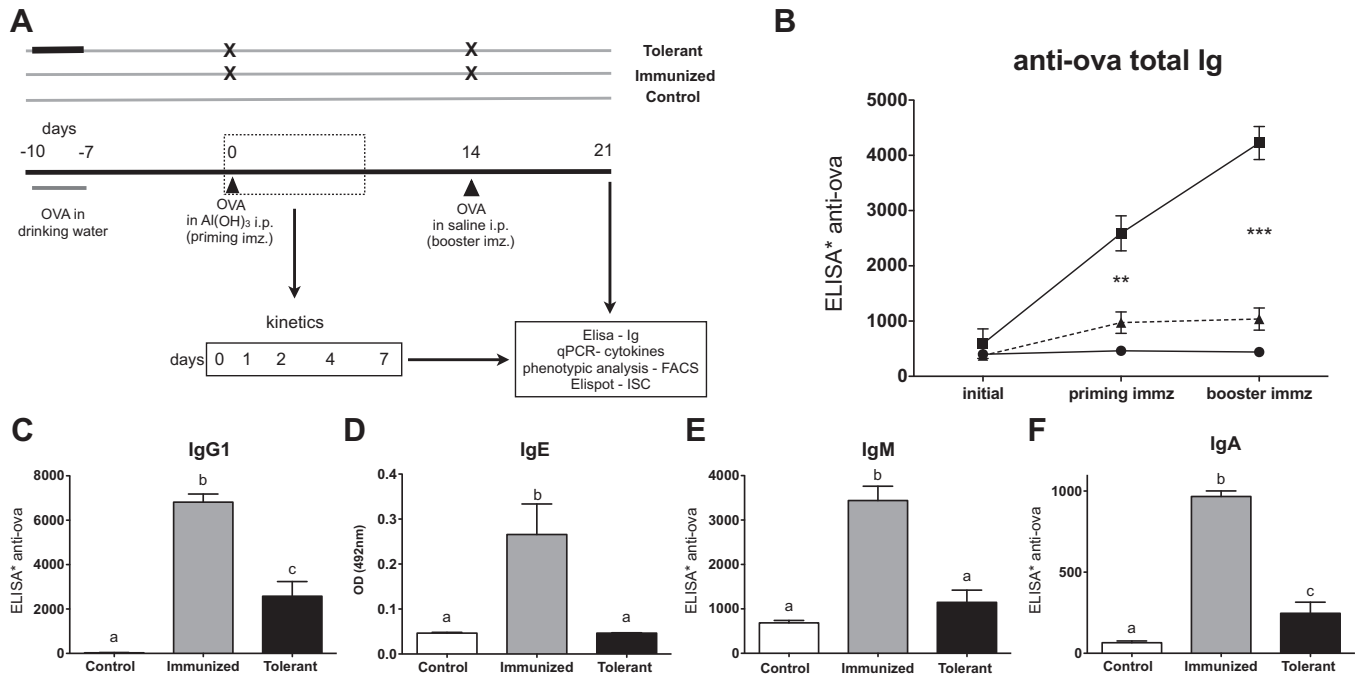


Fig. 1. Oral administration of ovalbumin induces inhibition of specific anti-ova antibodies in serum. (A) Tolerization protocol and experimental groups. Groups of C57BL/6 mice were administered a 1:5 solution of egg white in drinking water for three consecutive days (days –10 to –7). Seven days later, the mice were immunized i.p. with 10 μ g of OVA in 1 mg of Al(OH)₃ (day 0) and boosted 14 days thereafter with 10 μ g of OVA in PBS. (B) Blood serum was collected in the beginning of the experiment and after each immunization when the levels of anti-ova total Ig antibodies from immunized (■), tolerant (▲) and control (●) mice were assayed by ELISA. (C–F) Serum levels of anti-ova IgG1, IgE, IgM and IgA were assayed after booster immunization (day 21). Control mice received tap water and were sham immunized with saline. Data shown are means of five mice/group. (B) Statistical differences between tolerant and immunized mice by Student t test after first immunization and after booster. ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. (C–F) Different letters represent statistical differences measured by ANOVA with Tukey post-test ($P < 0.05$).

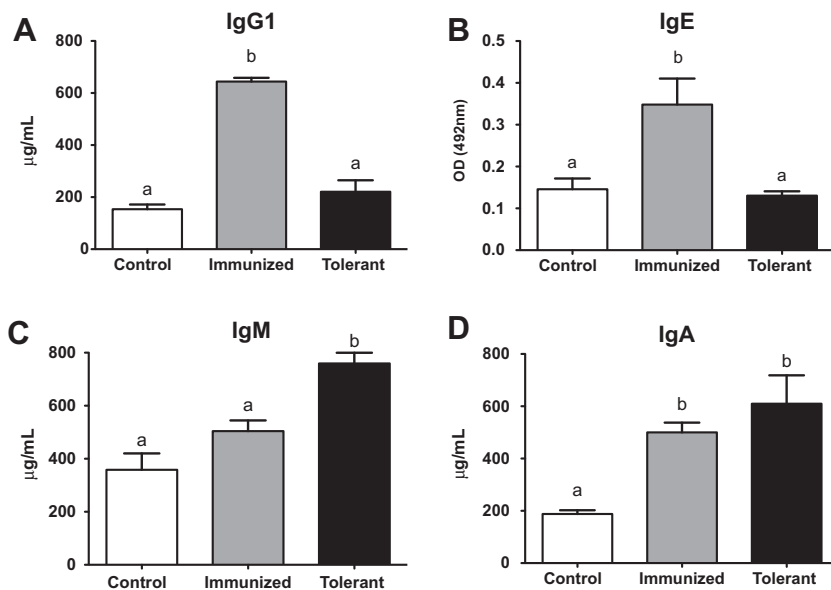


Fig. 2. Tolerant mice showed high levels of total serum IgM and IgA. Serum levels of total IgG1 (A), IgE (B), IgM (C) and IgA (D) were assayed by Elisa 7 days after booster immunization as described in Fig. 1A. Data shown are means of five mice/group. Results are expressed as mean \pm SEM. Different letters represent statistical differences ($P < 0.01$) measured by ANOVA with Tukey post-test.

3.4. Activated and regulatory T cells emerged with different kinetics in the spleen of orally tolerant mice

As we failed to distinguish tolerant from immunized mice in their percentage of Treg or activated lymphocyte in spleen 14 days after booster immunization (Fig. 3), we analyzed the kinetics of

appearance of these cells in tolerant and immunized mice after priming immunization, with OVA in Al(OH)₃. This immunization is known to participate in the induction of oral tolerance and has an ideal time point following oral antigen, after which it is not possible to cause a tolerant state. In this kinetics we included a time point (time 0 in graphs – Fig. 7) concerning the tolerant mice with-

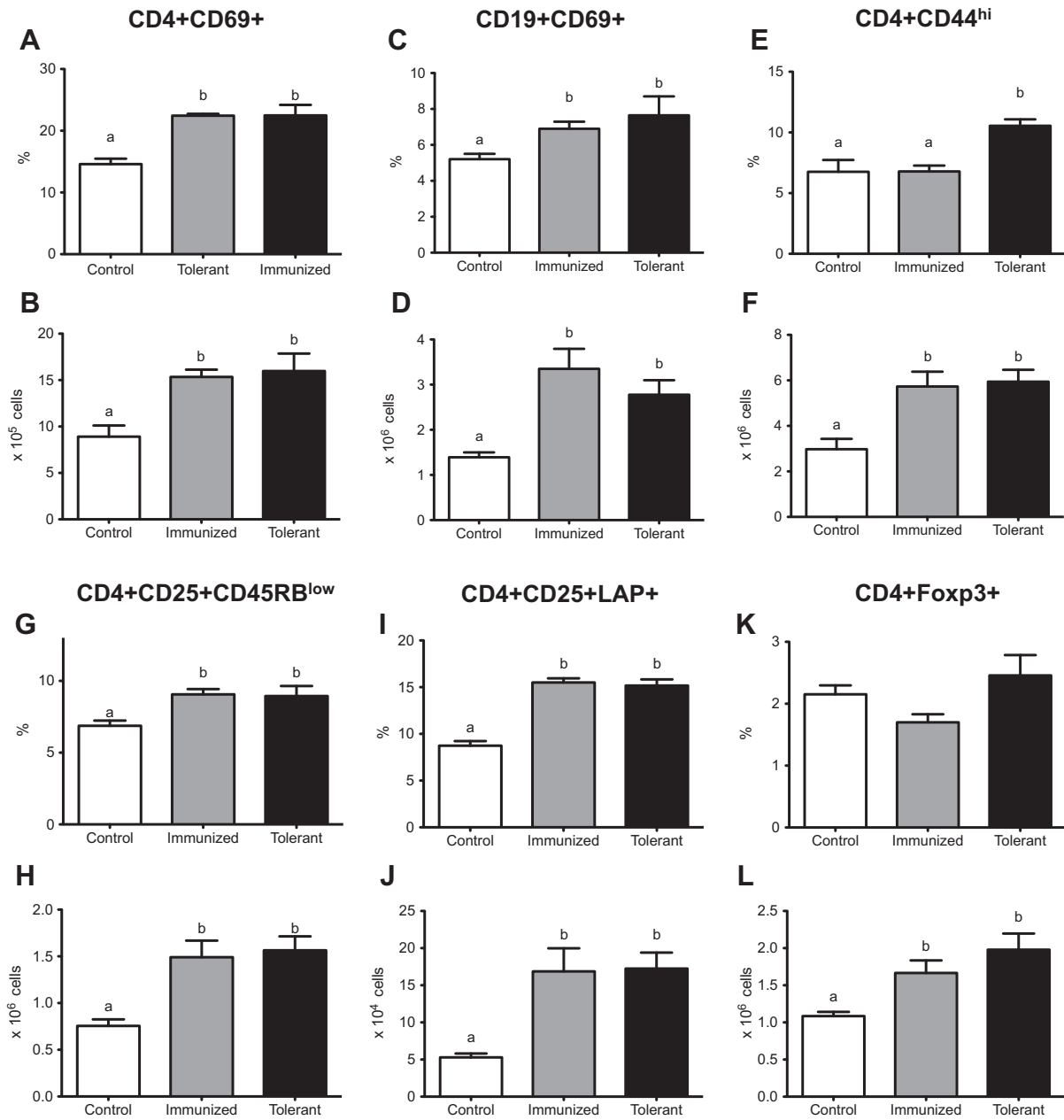


Fig. 3. Similar lymphocyte activation and Treg generation in tolerant and immunized mice after booster immunization. Tolerant and Immunized mice present similar patterns of lymphocyte activation after booster immunization. Mice received either OVA (tolerant) or tap water (immunized and control) seven days before priming immunization. Fourteen days after mice received a booster immunization. Seven days after booster immunization mice were killed and their spleen were collected for phenotypical analysis of lymphocytes by flow cytometry. Control mice were sham immunized with saline. Percentage and absolute cell number of CD4+CD69+T cells (A and B); CD19+CD69+B cells (C and D); CD4+CD44^{hi} T cells (E and F); CD4+CD25+CD45RB^{low} Treg cells (G, H); CD4+CD25+LAP+Treg cells (I and J) and CD4+Foxp3+Treg cells (K and L). For gating strategies and representatives dot plots see [Supplementary Figs. 1 and 2](#). Different letters indicate statistical differences as measured by ANOVA with Tukey post test ($P < 0.05$).

out parenteral immunization, 7 days after feeding. This would denote the effect of antigen feeding alone in lymphocyte populations in spleen and guide us to better description of what happens to lymphocytes after immunization. The others kinetic time points were at days 1, 2, 4 and 7 after immunization.

Interestingly, orally tolerant mice already have higher frequency (Fig. 6A) and absolute number (Fig. 6B) of CD4+CD69+T cells in spleen compared to control, not manipulated mice, 7 days after antigen feeding. Additionally, CD4+CD25+LAP+Treg cell number (but not frequency) were elevated in tolerant mice after feeding, even before immunization (Fig. 6H). One day after immunization these cells remained higher in tolerant mice.

CD4+Foxp3+Treg cells appeared earlier in tolerant mice, at day 2 (Fig. 6I and J). Interestingly, we observed an increase in both regulatory cell types frequencies (CD4+Foxp3+and CD4+CD25+LAP+) in immunized mice at day 4 (Fig. 6G and I). While LAP+Treg cells increased similarly in tolerant and immunized mice regarding cell frequencies (Fig. 6G), the absolute number of these cells remained higher in tolerant mice (Fig. 6H). On the contrary, the frequencies and cell number of CD4+Foxp3+Treg cells were higher in immunized mice at the end of the kinetics (Fig. 6I and J).

The kinetics of recently activated B cells (CD19+CD69+) number did not show differences between tolerant and immunized mice. But the frequencies of these cells augmented just after immuniza-

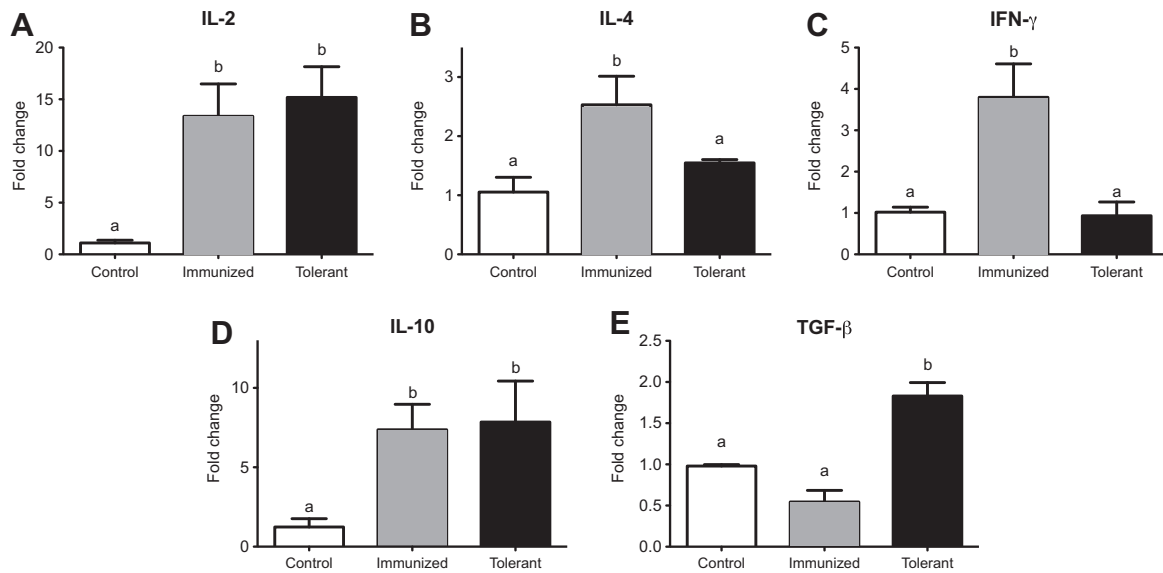


Fig. 4. Cytokines profile of tolerant and immunized mice after booster immunization. Tolerant mice received oral OVA by continuous feeding for three days and immunized mice received tap water. Seven days after both mice were i.p. immunized with 10 μ g of OVA in 1 mg of Al(OH)₃ and boosted 14 days thereafter with 10 μ g of OVA in PBS. Control mice received tap water and were sham immunized with saline. Spleen cells were cultured and stimulated with 0.1 μ g/ml of anti-CD3 for 24–48 h. Total mRNA was extracted from cell culture and submitted to qPCR to determine expression of IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10 and TGF- β (see Section 2). Results are expressed as fold changes of mRNA expression normalized by samples from control animals. Different letters indicate statistical differences as measured by ANOVA with Tukey post test ($P < 0.05$).

tion in both mice compared to control (Fig. 6C). CD4⁺CD44^{hi} T cells of tolerant mice have increased in both frequency and number just after immunization, remaining higher than that of immunized mice until the fourth day (Fig. 6E and F).

3.5. Orally tolerant mice presented earlier production of regulatory cytokines and transient production of effector cytokines after priming

During the kinetics we also analyzed cytokine production through their mRNA expression level assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) (Fig. 7). The major differences occurred at the end of the kinetics, when immunized animals showed higher levels of IL-2, IL-4, IFN- γ than tolerant mice (Fig. 7A–C). Immunized and tolerant mice had similar levels of IFN- γ at day 7 (Fig. 7C). Interestingly, immunized mice also presented higher levels of IL-10 and TGF- β than tolerant mice at day 7 (Fig. 7D and E). Nonetheless, some important differences were found in the early kinetics, between day 0 and 2, and we show these data on separate graphs (Fig. 7F–J). Tolerant mice presented higher levels of IL-2, IL-10 and TGF- β even before immunization, 7 days after antigen feeding (Fig. 7F–J). After immunization there was a transient production of IFN- γ in tolerant mice on the first day (Fig. 7H) and another peak of IL-2 production at day 2 (Fig. 7F). IL-10 levels remained high in tolerant animals until second day after immunization (Fig. 7I). At this time, the first 2 days of kinetics, immunized mice did not show any increase in cytokine expression, indicating the protracted activation of their immune system compared to tolerant mice.

4. Discussion

The vast majority of contacts of the organism with potentially immunogenic proteins occurs in the gut with food and microbiota antigens. Parenteral exposures to immunogens generally trigger an increase in specific antibody production and the development of immunological memory. These are considered to be basic elements of anti-infectious immunity. On the other hand, the consequences of oral exposures to immunogens are frequently described as

inhibitory of further specific responsiveness. This has been repeatedly described as necessary to ensure unresponsiveness to harmless antigens from the diet and the gut microbiota [25].

The specific suppression characteristic of “oral tolerance” has been described in cellular and molecular detail, but little is known about the global activities of the immune system underlying the physiological, daily contact with dietary antigens. Herein, we show that in spite of a reduction in specific antibody formation, tolerant mice have high frequencies of ISC in the spleen and the bone marrow. Secondly, in the spleen and bone marrow of tolerant mice T cells bearing both activated/memory and regulatory phenotypes emerge with a kinetics different from that of non-tolerant mice. Thus, the question we try to answer here is: how to conciliate this increased global activity with the inhibition of specific immune reactivity.

In tolerant mice, splenic ISC cells expressed mainly IgA and IgM isotypes. In the bone marrow, both tolerant and immunized mice presented IgG- and IgM-secreting ISC, but these cells were more frequent in tolerant mice. Thus, although the number of activated B cells is similar in tolerant and immunized mice, they differ in the expression of Ig isotypes and the frequency of activated lymphocytes in systemic compartments. This phenomenon was not registered before.

IgA is a predominant isotype at mucosal sites, and an association between oral tolerance and increased specific SIgA production was previously suggested, implying that systemic tolerance occurs alongside with local immunization [26]. However, this is not an universal finding and secretory IgA antibodies responses have also been reported to be both normal or suppressed in tolerant mice [27–30]. In previous experiments from our laboratory, tolerant mice showed suppression of specific SIgA [29]. In the experiments reported here, we found no anti-ova SIgA after parenteral challenge either in tolerant or immunized mice. However, tolerant mice had lower specific serum IgA, as seen in others isotypes (Fig. 1F), but higher total serum IgA (Fig. 2D) consistently with a higher number of IgA-secreting cells in spleen (Fig. 5A). Production of non-specific serum IgA in tolerant mice is compatible with the overall effects of oral tolerance. IgA has no inflammatory activity; it cannot fix complement, nor mediate the production of inflammatory cytokines

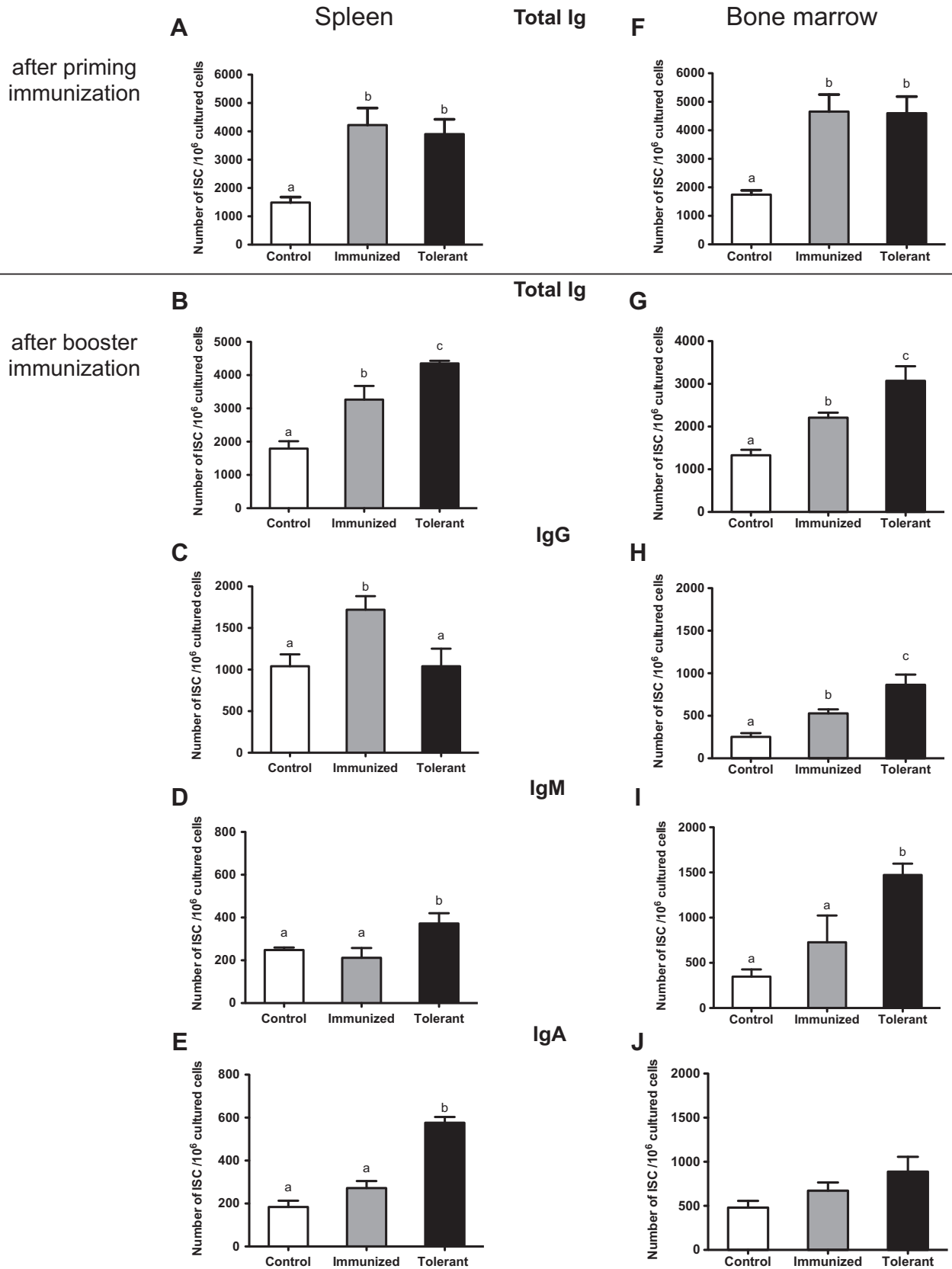


Fig. 5. Tolerant mice displayed higher number of immunoglobulin secreting cells (ISC) in the spleen and the bone marrow as compared to immunized mice. Tolerant mice received oral OVA by continuous feeding for three days and immune mice received tap water. Seven days after both mice were i.p. immunized with 10 µg of OVA in 1 mg of Al(OH)₃ and boosted 14 days thereafter with 10 µg of OVA in PBS. Control mice received tap water and were sham immunized with saline. Mice were killed after priming immunization or after booster immunization when spleen and bone marrow cells were cultured and total Ig-, IgM-, IgG- and IgA-secreting cells (ISC) were measured by ELISPOT. ISC assayed after priming immunization (A and F) and after booster immunization (B–E – spleen, G–J – bone marrow). Bars represent values (mean ± SEM) of each group. Different letters indicate statistical differences as measured by ANOVA with Tukey post test (*P* < 0.05).

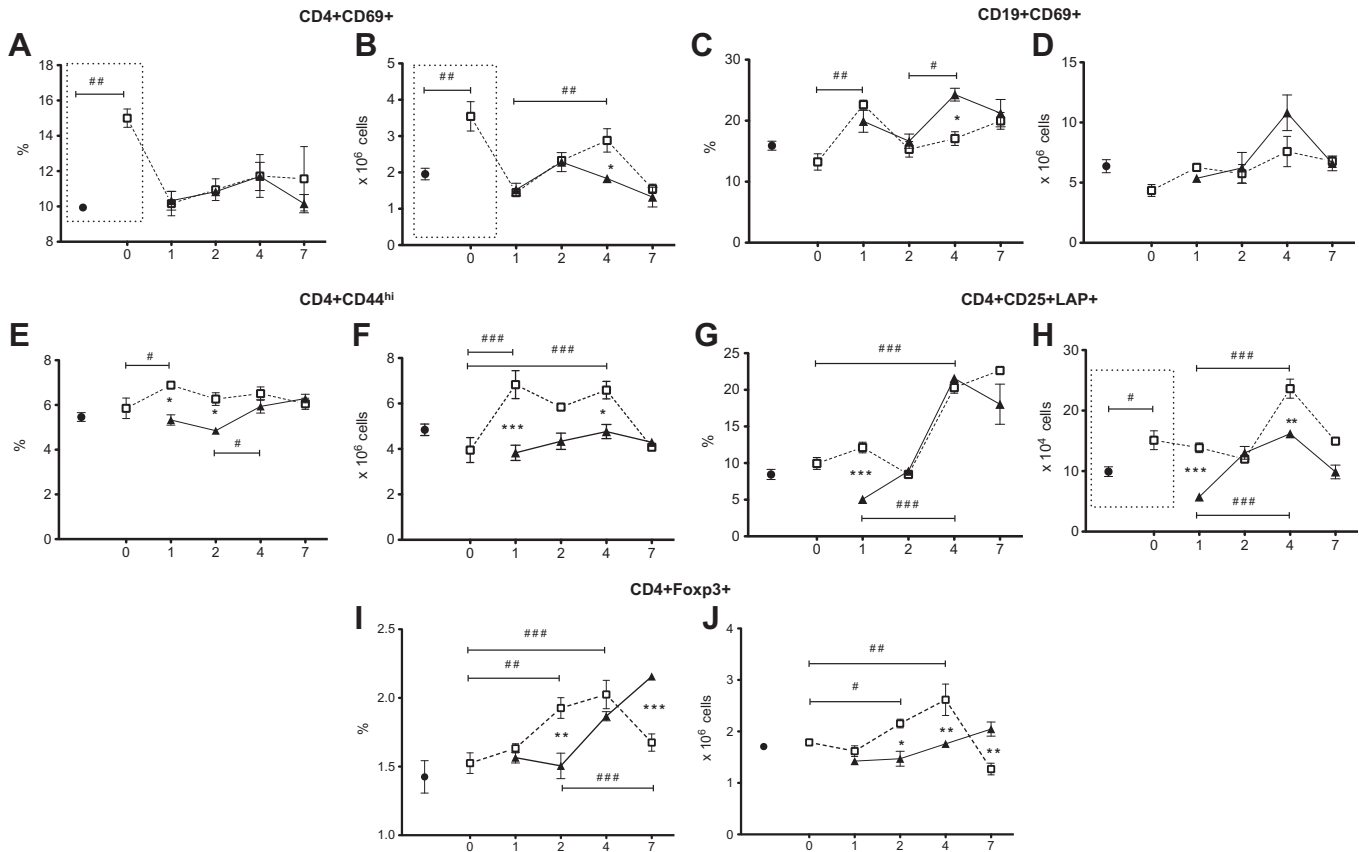


Fig. 6. Tolerant mice showed earlier appearance of activated and regulatory T cells after priming immunization with OVA. Mice received oral OVA (Tolerant-dashed lines) or tap water (Immunized – solid lines) prior to immunization with OVA in Al(OH)₃, after which animals were killed at several intervals (1, 2, 4 and 7 days) – one group of tolerant animals were killed before immunization (Pre-0) – and spleen cells were harvested for flow cytometry analysis. We analyzed the kinetics of appearance (percentage and cell number) of early activated T (CD4+CD69+) and B (CD19+CD69+) cells; effector/memory CD4+CD44^{hi} and CD4+CD25+LAP+ and CD4+Foxp3+regulatory T cells. Asterisks represent statistical differences (ANOVA) between tolerant and immunized mice at each time point * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. Statistical differences between distinct time points of the same treatment (tolerant or immunized) are indicated by # (# = $P < 0.05$; ## = $P < 0.01$; ### = $P < 0.001$). Pre-immunization expansions are highlighted by dotted line rectangles.

[31]. This would assure the assimilation of the antigen, rather than triggering the inflammatory events which occur in immunization.

Similarly, in tolerant mice specific IgM response was lower, but total IgM levels in serum were higher. Also after booster immunization tolerant mice had higher numbers of IgM-secreting cells both in spleen and bone marrow. IgM has been implicated in many physiological activities such as: clearance of apoptotic, tumor or senescent cells; cytokine actions; inflammation and in the regulation of B and T cells [32]; also, natural IgM antibodies modulate B and T cell activation [33]. Therefore, the increased production of IgM in spleen and bone marrow in tolerant mice may reflect changes in the physiologic activity of cells able to buffer inflammatory reactions triggered by parenteral immunization.

Our results reinforce those of Bandeira et al. (1989) on transplantation allo-tolerance. In those experiments, mice were neonatally injected with allogeneic cells and received a skin allograft as adults; some accepted and some rejected the allograft; higher number of activated B and T cells were found in animals that accepted donor skin allograft [21]. These authors claimed that tolerance is an active phenomena and correlates with high levels of lymphocyte activation, rather than their inhibition.

Many authors described systemic effects of oral tolerance that go beyond the limits of gut associated lymphoid tissue. For example, attempts to immunize tolerant animals with the tolerated antigen has profound inhibitory effects on immune responsiveness [34,35]. Carvalho and collaborators have shown that the injection of tolerated antigens may block a variety of immune phenomena

such as: antibody responses [36] and DTH responses [37] to unrelated antigens; granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs trapped in the lungs [38]; lethal GvH reactions [39]; the differentiation of eosinophils in the bone marrow [40] and inflammatory reactions triggered by injection of caraggenan [41]. These facts suggest that lymphocytes with regulatory properties, which are activated in mucosa, permeate the body and mediate anti-inflammatory influences when exposed to the specific antigen.

Many subsets of regulatory T cells have been involved in oral tolerance: IL-10-producing Tr1 cells, TGF- β producing CD4+CD25+LAP+T cell and naturally arising Treg CD4+CD25+Foxp3+[42]. In the present work, tolerant mice showed higher expression of TGF- β but equal expression of IL-10, as compared to immunized mice. Interestingly, tolerant mice showed a high expression of IL-2 indicating a significant lymphocyte activation rates after booster immunization. This activation was qualitatively different from that of immunized mice, as tolerant animals did not express IL-4 and IFN- γ at this time.

Antigen specific Tregs cells are observed in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes of the gut 48 h after oral administration of antigen [43]. Additionally, antigen presenting cells (APC) that trigger this tolerogenic response exist constitutively in the GALT and can migrate to mesenteric lymph nodes in a CCR7-dependent manner and distal lymph nodes, such as inguinal lymph nodes, are isolated from this tolerogenic process [20]. The systemic effects of oral tolerance seems to depend on the mobility of antigen specific T cells that circulate the body after being activated in GALT by die-

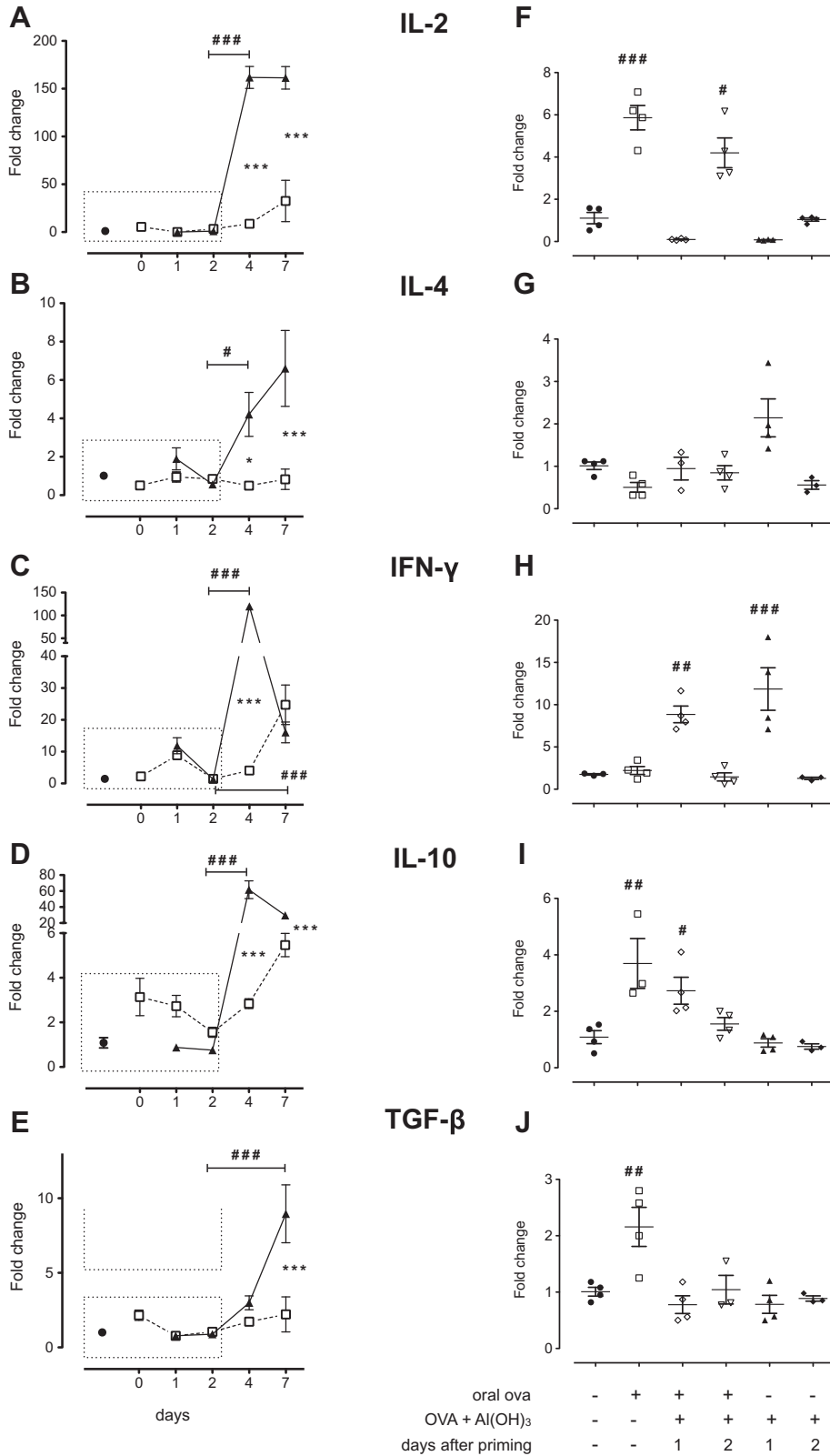


Fig. 7. Cytokines kinetics of tolerant and immunized mice. Mice received oral OVA (Tolerant-dashed lines) or tap water (Immunized – solid lines) prior to immunization with OVA in Al(OH)₃, after which animals were killed at several intervals (1, 2, 4 and 7 days) (left panels). Spleen cells were cultured and stimulated with 0.1 g/ml of anti-CD3 for 48 h. Total mRNA was extracted from cell culture and submitted to qPCR to determine expression of IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10 and TGF- β (see Section 2). Data highlighted by dotted rectangle are showed in separated graphs (right panels) in order to visualize the differences in the kinetics (Tolerant-open symbols – \square ∇ \diamond ; Immunized – closed symbols \blacklozenge). Results are expressed as fold changes of mRNA expression normalized by samples from control animals. For left panels, asterisks represent statistical differences (ANOVA) between tolerant and immunized mice at each time point (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$). Statistical differences between distinct time points of the same treatment (tolerant or immunized) are indicated by # (# = $P < 0.05$; ## = $P < 0.01$; ### = $P < 0.001$). For right panels # symbols indicate statistical differences between all groups as measured by ANOVA with Tukey post-test (# = $P < 0.05$; ## = $P < 0.01$; ### = $P < 0.001$).

tary antigens [44]. Nevertheless, priming with the antigen in adjuvant reinforces maintenance of oral tolerance [45,29].

To examine systemic influences during oral tolerance induction we analyzed the kinetics of appearance of activated and regulatory lymphocytes in the spleen just after priming immunization and compared with the activated and regulatory profile in mice 7 days after antigen feeding. Surprisingly, tolerant mice showed augmented number and frequencies of CD4+CD69+T cells after feeding (Fig. 6A and B) but after immunization the kinetic of these cells was similar in tolerant and immunized mice. This indicates that antigen feeding by itself, triggered their activation. However, primary immunization could not change the kinetics of CD4+CD69+lymphocyte frequency in tolerant and immunized mice. The immunization also induced similar degrees of expansion of CD19+CD69+ activated B cells frequencies in tolerant and immunized mice one day after immunization (Fig. 6C). However, no differences were seen in cell number kinetics (Fig. 6D).

Two additional differences in the kinetics of tolerant and immunized mice were noted. The first is the rapid appearance of activated/memory CD4+CD44^{hi} T cells of tolerant mice that remained elevated until day 4 after immunization (Fig. 7E and F). The second was the prompt expansion of regulatory T cells in tolerant mice soon after priming immunization. Importantly, regulatory CD4+T cells expressing LAP had already elevated numbers one week after feeding, remaining higher one day after immunization. CD4+Foxp3+Treg cells expanded after the second day in tolerant mice (Fig 7G–J). Additionally, immunized mice presented a delayed expansion of CD4+Foxp3+Treg cells, reaching a higher frequency and cell number at day 7. The LAP+ cells population also expanded in immunized mice but never exceeded that from tolerant animals (Fig. 7G and H).

The rapid development of regulatory T cells in tolerant mice might be related to their preceding activation by the previous oral exposure to the antigen. This exposure activates gut lymphocytes, which then migrate systemically, altering further interactions with the antigen. In a mouse model of asthma using a transgenic mouse containing only one clone of CD4 T cells and one clone of B cells in a RAG^{-/-} background, Mucida and coworkers also described an early expansion of Treg (CD4+CD25+CD45RBlow) in mesenteric lymph nodes of tolerant mice 4 days after parenteral immunization [45]. In our study, we observed an expansion of CD4+CD25+Foxp3+T cells in the spleen of tolerant C57BL/6 mice two days after parenteral immunization. We also observed augmented Treg levels in immunized mice, but this occurred later. Tolerant mice presented increased levels of IL-2, IL-10 and TGF- β even before priming immunization (Fig. 7F–J) and another peak of IL-2 production two days after immunization. This might be related to the rapid induction of regulatory T cells in these animals. Additionally, tolerant mice showed a transient production of IFN- γ soon after priming but its expression is downregulated after booster immunization.

In summary, a reduction in specific reactivity is the hallmark of tolerance, but few studies were concerned with what happens concomitantly with the non-specific “global” activity during tolerance induction. Herein, we show that tolerant mice have heightened lymphocyte activity, quantitatively similar to immunized mice, concomitantly with specific lymphocyte inhibition, and that there were also qualitative and temporal differences. Qualitatively, tolerant mice displayed widespread activation of B lymphocytes in systemic compartments, with more IgM and IgA-secreting cells in spleen and IgM and IgG-secreting cells in bone marrow, while IgG was more frequent in immunized mice. Temporally, tolerant mice showed an earlier expansion of regulatory T cells and a rapid reactivation of lymphocytes, as indicated by higher number of T cells with activated/memory phenotype, reaffirmed by the earlier and transient production of regulatory (IL-10, TGF- β) and effector

(IL-2, IFN- γ) cytokines. Nonetheless, immunized animals also presented regulatory T cells (CD4+Foxp3+and CD4+LAP+) and regulatory cytokines (TGF- β and IL-10), but their protracted development might explain their inability to prevent the inflammatory outcome.

The true nature and function of regulatory T cells is still open to discussion, and few studies have considered the role they could play in global immunological activity. Regulatory T cells might promote a more distributed lymphocyte activation in parallel with its known suppressive action on specific immunity. In support to this assumption, Winstead and colleagues recently demonstrated the role of regulatory T cells in driving clonal diversity of T cells during reconstitution from lymphopenia [46]. In this sense, oral tolerance (and other forms of tolerance) may be seen as a physiological non-inflammatory activity that induces specific unresponsiveness by privileging systemic activation of lymphocytes.

Acknowledgments

We thank Ms. Ilda Marçal for her excellent technical assistance and Juliana Pfisterer for helping in qPCR experiments. This work was supported by research grants from FAPEMIG and CNPq (Brazil). Some of the authors are recipients of scholarships from CAPES (A.B.C.J.) and CNPq (A.C.G.S., B.C.H.) and fellowships from CNPq, Brazil (A.M.C.F.).

Appendix A. Supplementary data

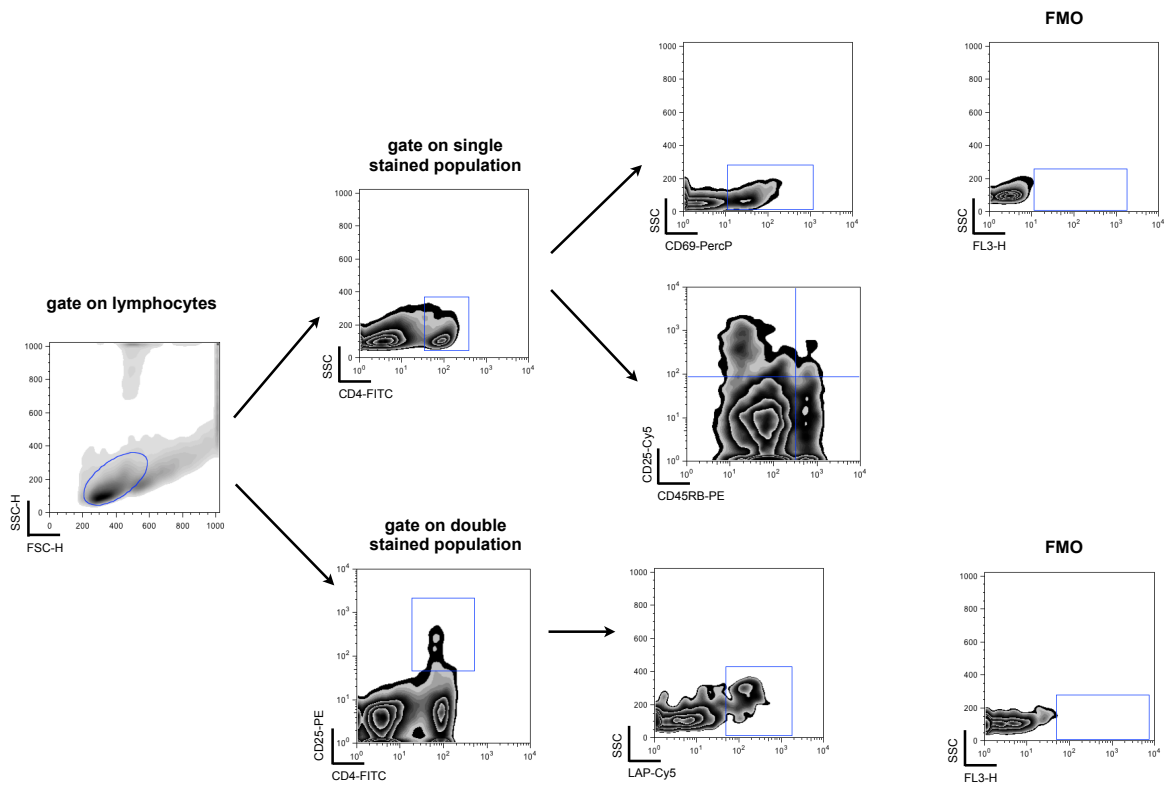
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.004>.

References

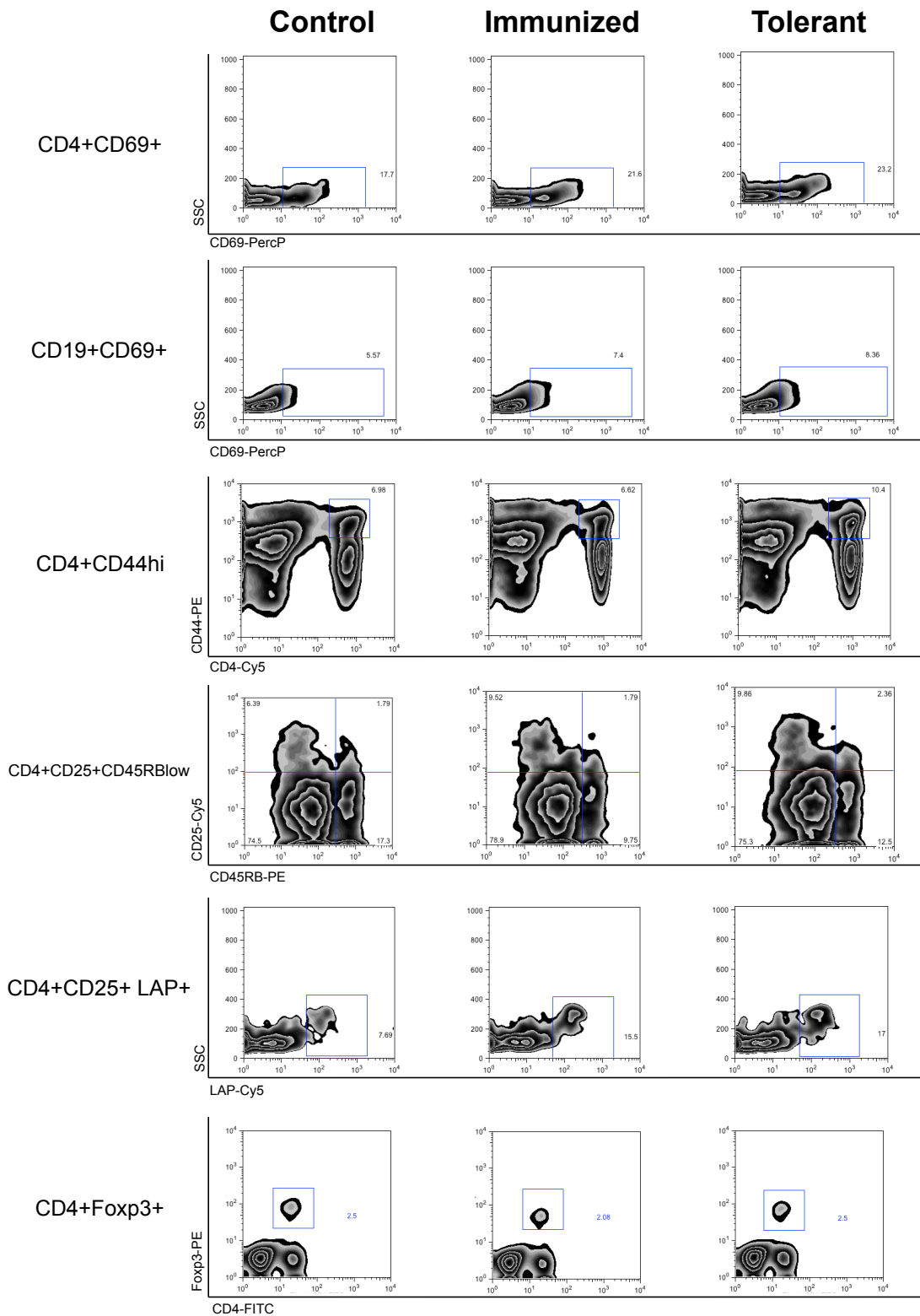
- [1] A. Besredka, De. Sixième memoire de l'anaphylaxie latique, Ann. Inst. Pasteur Lille 23 (1909) 166.
- [2] H.G. Wells, Studies on the chemistry of anaphylaxis III. Experiments with isolated proteins, especially those of the hen's egg, J. Infect. Dis. 9 (1911) 147–171.
- [3] H.G. Wells, T.B. Osborne, The biological reactions of the vegetable proteins I anaphylaxis, J. Infect. Dis. 6 (1911) 66–124.
- [4] A. Besredka, P.P.E. Roux, S.R. Gloyne, Anaphylaxis and Anti-anaphylaxis and their Experimental Foundations, Mosby, 1919.
- [5] M. Chase, Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agents, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 61 (1946) 257–262.
- [6] H.C. Thomas, M.V. Parrott, The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration, Immunology 27 (1974) 631–639.
- [7] H. Bazin, B. Plateau, Oral feeding can make rats tolerant to intraperitoneal injections of DNP-ovalbumin and *B. pertussis* vaccine, Biochem. Soc. Trans. 5 (1977) 1571–1573.
- [8] D.G. Hanson, N.M. Vaz, L.C. Maia, M.M. Hornbrook, J.M. Lynch, C.A. Roy, Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 55 (1977) 526–532.
- [9] R. Duchmann, I. Kaiser, E. Hermann, W. Mayet, K. Ewe, K.H. Meyer zum Buschenfelde, Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD), Clin. Exp. Immunol. 102 (1995) 448–455.
- [10] F.M. Burnet, F. Fenner, The Production of Antibodies, second ed., Macmillan, Melbourne, 1949.
- [11] F.M. Burnet, The Clonal Selection Theory of Antibody Formation, Cambridge University Press, Cambridge, 1959.
- [12] R.E. Billingham, L. Brent, P.B. Medawar, “Actively acquired tolerance” of foreign cells, Nature 172 (1953) 603–606.
- [13] T.T. Macdonald, G. Monteleone, Immunity, inflammation, and allergy in the gut, Science 307 (2005) 1920–1925.
- [14] L.K. Richman, J.M. Chiller, W.R. Brown, D.G. Hanson, N.M. Vaz, Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins, J. Immunol. 121 (1978) 2429–2434.
- [15] A. Izcue, J.L. Coombes, F. Powrie, Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation, Annu. Rev. Immunol. 27 (2009) 313–338.
- [16] A. Miller, O. Lider, A.B. Roberts, M.B. Sporn, H.L. Weiner, 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. USA 89 (1992) 421–425.

- [17] Y. Chen, V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, H.L. Weiner, Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis, *Science* 265 (1994) 1237–1240.
- [18] R. Gandhi, M.F. Farez, Y. Wang, D. Kozoriz, F.J. Quintana, H.L. Weiner, Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset, *J. Immunol.* 184 (2010) 4620–4624.
- [19] J. Bilsborough, T.C. George, A. Norment, J.L. Viney, Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties, *Immunology* 108 (2003) 481–492.
- [20] T. Worbs, U. Bode, S. Yan, M.W. Hoffmann, G. Hintzen, G. Bernhardt, R. Forster, O. Pabst, Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 519–527.
- [21] A. Bandeira, A. Coutinho, C. Carnaud, F. Jacquemart, L. Forni, Transplantation tolerance correlates with high levels of T- and B-lymphocyte activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 272–276.
- [22] Y. Modigliani, V. Thomas-Vaslin, A. Bandeira, M. Coltey, N.M. Le Douarin, A. Coutinho, J. Salaun, Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7555–7559.
- [23] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [24] C.C. Czerkinsky, L.A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, A. Tarkowski, A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 109–121.
- [25] R. Duchmann, I. Kaiser, E. Hermann, W. Mayet, K. Ewe, K.H. Meyer zum Buschenfelde, Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD), *Clin. Exp. Immunol.* 102 (1995) 448–455.
- [26] S.J. Challacombe, T.B. Tomasi, Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization, *J. Exp. Med.* 152 (1980) 1459–1465.
- [27] C.O. Elson, K.W. Beagley, A.T. Sharmanov, K. Fujihashi, H. Kiyono, G.S. Tennyson, Y. Cong, C.A. Black, B.W. Ridwan, J.R. McGhee, Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance, *J. Immunol.* 157 (1996) 2174–2185.
- [28] K.A. Kelly, C.C. Whitacre, Oral tolerance in EAE: reversal of tolerance by T helper cell cytokines, *J. Neuroimmunol.* 66 (1996) 77–84.
- [29] A.M. Faria, S.M. Ficker, E. Speziali, J.S. Menezes, B. Stransky, V. Silva Rodrigues, N.M. Vaz, Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice, *Mech. Ageing Dev.* 102 (1998) 67–80.
- [30] H.R. Christensen, T.M. Kjaer, H. Frokiaer, Low-dose oral tolerance due to antigen in the diet suppresses differentially the cholera toxin-adjuvanted IgE, IgA and IgG response, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132 (2003) 248–257.
- [31] D.B. Sutherland, S. Fagarasan, IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut, *Curr. Opin. Immunol.* 24 (2012) 261–268.
- [32] H.U. Lutz, C.J. Binder, S. Kaveri, Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease, *Trends Immunol.* 30 (2009) 43–51.
- [33] M.K. Adelman, S.F. Schluter, I.F. Robey, J.J. Marchalonis, Natural and autoantibodies to human T-cell receptor Vbeta segments: potential roles in immunomodulation, *Crit. Rev. Immunol.* 27 (2007) 221–232.
- [34] N.M. Vaz, L.C. Maia, D.G. Hanson, J.M. Lynch, Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76 (1981) 83–91.
- [35] A. Miller, O. Lider, H.L. Weiner, Antigen driven bystander suppression after oral administration of antigen, *J. Exp. Med.* 174 (1991) 791–798.
- [36] C.R. Carvalho, B.A. Verdolin, A.V. de Souza, N.M. Vaz, Indirect effects of oral tolerance in mice, *Scand. J. Immunol.* 39 (1994) 533–538.
- [37] S.D. Miller, D.G. Hanson, Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin, *J. Immunol.* 123 (1979) 2344–2350.
- [38] C.R. Carvalho, H.L. Lenzi, R. Correa-Oliveira, N.M. Vaz, Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs, *Br. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 1195–1199.
- [39] N. Vaz, C.R. Carvalho, Assimilation, tolerance and the end of innocence, *Ciencia e Cultura* 46 (1994) 351–357.
- [40] C.M. Rodrigues, O.A. Martins-Filho, N.M. Vaz, C.R. Carvalho, Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis, *Immunology* 117 (2006) 517–525.
- [41] G.C. Ramos, C.M. Rodrigues, G.M. Azevedo Jr., V. Pinho, C.R. Carvalho, N.M. Vaz, Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins, *Immunology* 126 (2009) 354–362.
- [42] A.M. Faria, H.L. Weiner, Oral tolerance, *Immunol. Rev.* 206 (2005) 232–259.
- [43] F. Hauet-Broere, W.W. Unger, J. Garssen, M.A. Hoiyer, G. Kraal, J.N. Samsom, 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 (2003) 2801–2810.
- [44] N.M. Tsuji, A. Kosaka, Oral tolerance. intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells, *Trends Immunol.* 29 (2008) 532–540.
- [45] D. Melamed, A. Friedman, Modification of the immune response by oral tolerance. antigen requirements and interaction with immunogenic stimuli, *Cell. Immunol.* 146 (1993) 412–420.
- [46] C.J. Winstead, C.S. Reilly, J.J. Moon, M.K. Jenkins, S.E. Hamilton, S.C. Jameson, S.S. Way, A. Khoruts, CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia, *J. Immunol.* 184 (2010) 4749–4760.
- [47] L.A. Herzenberg, J. Tung, W.A. Moore, D.R. Parks, Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed, *Nat. Immunol.* 7 (2006) 681–685.

SUPPLEMENTARY DATA
(Castro-Junior 2012, Cell. Immunol. 280(2):171-181)

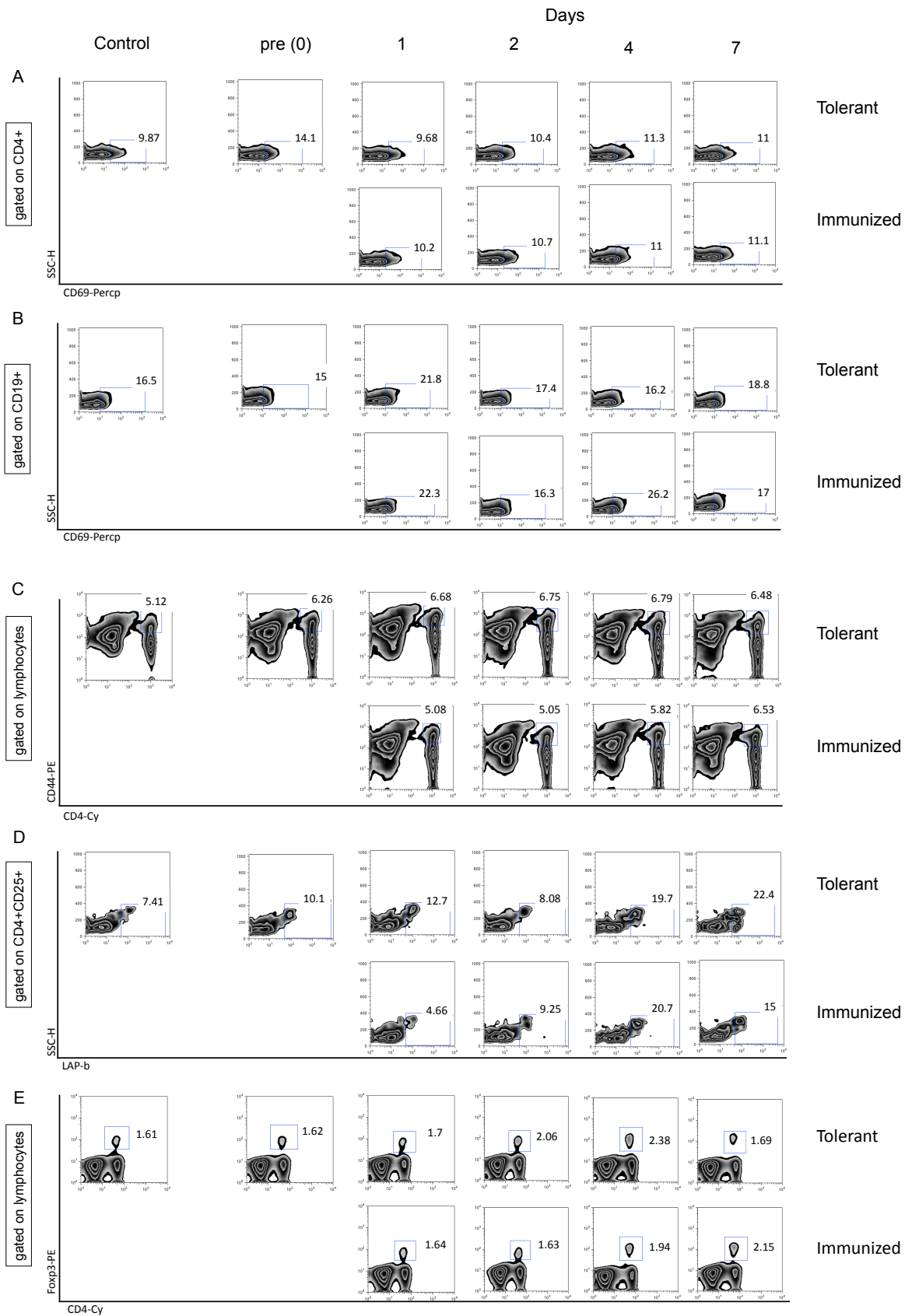


Supplementary data 1. Gating strategy for cytometry experiments. Spleen cells were harvested and submitted to flow cytometry analysis. The lymphocytes population was gated on the basis of relative size (forward light scatter) and granularity (side angle scatter). Depending on the antibodies pool cells were sequentially gated by individual staining (eg. CD4+ and CD69+) or by double staining (eg. CD4+CD25+) followed by single staining (eg. LAP+). The gating definition was based on fluorescence minus one (FMO) controls where cells are stained with all antibodies excluding the one of the interest for gating [47].



1

Supplementary data 2. Dot plots from results of Fig. 3. Mice received either OVA (tolerant) or tap water (immunized and control) seven days before priming immunization. Mice received a booster immunization 14 days after. Seven days after booster immunization mice were killed and their spleen were collected for phenotypical analysis of lymphocytes by flow cytometry. Control mice were sham immunized with saline. Cells were stained for CD4+CD69+ T cells; CD19+CD69+ B cells; CD4+CD44^{hi} T cells; CD4+CD25+CD45R^{blow} Treg cells; CD4+CD25+LAP+ Treg cells; CD4+Foxp3+ Treg



Supplementary data 3. Dot plots from results of [Fig. 7](#). Mice received oral OVA (Tolerant) or tap water (Immunized) prior to immunization with OVA in Al(OH)₃, after which animals were killed at several intervals (1, 2, 4 and 7 days) – one group of tolerant animals were killed before immunization (Pre-0) – and spleen cells were harvested for flow cytometry analysis. The lymphocytes population was gated on the basis of relative size (forward light scatter) and granularity (side angle scatter). (A) CD4+CD69+ gated on CD4+ lymphocytes; (B) CD19+CD69+ gated on CD19+ lymphocytes; (C) CD4+CD44^{hi} gated on lymphocytes; (D) CD4+CD25+LAP+ gated on CD4+CD25+ lymphocytes; (E) CD4+ Foxp3+ gated on lymphocytes.