

**Josiely de Paula Silva**



**Efeito de uma dieta livre de proteínas no  
desenvolvimento de alergia alimentar e  
tolerância oral em camundongos BALB/c.**

**Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2010**

**Josiely de Paula Silva**

**Efeito de uma dieta livre de proteínas no desenvolvimento de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos BALB/c.**

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

**Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria**

**Co-Orientadora: Joana Ferreira do Amaral**

**Colaboradora: Cláudia Rocha Carvalho**

**Belo Horizonte  
2010**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia (LIB) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com o apoio financeiro do CNPq, da FAPEMIG e da CAPES.

## *Dedicatória*

---

Aos meus pais, Ely Miranda Silva e José Marcos da Silva, por tudo que fizeram por mim, pelo amor incondicional, pelos esforços sem medida e por me ensinarem que tudo na vida é uma questão de vontade, trabalho e determinação.

Ao meu irmão, Bruno Miranda Silva, pela amizade, por todo aprendizado e crescimento.

Ao meu marido, Glauco Gomes, que com muito carinho, paciência e amor me ajudou a conquistar mais esta vitória. Agradeço por todas as vezes que me ajudou a solucionar os meus problemas de uma maneira mais simples, por todas as palavras de motivação, pelo companheirismo, cuidado, amizade e por ser o meu alicerce.

## *Agradecimentos*

---

A Deus pelo seu cuidado especial em todas as etapas de minha vida.

À minha orientadora, Ana Maria Caetano de Faria, por ter acreditado em mim e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Joana Ferreira do Amaral pela co-orientação.

À Cláudia Rocha Carvalho, pelo privilégio de poder compartilhar sua sabedoria, tão importante para o delineamento e execução deste trabalho.

Ao laboratório do Dr. Dairton Miranda, pela confecção das lâminas histológicas.

À Professora Denise Carmona Cara por ter disponibilizado, sem ressalvas, o seu laboratório, contribuindo para a realização deste trabalho.

Aos colegas do LIB, em especial Andrezza, Magda, Rafael, Frank e Raphaela, pelos ensinamentos, por toda contribuição durante os experimentos e em especial pela amizade e estímulos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e crescimento pessoal.

Aos amigos da PUC-Minas, em especial Alessandra, Flávia de Faria, Flávia Viana e Marcela, pela amizade e apoio sempre.

Aos amigos de base, por toda assistência indispensável durante todo o curso.

E a todos que contribuíram de alguma maneira, para a realização deste trabalho.

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	9
<b>Lista de Figuras</b> .....	10
<b>Lista de Tabelas</b> .....	11
<b>1 Resumo e Abstract</b> .....	12
<b>2 Introdução</b> .....	15
2.1 O sistema imune associado à mucosa intestinal.....	16
2.1.1 Atividades imunológicas induzidas na mucosa intestinal.....	21
2.2 Antígenos naturais: microbiota e antígenos da dieta.....	23
2.3 Tolerância oral.....	25
2.4 Alergia alimentar.....	31
<b>3 Objetivos</b> .....	35
3-1 Objetivo geral.....	36
3-2 Objetivos Específicos.....	36
<b>4 Material e Métodos</b> .....	38
4-1 Animais.....	39
4-2 Dieta.....	39
4-3 Hemograma.....	40
4-4 Avaliação nutricional dos animais.....	40
4-4-1 Albumina.....	40
4-4-2 Proteínas séricas.....	41
4-5 Bromatologia das fezes.....	42
4-6 Obtenção dos soros.....	42
4-7 Coleta do conteúdo fecal.....	42
4-8 Dosagem de imunoglobulinas séricas e IgA secretória.....	42

4-9 Histologia do intestino delgado.....	43
4-10 Morfometria dos vilos intestinais.....	44
4-11 Contagem de linfócitos intraepiteliais.....	45
4-12 Avaliação do número de eosinófilos.....	45
4-13 Avaliação da produção de muco intestinal.....	45
4-14 Linfócitos da lâmina própria.....	46
4-15 Determinação de Ig total e IgG1 séricas e IgA secretória anti-OVA.....	47
4-16 Determinação de IgE anti-OVA.....	48
4-17 Análise fenotípica de células através de citometria de fluxo.....	48
4-18 Tolerância oral, imunização parenteral e indução de alergia alimentar.....	50
4-18-1 Gavagem.....	50
4-18-2 Ingestão voluntária.....	50
4-18-3 Imunizações parenterais.....	50
4-18-4 Indução de alergia alimentar.....	50
4-19 Eosinófilos da medula óssea.....	51
4-20 Preparação de suspensão de células de LnM.....	52
4-21 Determinação de citocinas .....	52
4-22 Cálculos estatísticos.....	53
4-23 Soluções utilizadas.....	53
<b>5 Resultados.....</b>	<b>56</b>
5-1 A estimulação pelas proteínas da dieta desempenha um papel essencial na maturação do sistema imune.....	57
5-2 As proteínas da dieta interferem no desenvolvimento de respostas imunológicas associadas à alergia.....	60
5-3 A ausência de proteínas na dieta não interfere na produção de eosinófilos da medula óssea.....	63
5-4 As proteínas da dieta desempenham um papel importante na indução de tolerância oral.....	65
5-5 A ausência das proteínas na dieta interfere na ativação de células T reguladoras.....	73

5-6 O processo de indução de tolerância oral desencadeia a maturação do sistema imune.....	75
5-7 O estado nutricional dos camundongos não é afetado pela falta das proteínas da dieta.....	77
<b>6 Discussão.....</b>	<b>79</b>
<b>7 Conclusão.....</b>	<b>90</b>
<b>8 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>92</b>



## *Lista de Abreviaturas*

---

Aa - Aminoácido

APC - Células Apresentadoras de Antígenos Profissionais

Cas - Caseína

CTLA-4 - Antígeno-4 do Linfócito T Citotóxico

DC - Células Dendríticas

ELISA - Ensaio Imunoenzimático Indireto

EPO - Peroxidase de Eosinófilos

FAE - Epitélio Associado ao Folículo

Foxp-3 - Fator de Transcrição *forkhead box p3*

GALT - Tecido Linfóide Associado ao Intestino

HE - Hematoxilina e Eosina

IEL - Linfócito Intraepitelial

IFN - Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

LnM - Linfonodo Mesentérico

OVA - Ovalbumina

PAS - Ácido Periódico de *Schiff*

TCR - Receptor de Célula T

Tc - Linfócito T Citotóxico

TGF - Fator de Crescimento Transformante

Th - Linfócito T *Helper*

TNF - Fator de Necrose Tumoral

Treg - Linfócito T Regulador

TRL-4 - Receptor do tipo *Toll 4*

## *Lista de Figuras*

---

<b>Figura 1:</b> Representação dos elementos formadores do GALT.....	16
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da estrutura geral do linfonodo.....	21
<b>Figura 3:</b> Classificação de linfócitos T <i>helper</i> ativados.....	22
<b>Figura 4:</b> Morfometria dos vilos intestinais.....	45
<b>Figura 5:</b> Determinação quantitativa das células caliciformes.....	46
<b>Figura 6:</b> Análise de linfócitos da lâmina própria por citometria de fluxo.....	49
<b>Figura 7:</b> Análise da maturação do sistema imune de camundongos BALB/c alimentados com as dietas de Cas e Aa.....	59
<b>Figura 8:</b> Fatores relacionados à indução de alergia alimentar em camundongos BALB/c alimentados com a dieta de Cas e Aa.....	62
<b>Figura 9:</b> Eosinófilos da medula óssea.....	64
<b>Figura 10:</b> Quantificação de imunoglobulinas totais séricas anti-OVA de camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral.....	67
<b>Figura 11:</b> Quantificação de <u>IgG1 anti-OVA</u> em camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar.....	69
<b>Figura 12:</b> Quantificação de <u>IgE anti-OVA</u> em camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar.....	71
<b>Figura 13:</b> Quantificação de <u>IgAS anti-OVA</u> em camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar.....	72
<b>Figura 14:</b> Porcentagem e número absoluto de células CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD45RB na lâmina própria do intestino delgado de animais alimentados com as dietas de Cas e Aa.....	74
<b>Figura 15:</b> Dosagem de imunoglobulinas séricas IgG e IgA e IgA secretória em camundongos submetidos à dieta de Aa após o processo de indução de tolerância oral.....	76
<b>Figura 16:</b> Avaliação nutricional de camundongos BALB/c alimentados com dietas de Cas ou Aa.....	78

## *Lista de Tabelas*

---

<b>Tabela 1:</b> Dieta formulada para o crescimento e manutenção de roedores.....	39
<b>Tabela 2:</b> Teste para dosagem de albumina no soro.....	41
<b>Tabela 3:</b> Teste para dosagem de proteínas séricas totais.....	41

## *1-Resumo e Abstract*

---

## Resumo

Neste trabalho, estudamos a influência da administração de uma dieta livre de proteínas na indução de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos BALB/c. O modelo utilizado foi o de camundongos mantidos, desde o desmame até a vida adulta, em uma dieta balanceada (dieta Aa) que contém aminoácidos em substituição a proteínas inteiras. Como já havia sido descrito anteriormente em nosso laboratório para camundongos C57BL/6, camundongos BALB/c mantidos nessa dieta Aa apresentaram um sistema imune imaturo, semelhante ao encontrado em animais neonatos ou isentos de germe (*germ-free*). A ausência das proteínas na dieta não impediu o desenvolvimento de alergia alimentar a ovalbumina (OVA) nesses animais. No entanto, os camundongos do grupo Aa produziram níveis mais baixos de IgE e IgA secretória anti-OVA, de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ ), maior consumo de ração e de solução contendo OVA durante os dias de indução de alergia. Além disto, quando comparados com os animais do grupo controle, os camundongos do grupo Aa apresentaram uma menor perda de peso relacionada ao fenômeno de aversão ao alérgeno OVA durante a indução de alergia alimentar. Os animais imaturos que não ingeriram proteínas foram capazes de desenvolver tolerância, mas a eficiência dessa indução foi reduzida. Um dia de gavagem não foi suficiente para diminuir os títulos de Ig total e IgG1 no grupo Aa quando comparados ao seu grupo imune. Esses resultados indicam que a ausência de proteínas íntegras da dieta influencia tanto na atividade inflamatória quanto na atividade imunorreguladora provavelmente devido ao estado de imaturidade que ela provoca nos animais.

## **Abstract**

In this study, we investigated the role of administrating a protein-free diet in the induction of food allergy and oral tolerance in BALB/c mice. The experimental model used was mice fed, since weaning up to adulthood, a balanced diet in which all proteins were replaced by amino acids (Aa diet). As previously described by our group in C57BL/6 mice, BALB/c mice fed Aa diet had an immature immune system that was similar to the one found in neonates and germ-free mice. Protein absence in the diet did not prevent the development of food allergy to ovalbumin (OVA) in these animals. However, Aa-fed mice produced lower levels of IgE, secretory IgA, cytokines (IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ ), higher consumption of OVA-containing during the period of food allergy induction. In addition, when compared to mice from control group, Aa-fed mice had lower weight loss related to the aversion phenomenon during food allergy. Immature mice that did not have protein in their diets could be rendered tolerant but they were less susceptible to oral tolerance induction. One single gavage was not enough to suppress specific Ig and IgG1 in the Aa-fed group although it was efficient to induce suppression for the control group of mice. Our results indicate that the absence of protein in the diet alters both inflammatory and regulatory immune reactivity in mice probably due to the immature status that they induce.

## *2-Introdução*

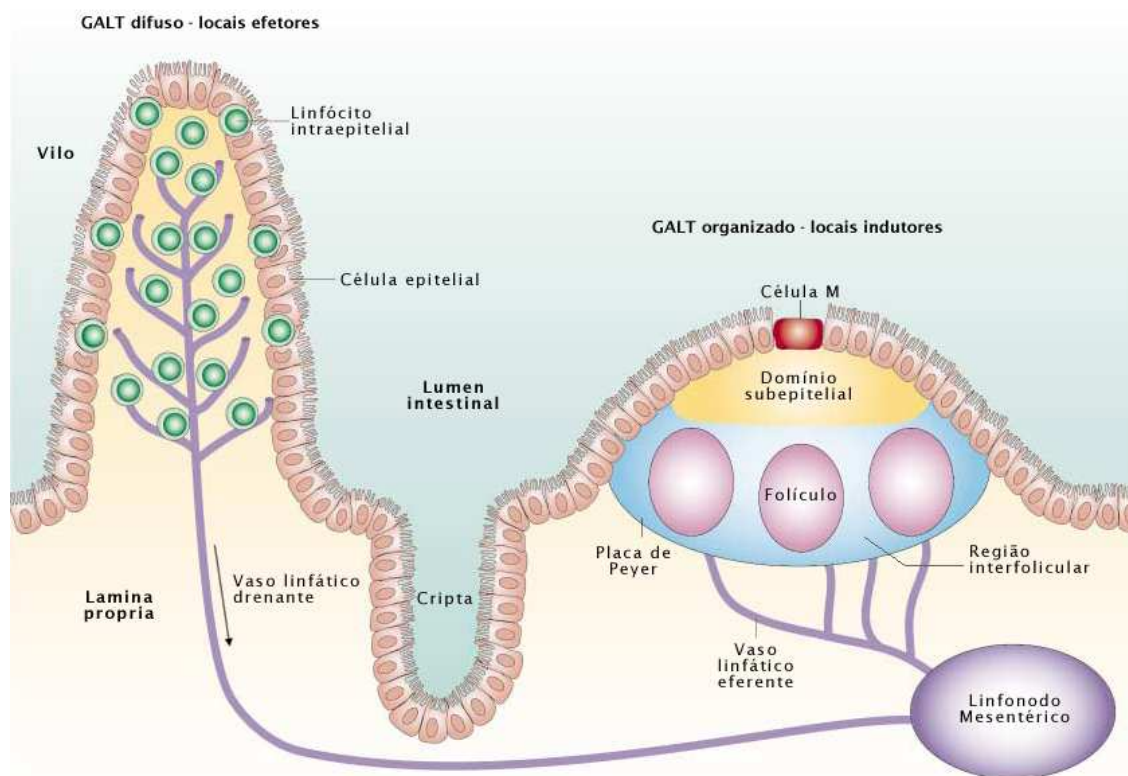
---

## 2.1 O sistema imune associado à mucosa intestinal

As mucosas representam a maior via natural de interseção do organismo com o meio ambiente. Essa imensa superfície é banhada cotidianamente por um grande aporte de antígenos da microbiota e da dieta. (Brandtzaeg, 1998). Em condições fisiológicas, a maioria dos antígenos exógenos tem acesso ao organismo através dessas superfícies. Somente a mucosa intestinal apresenta uma área 100 vezes maior que a área da pele (Moog, 1981). Calcula-se que um ser humano adulto entre em contato com aproximadamente 30 kg de proteínas por ano pela via do trato gastrointestinal (Mestecky, 1987) e abriga uma extraordinária densidade de  $10^{14}$  microorganismos, com aproximadamente 500 a 1000 espécies (Sonnenburg, Angenent, et al, 2004). Esse grande aporte antigênico resulta em uma distribuição estratégica de células envolvidas na captura, processamento e apresentação de antígenos, produção de anticorpos e secreção de citocinas (Novak, Haberstock, et al, 2008).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) pode ser dividido em dois compartimentos funcionais: GALT organizado ou locais indutores e GALT difuso ou locais efetores (Mowat, 2003). Nos locais indutores, ocorrem à captura do antígeno diretamente do lúmen intestinal, o processamento, a apresentação e conseqüentemente a ativação de células T e B *naïve*. No tecido linfóide organizado encontram-se as placas de *Peyer*, os folículos linfóides isolados bem como linfonodos locais drenantes. Já os locais efetores são representados pelas populações linfóides entre as células epiteliais – linfócitos intraepiteliais (IEL) e células da lâmina própria intestinal, onde células efetoras como as células T contribuem para a diferenciação de células B IgA+ em plasmócitos secretores de imunoglobulina A (IgA) (Figura 1) (Brandtzaeg e Pabst, 2004).





**Figura 1: Representação dos elementos formadores do GALT.**

GALT organizado, indução da resposta imune (placas de Peyer, linfonodos mesentéricos), e GALT difuso, local efetor (linfócitos intraepiteliais e células da lâmina própria). Tanto as placas de Peyer quanto os vilos da lâmina própria são drenados por vasos linfáticos que chegam ao linfonodo mesentérico. GALT-tecido linfóide associado ao intestino. Adaptada de (Mowat, 2003).

Em geral, os vilos intestinais são especializados na digestão e absorção dos nutrientes, são formados por enterócitos absorptivos, células secretoras de muco (células caliciformes) e células enteroendócrinas. Em contraste, o epitélio associado ao folículo (FAE) que recobre as placas de Peyer e os folículos linfóides isolados é totalmente diferenciado e apresenta células especializadas que transportam sem processar os antígenos capturados no lúmen diretamente para células localizadas nos tecidos organizados como as placas de Peyer (Neutra, Mantis, et al, 2001). As placas de Peyer são encontradas na submucosa ao longo de todo o intestino delgado. Elas são formadas por agregados linfóides e são separadas do lúmen intestinal pelo FAE. O FAE abrange células epiteliais colunares, células membranosas ou células M, IELs e pouca ou nenhuma célula secretora de muco ou célula caliciforme (Newberry e Lorenz, 2005 / Kraehenbuhl e Neutra, 2000).

As células epiteliais colunares do FAE apresentam uma fina camada de glicocálice e expressão reduzida de hidrolases envolvidas no processo de digestão. A produção de muco, defensinas e lisozimas também são reduzidas nesse epitélio. As células do FAE não apresentam receptores poliméricos de Ig sendo, portanto, incapazes de transportar IgA para o lúmen intestinal (Owen, 1999). Todas essas características tendem a facilitar o contato de antígenos intactos e microorganismos com a superfície do FAE. A característica mais marcante do FAE é a presença das células M, que são células epiteliais especiais, apresentando microvilosidades pouco desenvolvidas, reduzida capacidade enzimática e uma fina camada de glicocálice. Essas particularidades, combinadas com um citoesqueleto único e uma pronunciada capacidade de formar vesículas endocíticas, facilitam o transporte de microorganismos inteiros e antígenos solúveis do lúmen para o interior da placa de Peyer. (Corr, Gahan, et al, 2008). Abaixo do FAE, existe uma região difusa chamada de domínio subepitelial e formada principalmente por células dendríticas (DCs), que podem capturar antígenos do lúmen através de extensões da membrana entre as células epiteliais (Burks, Laubach, et al, 2008 / Rescigno, Urbano, et al, 2001). Os próprios enterócitos são capazes de capturar antígenos solúveis, processá-los e apresentá-los às células T (Kunisawa e Kiyono, 2005). As placas de Peyer apresentam numerosos folículos compostos de linfócitos B IgM<sup>+</sup> que são precursores de plasmócitos secretores, principalmente de IgA. Linfócitos T, especialmente T *helper* (Th), DCs e macrófagos estão presentes nas regiões interfoliculares (Figura 1). Diferentemente de outros órgãos linfóides, as placas de Peyer apresentam somente vasos linfáticos eferentes e recebem antígenos através do epitélio e não pela circulação sistêmica (Mowat, 2003).

Como o próprio nome indica, os IELs residem entre a superfície basolateral das células epiteliais intestinais (IEC). Considerando a imensa superfície da mucosa intestinal humana (~400m<sup>2</sup>) e a proporção de IEL (1 a cada 4-9 células epiteliais), os IELs representam uma população de células imune abundante e constituem uma das principais populações de células T do intestino delgado (Kunisawa e Kiyono, 2005). Os IELs diferem em seu fenótipo e funções de outras células T do sistema imune e podem ser subdivididos

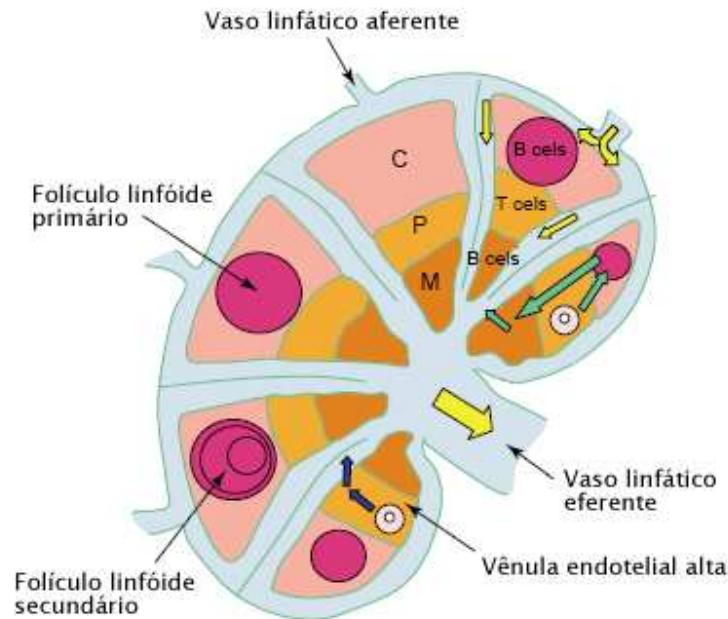
em duas populações principais baseadas no receptor de células T (TCR) e o tipo de co-receptor que eles expressam (Hayday, Theodoridis, et al, 2001). IELs podem expressar TCR $\alpha\beta$  com a molécula CD4 ou CD8 $\alpha\beta$  como co-receptores ou apresentarem TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  com co-receptores não convencionais. Enquanto a maioria das células T CD8 circulantes e presentes em outros órgãos linfóides expressam a molécula CD8 composta do heterodímero  $\alpha\beta$ , as populações de IEL são mais complexas. Em camundongos, cerca de 50% dos IELs com TCR $\alpha\beta$  expressam a molécula CD8 como homodímero  $\alpha\alpha$  (Shires, Theodoridis, et al, 2001). Linfócitos T com TCR  $\gamma\delta$  também representam uma fração substancial dos linfócitos T não convencionais presentes no epitélio intestinal (Saurer e Mueller, 2009). TCR $\gamma\delta$  de camundongos infectados e não infectados parecem estar continuamente ativados; eles expressam altos níveis de genes envolvidos em funções citotóxicas, incluindo granzima A e B e Fas ligante (Faher, Konigshofer, et al, 2001). A população de IEL pode participar de respostas imunes inflamatórias e também no processo de indução de tolerância oral. Através de estímulos, os IELs podem sintetizar citocinas como interleucinas (IL) IL-2, IL-13, IL-6, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas como as linfotaxinas e também fator de crescimento para queratinócitos, importante para a renovação epitelial e reparo a danos teciduais (Kunisawa, Takahashi, et al, 2007 / Cheroutre, 2004). Os IELs também liberam citocinas anti-inflamatórias e reguladoras como o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e IL-10, tendo um papel chave na manutenção da homeostase intestinal (Saurer, Seibold, et al, 2004). Muitas moléculas de interação, tais como  $\alpha E$  integrina e E-caderina, são expressas entre IELs e IECs respectivamente. Essas interações cumprem um papel importante na retenção de IELs no epitélio intestinal e na manutenção da integridade da camada epitelial (Cepek, Shaw, et al, 1994).

A lâmina própria é o local entre o epitélio e a camada muscular da mucosa, contém plasmócitos secretores, linfócitos T ativos além de outros tipos celulares como macrófagos e DCs (Lefrançois e Puddington, 2006). A principal característica que diferencia os linfócitos da lâmina própria daqueles encontrados nos outros órgãos é a presença marcante de um

fenótipo de ativação. Esse local apresenta uma alta frequência de células expressando o receptor de IL-2 e alta produção de citocinas (Uhlir e Powrie, 2005).

As duas populações efectoras da mucosa, IELs e linfócitos da lâmina própria estão sobre forte influência das proteínas da dieta e da microbiota (Smith e Nagler-Anderson, 2005). Assim, compartimentos especializados parecem facilitar o contato do sistema imune com esses antígenos exógenos e fornece um meio favorável para a sinalização e a indução de diferentes mecanismos imunes.

O linfonodo mesentérico (LnM) faz parte do GALT organizado e está localizado no mesentérico intestinal. O LnM é dividido em três regiões com diferentes composições celulares: córtex, paracórtex e medula. O córtex apresenta folículos ricos em linfócitos T e DCs. O paracórtex é caracterizado por altas proporções de células T e DCs. Já a medula, a região mais profunda do linfonodo, é composta de linfócitos T e B e de linfócitos secretores (Figura 2) (Crivelalto, Vacca, et al, 2004). Células T *naïve* circulantes, por exemplo, chegam ao linfonodo através de vênulas pós-capilares chamadas de vênulas endoteliais altas, e a entrada desses linfócitos T para a região paracortical é guiada por quimiocinas produzidas por células epiteliais, estromais e DCs. No córtex, as DCs residentes capturam e processam os antígenos que chegam ao linfonodo. DCs maduras também migram para o paracórtex e apresentam os antígenos a células Th *naïve* ou células T citotóxicas (Tc). Células T efectoras são geradas e a resposta imune adaptativa se inicia. Enquanto os linfócitos efetores ou reguladores deixam o linfonodo e migram para outros tecidos, algumas células Th permanecem como células de memória ou movem-se para os centros germinativos para promover a diferenciação final de linfócitos B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas (Crivelalto, Vacca, et al, 2004).



**Figura 2: Representação esquemática da estrutura geral do linfonodo.**

C: córtex; P: paracórtex; M: medula. A linfa entra no linfonodo por múltiplos vasos aferentes e sai por um único vaso eferente. O córtex é em grande parte ocupado por folículos linfóides primários ou secundários ricos em células B. A região interposta paracortical representa uma área rica em células T. As setas amarelas indicam a direção do fluxo linfático e as setas verdes e azuis indicam a migração de células B e T para compartimentos específicos. Adaptada de (Crivellato, Vacca, et al, 2004).

### 2.1.1 Atividades imunológicas induzidas na mucosa intestinal

Antígenos provenientes das células M são capturados por células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) adjacentes, localizadas dentro do domínio das placas de Peyer. APCs ativadas podem interagir com os linfócitos T interfoliculares ou migrar para o LnM via vasos linfáticos. Linfócitos T ativados podem se diferenciar em subpopulações distintas de acordo com o perfil de citocinas secretadas (Figura 3) (Ramiro-Puig, Perez-Cano, et al, 2008).

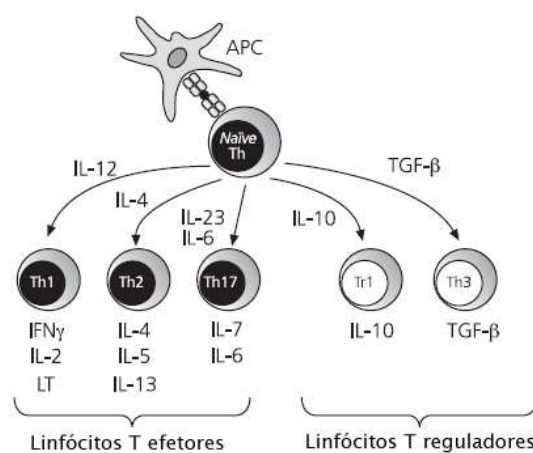
Estudos recentes têm também demonstrado uma reciprocidade entre o desenvolvimento de células T reguladoras (Tregs) e células T efetoras. Células T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em Tregs na presença de TGF- $\beta$  e ácido retinóico ou em células Th17 na presença de TGF- $\beta$  e IL-6. Assim, TGF- $\beta$  tem um efeito paradoxal na mucosa sendo capaz

de induzir distintas sub-populações de células T com atividades imunológicas opostas (Zhou, Chong, et al, 2009 / Veldhoen e Stockinger, 2006).

Algumas citocinas como IL-4, IL-5 e TGF- $\beta$  induzem a síntese de IgA pelos linfócitos B das placas de Peyer. Esses linfócitos B, precursores de plasmócitos, migram para o LnM onde ocorrem a maturação e a expansão clonal, chegam à circulação sanguínea pelo ducto torácico e finalmente migram para os tecidos efetores como a lâmina própria intestinal, onde exercerão suas funções (Mowat, 2003).

Há alguns anos demonstrou-se que linfócitos B podem ser ativados e induzidos a trocar de isotipos para IgA tanto nas placas de Peyer quanto na lâmina própria do intestino. Aparentemente esses linfócitos B pertencem à população de células B1 e são capazes de iniciar a troca de isotipos e a diferenciação em plasmócitos produtores de IgA sem o auxílio de linfócitos T. Aproximadamente 50% da IgA secretória encontrada no muco intestinal são produzidas por esses linfócitos B (Fagarasan, Kinoshita, et al. 2001).

Os linfócitos B que foram ativados nas placas de Peyer e LnM chegam à lâmina própria intestinal e finalizam sua maturação até plasmócitos secretores principalmente de IgA. A IgA secretória (IgAS), além de ser resistente a proteólise, não desencadeia respostas imunes inflamatórias, sendo considerada um elemento ideal de proteção da mucosa intestinal (Woof e Mestecky, 2005). No lúmen intestinal, a IgAS pode neutralizar patógenos e também toxinas (Macpherson, McCoy, et al, 2008).



**Figura 3: Classificação de linfócitos T helper ativados.**

O reconhecimento do antígeno e citocinas específicas determinam a diferenciação dos linfócitos T em subpopulações efetoras e reguladoras. Adaptada de (Ramiro-Puig, Perez-Cano, et al, 2008).

## 2-2 Antígenos naturais: microbiota e antígenos da dieta

O desenvolvimento e a maturação do sistema imune são diretamente influenciados pela dieta e pela colonização bacteriana. Além de facilitar a digestão de alguns alimentos e proteger a mucosa intestinal contra microorganismos patogênicos (Guarner e Malagelada, 2003 / Hooper e Gordon, 2001 / Turnbaugh, Ley, et al, 2007), a microbiota também auxilia no desenvolvimento de estruturas do GALT. As placas de Peyer desenvolvem-se durante a embriogênese, enquanto outros tecidos linfóides como os folículos linfóides isolados presentes nas regiões distais do intestino delgado, onde a microbiota é mais proeminente, são dependentes da colonização bacteriana após o nascimento para se desenvolverem (Suzuki e Fagarasan, 2008). Uma das atividades importantes imune locais que também acompanha a colonização bacteriana é a produção de IgA (Macpherson, McCoy, et al, 2008). Camundongos incapazes de realizar hipermutação somática e conseqüente troca de isotipo, são incapazes de produzir IgA (Fagarasan, Muramatsu, et al, 2002). Como conseqüência, esses camundongos apresentam 100 vezes mais bactérias e um aumento exacerbado do número de folículos linfóides isolados. Animais isentos de germes (*germ-free*) apresentam folículos linfóides isolados imaturos (Hamada, Hiroi, et al, 2002), placas de Peyer em menor tamanho e sem centros germinativos. A lâmina própria desses animais apresenta frequência reduzida de plasmócitos secretores de IgA e de células T CD4 e o número de IELs também estão diminuídos. A reconstituição da microbiota desses animais é suficiente para restaurar o tecido linfóide associado à mucosa (Macpherson e Harris, 2004). Nesses animais isentos de germes, a susceptibilidade à tolerância oral (que será discutida em seguida) também é reduzida (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996).

Outra fonte importante de estimulação antigênica da mucosa intestinal são as proteínas da dieta. Já foi relatado que a maioria dos antígenos que entra em forma de alimentos é absorvida no intestino delgado. Quando um antígeno protéico é ingerido, o

mesmo é clivado por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado. Alguns antígenos, no entanto, escapam dessa digestão ou são parcialmente degradados e podem ser absorvidos intactos (Wakabayashi, Kumagai, et al, 2006). Eles chegam às placas de Peyer via células M, sendo capturados, processados e apresentados a linfócitos T por APCs presentes nesses aglomerados linfóides. Uma parte pode ainda aparecer na forma intacta horas mais tarde na circulação (Neutra, Frey, et al, 1996).

Assim, embora o papel estimulador da microbiota no tecido linfóide da mucosa intestinal já tenha sido mais explorado, nosso grupo demonstrou há alguns anos que a influência das interações com a dieta seja de igual importância na formação do GALT e na maturação do sistema imune. Para abordar essa questão, foi desenvolvido em nosso laboratório um modelo de camundongos C57BL/6 convencionais (com microbiota normal) alimentados exclusivamente com uma dieta experimental balanceada, mas livre de proteínas, na tentativa de diminuir ao máximo o contato antigênico via dieta (Menezes, Mucida, et al, 2003). Nesse estudo, a caseína foi utilizada como única fonte de proteína na dieta controle (dieta Cas), e seus aminoácidos como fonte de nitrogênio na dieta experimental balanceada (dieta Aa). Foram estudados os efeitos dessa dieta experimental na atividade imunológica sistêmica assim como na formação do GALT. Outros estudos anteriores já abordaram os efeitos imunobiológicos das proteínas da dieta (Satter, Sakai, et al, 2002). Entretanto, como os animais eram submetidos a dietas com baixas quantidades de proteínas, eles apresentavam um estado de subnutrição protéica. Nesse caso, os efeitos da diminuição das interações com as proteínas poderiam estar mascarados pela subnutrição ou desnutrição. Em nosso modelo, os animais alimentados com dieta teste Aa (dieta padrão sem proteínas, com 15% de aminoácidos) não sofreram perdas no que diz respeito ao estado nutricional em relação aos animais alimentados com a dieta controle (Cas) ou com a ração comercial, em vários parâmetros analisados: peso, higidez, contagem de hemácias e dosagem de albumina e proteínas totais séricas (Menezes, Mucida, et al, 2003). No entanto, alterações importantes tanto locais como sistêmicas foram identificadas. Foi observada uma redução nos níveis de IgAS presente no muco intestinal e nos níveis séricos de IgG e IgA,



sugerindo um efeito direto dos antígenos da dieta no desenvolvimento do sistema imune, como o descrito em relação aos antígenos da microbiota. Além disso, foi observada, nos animais mantidos na dieta isenta de proteínas (Aa), uma diminuição na frequência de linfócitos T e B em vários sítios linfóides e um padrão de citocinas típico de neonatos (produção de altos níveis de IL-4, IL-10 e baixos níveis de IFN- $\gamma$  frente à estimulação com o mitógeno concanavalina A) (Menezes, Mucida, et al, 2003). É importante ressaltar que, em um trabalho posterior, foi também demonstrado que essa deficiência imune não era irreversível e a introdução de uma dieta contendo 10% de proteínas por três dias restaurava a produção de imunoglobulinas desses animais alimentados com a dieta de Aa (Amaral, Foschetti, et al, 2006).

Esses estudos indicam que as interações entre GALT e a microbiota e as proteínas da dieta são relevantes para a maturação do sistema imune. Na ausência dessas interações, o sistema imune dos animais apresenta semelhanças com animais neonatos. O GALT, por ser constantemente exposto a uma grande variedade de antígenos e apresentar em estado permanente de ativação, apresenta uma estrutura única que permite desenvolver atividades imunes apropriadas, sejam elas inflamatórias ou reguladoras.

## **2.3 Tolerância oral**

Embora exposta a essa ampla variedade antigênica representada pelas proteínas da dieta e pela microbiota, a mucosa intestinal apresenta um ambiente naturalmente anti-inflamatório. Assim, o resultado mais comum do contato do tecido linfóide associado à mucosa intestinal com os antígenos que entram pela via oral é a supressão da reatividade imunológica inflamatória a esses antígenos. Esse fenômeno, descrito pela primeira vez no início do século XX, foi chamado de tolerância oral em analogia à tolerância natural que o organismo desenvolve aos autocomponentes (Mowat, 1999 / Strobel e Mowat, 1998, Faria e Weiner, 2005). A tolerância aos antígenos da dieta não é dependente da habilidade do sistema digestivo em quebrar os componentes da dieta, mantendo-os “invisíveis” ao sistema imune. Ao invés disso, esses antígenos são ativamente apresentados e processados pelo

GALT e utilizados para ativar mecanismos supressores da reatividade imune inflamatória. Assim, somos imunologicamente tolerantes a todos os antígenos que ingerimos assim como a nossa microbiota. (Tsuji e Kosaka, 2008).

A tolerância oral tem sido classicamente definida como uma diminuição da reatividade humoral e/ou celular após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral (Mowat, 1999 / Faria e Weiner, 2005 / Smith e Nagler-Anderson, 2005).

Uma vez que a tolerância oral tenha sido induzida, vários aspectos da reatividade imune antígeno específica Th1 e Th2 são suprimidos: produção de imunoglobulinas (Ig) das classes como IgE, IgM, IgG e IgA (Vaz, Maia, et al, 1977 / Ngan e Kind, 1978 / Afuwape, Turner, et al, 2004; Mucida, Kutchukhidze, et al, 2005) reação de hipersensibilidade tardia (Mowat, Strobel, et al, 1982) e produção de várias citocinas (Weiner, 1994 / Afuwape, Turner, et al, 2004).

Existe uma hierarquia na inibição de respostas imunes após a indução de tolerância oral. Reações de hipersensibilidade tardia e inflamação dependente de Th1 são mais facilmente suprimidas pela exposição aos antígenos por via oral do que anticorpos dependentes de Th2. Geralmente, a inibição da resposta imune Th2 requer maior quantidade de antígenos (Kay e Ferguson, 1989 / Mowat, Steel, et al, 1996 / Faria, Ficker, et al, 1998 / Faria, Maron, et al, 2003). Uma exceção é a formação de IgE dependente de IL-4, que é altamente suscetível à indução de tolerância oral (Hanson, Vaz, et al, 1979 / Saklayen, Pesce, et al, 1984).

A natureza do antígeno, a dose e sua frequência de administração influenciam a indução da tolerância oral. Antígenos totalmente digeridos são menos capazes de induzir tolerância (Strobel e Mowat, 1998). Em geral, uma única administração oral de antígeno em alta concentração é suficiente para a indução de tolerância oral em camundongos de linhagens suscetíveis, mas linhagens menos suscetíveis requerem a administração de múltiplas doses de antígeno em dias consecutivos. Além da frequência da administração antigênica pela via oral, a forma pela qual o antígeno alcança a mucosa intestinal parece ser

muito importante na indução de tolerância oral. Dados do nosso laboratório mostram que a forma mais eficaz de induzir o fenômeno é a administração contínua do antígeno diluído na água da mamadeira dos animais. Antígenos administrados dessa forma foram capazes de induzir tolerância oral em várias linhagens de camundongos em idades variadas. Camundongos idosos, normalmente refratários à indução de tolerância oral pela administração do antígeno em dose única se tornam tolerantes quando tratados com a mesma dose de antígeno por administração contínua (ingestão voluntária) (Faria, Garcia, et al, 1993 / Faria, Maron, et al, 2003).

Vários estudos sugerem que o mecanismo responsável pela indução de tolerância oral depende do protocolo utilizado (Faria e Weiner, 2005). Altas doses dos antígenos (aproximadamente > 0,5mg/g de peso do animal) administradas oralmente favorecem a tolerância oral por induzirem inativação de células T específicas. Essas células T reconhecem o antígeno apresentado por APCs com a expressão de baixos níveis de moléculas co-estimulatórias, que ativa preferencialmente CTLA-4 (antígeno-4 do linfócito T citotóxico) (Weiner, 1994). Ao neutralizar CTLA-4 *in vivo*, Fowler e Powrie mostraram que a tolerância oral foi prejudicada, sugerindo que a expressão de CTLA-4 pelas células T antígeno específicas é um dos mecanismos de supressão da reatividade efetora dessas células. Tanto baixas doses (aproximadamente < 0,1mg/g de peso do animal) administradas oralmente como altas doses podem induzir células T reguladoras (Tregs) que medeiam o efeito supressor pela secreção de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10 ou pelo contato celular, possivelmente envolvendo moléculas de superfície como TGF- $\beta$  e CTLA-4. (Smith e Nagler-Anderson, 2005 / Faria e Weiner, 2005 / Mowat, Parker, et al, 2004 / Fowler e Powrie, 2002).

A imaturidade imunológica e a microbiota também podem influenciar a tolerância oral. Strobel e colaboradores demonstraram que camundongos susceptíveis à indução de tolerância por via oral, quando tratados com Ovalbumina (OVA) nas primeiras 48 horas de vida, não desenvolveram o estado de tolerância, apresentando altos níveis de anticorpos específicos anti-OVA. Segundo esses autores, a indução de tolerância oral ocorreria apenas após a segunda semana de vida. A suscetibilidade à indução de tolerância por via oral

surgiria, assim, por volta do 17º dia após o nascimento, posterior à organização do tecido linfóide da mucosa intestinal; principalmente das placas de Peyer e à migração dos linfócitos para o intestino (Strobel e Ferguson, 1984). A microbiota intestinal, além de ser um importante fator relacionado à formação de estruturas do GALT, também participa na manutenção da tolerância oral. A duração da supressão da resposta de IgG anti-OVA é reduzida em animais isentos de germes (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996). A redução da microbiota ou a falta de sinalização via TLR-4 (*Toll like receptor-4*) também prejudica a produção de IL-10 por células T reguladoras presentes no LnM, predispondo esses animais à alergia alimentar (Prioult e Nagler-Anderson, 2005 / Bashir, Louie, et al, 2004).

Devido a sua insuperável capacidade de capturar e apresentar antígenos, as DCs estão intimamente envolvidas na indução de tolerância oral (Steinman e Nussenzweig, 2002). O tecido linfóide associada à mucosa possui um ambiente tolerogênico único que é onde duas citocinas se destacam como importantes na indução de tolerância oral: IL-10 e TGF- $\beta$ . Esse “ambiente tolerogênico” deriva, em parte, das DCs que são capazes de induzir a secreção de IL-10 (uma citocina anti-inflamatória) por células T, produzir ou ativar TGF- $\beta$  e sintetizar ácido retinóico, ambos essenciais para geração de células Tregs (Coombes, Siddiqui, et al, 2007).

Atualmente o papel das células Tregs na tolerância oral e seu mecanismo de ação tem sido foco de grande atenção. Células T reguladoras com fenótipo CD4<sup>+</sup> têm sido categorizadas em duas classes principais, baseadas em sua ontogenia. Células T CD4<sup>+</sup> reguladoras de ocorrência natural (nTregs) geradas no timo e células desenvolvidas na periferia. Essas últimas podem ser subdivididas em Th3, Tr1 e Tregs adaptativas ou induzidas (iTregs) (Faria e Weiner, 2005 / Roncarolo, Gregori, et al, 2006). As populações de nTregs constituem aproximadamente 10% das células T CD4<sup>+</sup> em indivíduos normais e são caracterizadas pela alta expressão de CD25, o receptor  $\alpha$  de IL-2, e co-expressão de Foxp3 (fator de transcrição *forkhead box p3*) o qual é crucial para sua função reguladora (Sakaguchi e Powrie, 2007). Essas células mostraram que são capazes de suprimir a

proliferação de outras células *in vitro* e prevenir o desenvolvimento de doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias em modelos animais (Saurer e Mueller, 2009).

Em adição às nTregs, em torno de 10-15% de células T virgem CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> são convertidas em Tregs funcionais, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, na periferia, durante proliferação homeostática (Curotto de Lafaille, Lino, et al, 2004). Estudos recentes indicam que o intestino é um local importante de desenvolvimento de Tregs Foxp3<sup>+</sup> e que DCs intestinais especializadas promovem a expressão de Foxp3 através de um mecanismo que é dependente de TGF-β local e ácido retinóico, um metabólito da vitamina A (Mucida e Cheroutre, 2007 / Coombes, Siddiqui, et al, 2007 / Sun, Hall, et al, 2007). Geralmente, iTregs atuam de maneira dependente do contato celular ou pela produção de citocinas reguladoras (Vignali e Collison, 2008). Já foi identificada a expressão de TGF-β associado à membrana e secretado e a neutralização dessa molécula, através de anticorpos faz com que a supressão *in vivo* e *in vitro* não ocorra (Nakamura, Kitani, et al, 2001).

O desenvolvimento periférico de Tregs Foxp3<sup>+</sup> pode representar um mecanismo auxiliar para aumentar o repertório de Tregs em locais anatomicamente especializados, como a mucosa intestinal, por exemplo. Utilizando um modelo experimental de asma, Mucida e cols. mostraram que camundongos deficientes em nTregs são altamente suscetíveis à indução de tolerância oral. Esse trabalho mostra que a indução da tolerância oral não requer nTregs derivadas do timo já que Tregs com características similares são induzidas pela administração oral de antígeno. Tais resultados são consistentes com a idéia de que a administração oral de antígeno induz Tregs antígeno-específico num processo que requer TGF-β para indução de Foxp3 e, portanto, de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> periféricas (Mucida, Kutchukhidze, et al, 2005). Um estudo posterior do mesmo grupo de pesquisadores mostrou que a indução de tolerância oral depende da geração de células Treg induzidas na periferia. A deficiência genética de Foxp3 em camundongos transgênicos tornou esses animais incapazes de desenvolverem tolerância frente à administração oral de ovalbumina (OVA) (Curotto de Lafaille, Kutchukhidze, et al, 2008).

Vários estudos mostraram que existe uma expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nas placas de Peyer, LnM e tecidos periféricos linfóides de camundongos tratados oralmente com antígenos (Chung, Lee, et al, 2005). A função supressora de Tregs oralmente induzidas parece ser, pelo menos parcialmente, dependente de TGF- $\beta$ , com um pequeno papel para IL-10. Isto condiz com evidências de que Tregs que produzem TGF- $\beta$  ou expressam essa molécula em sua superfície são responsáveis pela prevenção de várias formas de doenças inflamatórias do intestino como, por exemplo, colite (Strobel e Mowat, 2006).

O protocolo padrão utilizado para demonstrar o desenvolvimento ou não de tolerância oral envolve a imunização com o antígeno - previamente administrado por via oral - na presença de adjuvante. Adjuvantes são usualmente definidos como compostos que podem aumentar e/ou modular a imunogenicidade intrínseca de um antígeno e, de acordo com o próprio significado da palavra, que se origina do latim *adjuvare*, tem como função ajudar. Esses compostos têm a habilidade não só de aumentar, mas de seletivamente direcionar a resposta imune de diferentes antígenos e essas propriedades têm sido consideradas em várias estratégias de vacinação para alcançar uma resposta imune celular ou humoral efetiva (Guy, 2007)

Um das grandes possibilidades é a de que os adjuvantes além de imunomodular a tolerância oral em direção a uma supressão Th1 ou Th2, ainda tenham um papel muito importante na manutenção da mesma (Santiago, 2008). A inflamação gerada pelo adjuvante pode ser importante na indução e manutenção da tolerância oral. Estudos focados na indução de resposta humoral a antígenos solúveis mostraram que diferenças no padrão de isotipos de anticorpos produzidos dependem das características bioquímicas do adjuvante. O adjuvante hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub> promove a produção de anticorpos IgE e IgG1, através de IL-4 pela ativação de células Th2 (Faquim-Mauro e Macedo, 2000).

Um balanço delicado entre a ativação de respostas imunes inflamatórias e a indução de tolerância oral deve ser mantido pela complexa rede de interações entre as células do tecido linfóide associado à mucosa intestinal. A falha nos mecanismos de indução de tolerância oral pode iniciar respostas como a hipersensibilidade a antígenos da dieta.

## 2.4 Alergia alimentar

A tolerância oral provavelmente explica porque a hipersensibilidade imunológica, ou a alergia às proteínas da dieta são relativamente raras.

Proteínas são fundamentais para a obtenção de um balanço positivo de nitrogênio e a aquisição de aminoácidos essenciais (Young e Pellett, 1987). Essas proteínas são assimiladas de maneira eficiente através da ação de proteases gástricas, pancreáticas e do intestino delgado, resultando principalmente na sua redução em aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos que são facilmente absorvidos pelas células epiteliais intestinais. A quebra destas proteínas também extingue os principais epitopos imunogênicos (Erickson e Kim, 1990). Produtos da proteólise e proteínas inteiras que escapam do processo de digestão são envolvidos em diferentes processos que podem induzir a tolerância oral bem como desenvolver respostas imunes alérgicas (Chehade e Mayer, 2005). A falha em estabelecer a tolerância oral ou a quebra da tolerância já existente provoca a indução de reações de hipersensibilidade aos antígenos da dieta, estabelecendo, por exemplo, as alergias alimentares (Saurer e Mueller, 2009).

Atualmente, as alergias alimentares têm sido consideradas um grande problema de saúde devido aos seus graves efeitos no organismo e seu aumento nas últimas décadas (Mansueto, Montalto, et al, 2006). Elas podem ser definidas como um tipo de aversão imunológica a antígenos da dieta, sendo ou não dependente de IgE (Sampson, 1999).

A prevalência de reações alérgicas em humanos afeta aproximadamente 6% das crianças menores que três anos (Maloney, Sampson, et al, 2006). Os mecanismos reguladores da mucosa intestinal não estão completamente desenvolvidos por um período variável após o nascimento. Há poucos plasmócitos secretores de IgA e grandes alterações no perfil de citocinas reguladoras secretadas quando comparados com animais adultos (Maassen, Holten-Neelen, et al, 2000). Em neonatos, a abundância de células secretoras de IL-4 durante um período crítico pode interferir na diferenciação de células T *naïve* a um fenótipo Th2, o que reforça a produção de IgE e a sensibilização atópica (Isolauri, 2004). A

imaturidade da mucosa intestinal também pode desencadear a entrada excessiva de antígenos e gerar respostas imunes inflamatórias (Kalliomaki, Salminen, et al, 2001).

Os alimentos mais comumente envolvidos no desencadeamento de alergia alimentar são leite de vaca, ovos, amendoim, trigo, soja, castanha, frutos do mar e peixe (Sicherer, 2002). A observação de que um grupo alimentar relativamente pequeno seja responsável pela grande maioria das alergias alimentares apesar da variedade da dieta humana, sugere que esses alimentos apresentam propriedades inerentes que os fazem potentes estimuladores de respostas imunes inflamatórias (Shreffler, Castro, et al, 2006). Geralmente, tais alimentos são glicoproteínas com peso molecular de 10 a 70 kD e são relativamente estáveis ao calor, à acidez e a proteases. Influências genéticas e variações ambientais, incluindo a exposições reduzidas a bactérias e infecções (hipótese da higiene) também parecem interferir no processo de desenvolvimento de alergias alimentares (Sicherer e Sampson, 2009).

A propensão à produção de altos níveis de IgE após uma exposição antigênica sofre influência de vários genes. Provavelmente mais de vinte genes estão envolvidos no desenvolvimento de doenças alérgicas (Leung, 1998). Vários estudos já identificaram genes candidatos ou *loci* que podem estar envolvidos no desenvolvimento da alergia. Um desses loci está no cromossomo 5q, próximo ao sítio do aglomerado de genes que codificam as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e o receptor de IL-4. Essa região conecta vários genes com mecanismos de regulação de IgE, bem como com o crescimento e diferenciação de mastócitos e eosinófilos (Xu, Postma, et al, 2000),

No processo alérgico dependente da produção de IgE, as proteínas da dieta inteiras ou parcialmente digeridas atravessam a camada de células epiteliais do intestino e entram em contato com o tecido linfóide associado à mucosa intestinal. As DCs desempenham um papel fundamental tanto na indução de tolerância oral, quanto no desenvolvimento de reações alérgicas, dependendo do microambiente de citocinas e de moléculas co-estimuladoras (Niess e Reinecker, 2006). Tem sido sugerido por vários autores que células dendríticas maduras (ativadas com estímulos inflamatórios) induzem a diferenciação de



células T efectoras inflamatórias. Já as células dendríticas imaturas (ausência de estímulos inflamatórios) induzem a diferenciação de células T reguladoras. (Steinman, Turley, et al, 2000 / Jonuleit, Schmitt, et al, 2000 / Jonuleit, Schmitt, et al, 2001). Na presença de IL-4, a indução da reação alérgica é iniciada com a diferenciação de células Th *naïve* em células Th2 efectoras. Geralmente, células Th2 quando estimuladas, produzem uma diversidade de citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que, entre outras funções, induzem a diferenciação de células B em plasmócitos secretores de IgE (van Wijk e Knippels, 2007). Os anticorpos IgE específicos apresentam alta afinidade pelos receptores de mastócitos e basófilos. Após uma segunda exposição ao mesmo antígeno, a ligação de anticorpos IgE estimula a degranulação de mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas, citocinas e proteases (Ogawa e Grant, 2007).

Outra característica importante nas reações alérgicas é o acúmulo de eosinófilos. A ativação e o recrutamento dos eosinófilos para as áreas inflamatórias são dependentes da ação de eotaxina e IL-5 (Jose, Griffiths-Johnson, et al, 1994). A IL-5 estimula a diferenciação e proliferação dos eosinófilos na medula óssea além de regular o recrutamento dos eosinófilos para os tecidos inflamados (Baatjes, Sehmi, et al, 2002). Já a eotaxina, com seu efeito quimiotático, estimula o acúmulo de eosinófilos para os sítios inflamatórios (Rothenberg e Hogan, 2006).

A utilização de modelos experimentais animais para a compreensão das alergias alimentares tem aumentado gradativamente nos últimos anos (Griffiths-Johnson, Collins, et al, 1993 / Knippels, Penninks, et al, 1999). Nos modelos de indução de alergia alimentar aplicados em roedores, a variedade de raças existentes, a utilização de animais geneticamente modificados e a possibilidade de análises experimentais com muitas amostras, são algumas das vantagens da aplicação freqüente desses modelos em trabalhos experimentais (Knippels, Penninks, et al, 1999 / Pilegaard e Madsen, 2004). Em 2004, Saldanha e colaboradores desenvolveram um modelo de alergia alimentar utilizando-se de camundongos BALB/c, OVA como antígeno e Al(OH)<sub>3</sub> como adjuvante. Neste modelo foi

observado uma maior produção de IgE e IgG1 específicos nos animais alérgicos (Saldanha, Gargiulo, et al, 2004).

Ressaltamos a importância das mucosas no sistema imune, tanto como sítio de interface do organismo com o ambiente externo, quanto como local que abriga a maior quantidade de linfócitos ativados do organismo e que, apesar disso, é extremamente regulado e tolerogênico. Neste estudo, buscamos a compreensão de como o sistema imune se comporta na ausência do estímulo por proteínas da dieta, utilizando as mucosas como locais de avaliação desse comportamento, nos modelos de tolerância oral e de alergia alimentar.

Utilizamos camundongos alimentados com uma dieta isenta de proteínas, que apresentam alterações imunológicas semelhantes àsquelas observadas em animais isentos de germes e em neonatos. Com esse modelo, foi possível analisar como o estado de maturação influencia fenômenos fisiológicos ou patológicos, como a tolerância oral e a alergia alimentar, respectivamente.

### *3- Objetivos*

---

### **3-1 Objetivo Geral**

Estudar a influência da administração de uma dieta livre de proteínas na indução de tolerância oral e alergia alimentar em camundongos BALB/c.

### **3-2 Objetivos Específicos**

**3-2-1** Avaliar os efeitos das proteínas da dieta na maturação do sistema imune dos camundongos, pormenorizando os seguintes parâmetros:

- Concentração das imunoglobulinas séricas Ig total, IgG, IgM e IgA e IgAS;
- Análise morfológica e morfométrica das vilosidades intestinais;
- Análise quantitativa dos linfócitos intraepiteliais (IELs);
- Análise fenotípica de células reguladoras da lâmina própria intestinal.

**3-2-2** Avaliar o efeito da alimentação com a dieta isenta de proteínas no desenvolvimento de tolerância oral, assim como alergia alimentar, utilizando os seguintes parâmetros:

- Quantificação de imunoglobulinas séricas anti-OVA Ig total, IgG1 e IgE e IgAS anti-OVA;
- Análise dos eosinófilos presentes na medula óssea;
- Padrão de citocinas secretadas pelos linfócitos do LnM de animais alérgicos estimulados *in vitro* com OVA;
- Avaliação da diferença de peso dos animais alérgicos antes e depois da indução de alergia alimentar;
- Quantificação dos eosinófilos das vilosidades intestinais dos animais alérgicos;
- Média dos consumos de ração e OVA nos animais em que a alergia alimentar foi induzida.

**3-2-3** Comparar o efeito do contato com a OVA durante o processo de indução de tolerância oral na maturação imunológica dos animais submetidos à dieta de Aa.

- Análise da produção sérica de IgG e IgA e IgAS.

**3-2-4** Avaliar os efeitos das proteínas da dieta no estado nutricional dos camundongos, analisando os seguintes parâmetros:

- Caracterização das células sanguíneas;
- Dosagem das proteínas séricas totais e albumina;
- Verificação semanal do peso e consumo de ração;
- Aferição da eliminação de gordura pelas fezes.

## *4- Materiais e Métodos*

---

## 4-1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas, fornecidos pelo Biotério Central no Instituto Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no biotério do laboratório de Imunobiologia, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG.

## 4-2 Dieta

Camundongos BALB/c de 3-4 semanas de idade foram alimentados com uma dieta controle contendo 15% de caseína como fonte de proteína (dieta padrão - Cas) ou uma dieta experimental contendo 15% de uma mistura de aminoácidos essenciais e não-essenciais na mesma proporção encontrada na caseína (dieta experimental - Aa). Ambas as dietas são isocalóricas e equivalentes em todos os nutrientes. As dietas foram elaboradas de acordo com o *American Institute of Nutrition* (Reeves, Nielsen, et al, 1993) e modificadas por (Menezes, Mucida, et al, 2003) (Tabela 1). As dietas foram administradas *ad libitum* desde o desmame, por, no mínimo, oito semanas.

**Tabela 1**

**Dieta formulada para o crescimento e manutenção de roedores**

Ingredientes	g/Kg de dieta
Amido de milho – Amphora	454,32
Caseína – Rhoster	150
Amido dextrinizado – Rhoster	151,17
Sacarose – União	100
Óleo de soja – Liza	45
Celulose – Rhoster	50
Mix mineral – Rhoster	35
Mix vitamina AIN-93M– Rhoster	10
L-Cistina – Rhoster	2
Bitartarato de colina - Rhoster	2,5
BHT – Rhoster	0,009

A caseína é então substituída por aminoácidos (Synth) essenciais e não-essenciais. Para cada 1 kg de dieta, são adicionadas 150g da seguinte mistura de aminoácidos: 6,15g de arginina, 4,65g de L-histidina, 9,15g de L-isoleucina, 13,8g de L-leucina, 12,3g de L-lisina, 4,8g de L-metionina, 7,5g de L-fenilalanina, 7,35g de L-treonina, 1,8g de L-triptofano, 10,8g de L-valina, 4,5g de L-alanina, 10,65g de ácido aspártico, 0,45g de L-cistina, 10g de ácido glutâmico, 27,65g de L-glicina, 16,95g de L-prolina, 9,45g de L-serina e 9,45g de L-tirosina.

### 4-3 Hemograma

Para a contagem dos leucócitos, foram utilizados 10 $\mu$ L de sangue coletados em anticoagulante EDTA (Doles), diluídos em 200 $\mu$ L de solução de ácido acético a 2%. As células foram contadas em Câmara de *Neubauer* e para o cálculo, o número de leucócitos ( $\text{mm}^3$ ) = leucócitos contados nos quatro campos x 50. A contagem diferenciada das células foi realizada em esfregaços em lâmina de vidro corados com *May-Grunwald* e *Giemsa* (ambos Doles).

### 4-4 Avaliação nutricional dos animais

Com o intuito de avaliar o estado nutricional dos animais estudados, suas massas corpóreas e o consumo de ração foram determinados semanalmente e a concentração sérica de albumina e proteínas totais foi analisada com oito semanas de dieta, ou seja, doze semanas de idade.

Para a realização das avaliações bioquímicas, o sangue foi coletado do plexo ocular e colocado em microtubos de centrifuga de 1,5mL. Um volume de sangue de aproximadamente 100 $\mu$ L foi obtido por animal. Após a coagulação, as amostras foram centrifugadas a 600g por 10 minutos para a obtenção do soro utilizado nas avaliações bioquímicas, as quais foram realizadas no mesmo dia da coleta do sangue.

#### 4-4-1 Albumina

A avaliação da concentração sérica de albumina foi realizada pelo sistema de medição que se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima do corante verde de



bromocresol, utilizando-se o Kit comercial Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>. A cor formada é proporcional a quantidade de albumina.

Para a realização da dosagem de albumina sérica foi adotado o procedimento simplificado na tabela 2.

<b>Tabela 2</b>			
<b>Teste para dosagem de albumina no soro</b>			
	<b>Branco</b>	<b>Teste</b>	<b>Padrão</b>
Reagente de cor	1 mL	1 mL	1 mL
Amostra	---	0,01 mL	---
Água destilada	0,01 mL	---	---
Padrão	---	---	0,01 mL

As absorbâncias foram determinadas em 630nm ou em filtro vermelho (600 a 640nm), em no máximo 10 minutos a temperatura ambiente, após o início da reação.

$$\text{Albumina (g/dL)} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do padrão}) \times 3,8$$

#### 4-4-2 Proteínas séricas

A avaliação da concentração sérica de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto, utilizando-se o Kit comercial Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>. Neste método os íons cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) em meio alcalino (reagente de biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura.

A realização da dosagem bioquímica de proteínas totais segue o procedimento simplificado na tabela 3.

<b>Tabela 3</b>			
<b>Teste para dosagem de proteínas séricas totais</b>			
	<b>Branco</b>	<b>Teste</b>	<b>Padrão</b>
Reagente de cor	1 mL	1 mL	1 mL
Amostra	---	0,02 mL	--
Água destilada	0,02 mL	---	--
Padrão	---	---	0,02 mL

As amostras foram mantidas por 10 minutos a 37°C e as absorvâncias determinadas em 545nm (530 a 550nm), a cor permanece estável durante 1 hora.

Proteínas séricas totais (g/dL) = (Absorvância do teste / Absorvância do padrão) x 4.

#### **4-5 Bromatologia das fezes**

A análise das fezes foi realizada pelo Laboratório de Nutrição da Escola Veterinária da UFMG. A determinação do teor lipídico foi feita pelo método de Soxhlet. A técnica fundamenta-se na extração dos lipídeos por solvente apropriado em um aparelho extrator Soxhlet. Após a extração, o solvente é evaporado através de um rotavapor e a fração de lipídeos é então determinada.

#### **4-6 Obtenção dos soros**

Os camundongos foram anestesiados com 150µL de uma solução estéril de 25% de cloridrato de Ketamina (Dopalen – Vetbrands) e 25% de cloridrato de 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum – Bayer) em solução salina, via intraperitoneal. O sangue foi coletado em microtubos de centrifuga de 500µL a partir de uma incisão no plexo axilar e após a coagulação, o soro foi separado por centrifugação a 600g e mantido a -20°C.

#### **4-7 Coleta do conteúdo fecal**

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

#### **4-8 Dosagem de imunoglobulinas séricas e IgA secretória**

Os títulos de anticorpos no soro e no muco foram medidos por *ELISA*. As placas (*Nunc-Immuno Plates MaxiSorp*) foram incubadas com solução (100µl/poço) contendo

anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1mg/mL (*Southern Biotechnology*) e diluídos (1:2000) 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. Para a dosagem de Ig totais e IgG o soro foi diluído 1:2000 e para IgM e IgA 1:100. O sobrenadante das fezes foi diluído 1:20. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2) com o soro ou sobrenadante das fezes em PBS-0,25% caseína, e as placas foram incubadas durante uma hora a 37°C. Na seqüência, as placas foram novamente lavadas. Anticorpos de cabra anti-Ig, IgG, IgM ou IgA de camundongo conjugados com biotina 0,5mg/mL (*Southern Biotechnology*) e diluídos (1:10000) em PBS-0,25% caseína foram adicionados aos poços (100 µL/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) em um diluição 1:15000 (100µl/poço) em PBS-0,25% caseína durante uma hora a 37°C. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feito através da incubação com 4mg de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma), 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 10 mL de tampão citrato 100µl/poço, A reação foi bloqueada pela adição de 20µL/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N. A leitura foi realizada em leitor de *ELISA* automático (*Bio-Rad Model 450 Microplate Reader*), em comprimento de onda de 492 nm.

Todas as reações de *ELISA* acima descritas tiveram como controle positivo (padrão), anticorpos purificados IgA (10µg/mL) e Ig total, IgM, IgG (15µg/mL) de camundongo (*Southern Biotechnology*) em uma diluição 1:10 em PBS-0,25% caseína. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

#### **4-9 Histologia do intestino delgado**

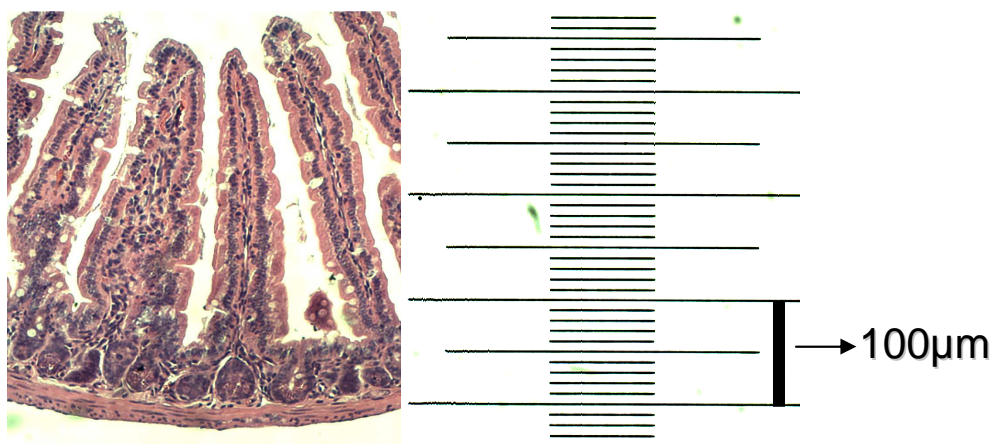
A histologia do intestino delgado foi realizada no Laboratório Dairton Miranda LTDA. Resumidamente, os intestinos delgados foram removidos dos camundongos e a terça parte

final e inicial do jejuno proximal e distal, respectivamente, foram retiradas e fixadas em formol tamponado 10% em pH 7,2.

Após a fixação, os tecidos foram submetidos ao histotécnico, um processador automático. O material foi processado durante 14 horas por dez seqüências consecutivas de álcool absoluto, xilol e banhos de parafina. A seguir os tecidos foram incluídos em parafina e os cortes histológicos de 3 $\mu$ m de espessura foram feitos em micrótomo automático. As lâminas foram desparafinizadas em estufa a 96°C por 15 minutos. Para a coloração, foram realizados quatro banhos de imersão em álcool absoluto por 20 segundos cada, os cortes foram lavados em água corrente por 20 segundos e corados com hematoxilina por 2 minutos e meio. A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas com eosina por 30 segundos. Posteriormente, as lâminas foram imersas em oito cubas, sendo quatro de álcool e quatro de xilol por 20 segundos cada e, finalmente montadas.

#### 4-10 Morfometria dos vilos intestinais

Imagens das lâminas histológicas dos vilos intestinais coradas com HE foram capturadas a partir de uma microcâmara JVC TK-1270/RGB, em aumento de 100x. Os vilos foram medidos, descontando-se as criptas, através de lamínula milimetrada de acordo com a figura 4. O resultado foi apresentado pelas médias dos vilos de cinco animais por grupo.



**Figura 4: Morfometria dos vilos intestinais.**

Os vilos intestinais foram medidos e a média do tamanho de cinco vilos por animal foi determinada.

**4-11 Contagem de linfócitos intraepiteliais**

O epitélio foi examinado em aumento de 400X em microscópio óptico. Os IEL (linfócitos intraepiteliais) foram identificados pela sua localização característica: basal em relação aos núcleos dos enterócitos e por apresentarem pequeno halo claro de citoplasma ao redor de seu denso núcleo esférico e regular. Para cada fragmento, foram contadas 500 células epiteliais, não incluindo células caliciformes, segundo a descrição de (Ferguson e Murray, 1971). O número final de IEL foi expresso em relação a 100 células epiteliais.

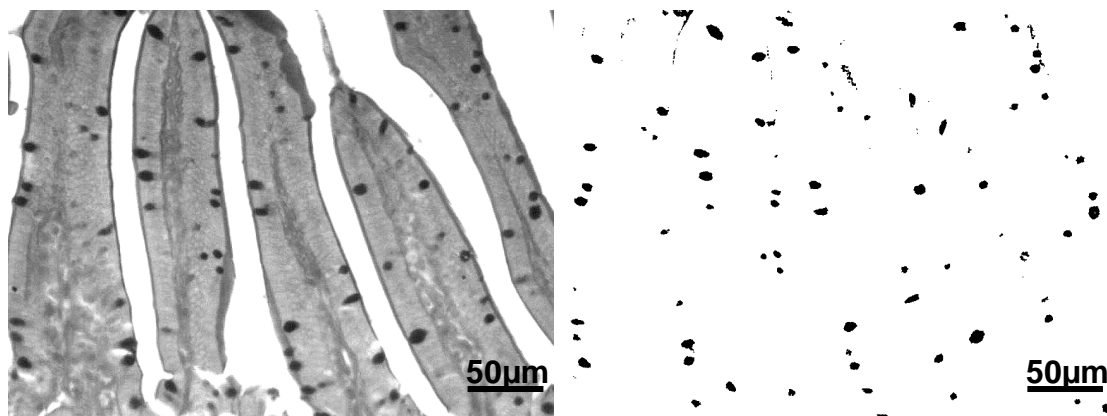
**4-12 Avaliação do número de eosinófilos**

Para identificação e contagem dos eosinófilos, os cortes histológicos do intestino delgado foram corados por HE e as lâminas foram examinadas em microscópio óptico, Dez campos foram escolhidos ao acaso, em um aumento de 40x para a contagem do número de eosinófilos, O resultado foi expresso em número de eosinófilos/campo,

**4-13 Avaliação da produção de muco intestinal**

A avaliação da presença de muco intestinal foi feita através do método de coloração por PAS. Neste método, os cortes foram desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados no Reativo de *Schiff* durante 10 minutos ou mais, até que atingissem uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes foram evidenciadas em um tom rosa escuro.

As lâminas foram montadas e as imagens de cada porção do intestino delgado foram capturadas em um aumento de 100X. As imagens foram analisadas com a utilização do programa *ImageJ*. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em % (Figura 5).



**Figura 5: Determinação quantitativa das células caliciformes.**

Com o auxílio do programa *ImageJ*, as células caliciformes foram selecionadas através de diferentes pixels. A porcentagem de área equivalente das células analisadas foi feita em relação à área total da imagem.

#### 4-14 Linfócitos da lâmina própria

O intestino delgado foi removido e lavado com 20 mL de HBSS gelado. Toda gordura aderida e as placas de Peyer foram cuidadosamente removidas. Os intestinos foram abertos longitudinalmente e cortados em pedaços de 0,5-1,0 cm. Os pequenos pedaços foram colocados em tubos de centrifuga de 50 mL com 20 mL de HBSS gelado e mantidos no gelo. Os intestinos foram filtrados e lavados por três vezes com HBSS gelado. A seguir foram incubados com 25 mL de meio IEL por 30 minutos em *shaking* (150/min) a 37°C. Os tubos foram submetidos à agitação mecânica por cerca de 30 segundos para que toda a camada de células epiteliais fosse liberada. O conteúdo de todos os tubos foi filtrado em redes de 70µm. Os pequenos pedaços de intestino restantes foram incubados com colagenase do tipo II (100U/mg) a 37°C por 30-40 minutos em *shaking* (150/min). Os intestinos foram novamente filtrados em redes de 70µm e 30 mL de meio IEL foram acrescentados. O conteúdo foi então centrifugado a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 4,5mL de percol a 44% em um tubo de centrifuga de 15 mL. Cuidadosamente 2,3mL de percol a 66% foram adicionados ao fundo do tubo para que se obtivesse um gradiente de concentração. Duas fases foram claramente vistas e delimitadas. Os tubos foram centrifugados a 600g por 20 minutos a 20°C. As

frações de linfócitos foram vistas em um anel na interfase de 44-66% de percol. Os linfócitos foram retirados com uma pipeta de 2 mL e colocados em um novo tubo de 15mL. O meio IEL foi adicionado até o volume de 12 mL e o tubo foi centrifugado a 300g por 5 minutos a 4°C. O *pellet* foi então ressuspendido a 1 mL e as células foram contadas e submetidas à marcação celular para citometria de fluxo.

#### **4-15 Determinação de Ig total e IgG1 séricas e IgA secretória anti-OVA**

A produção das imunoglobulinas foi determinada pelo método de *ELISA*. As placas foram cobertas com 100µL por poço da solução de 200µg de OVA diluídos em 10mL de tampão carbonato pH 9.6 por, no mínimo, 18 horas a 4°C e posteriormente lavadas três vezes com solução salina-0,05%Tween. O bloqueio foi realizado com PBS-0,25%caseína, 200 µL/poço, por no mínimo 1 hora. Logo em seguida, as placas foram novamente lavadas por três vezes com solução salina-0,05%Tween. O soro foi incubado na diluição inicial 1/100 para Ig total e IgG1 (100µl/poço) e para IgA secretória foi adicionado 200µl/poço de conteúdo fecal total diluído em PBS 1X gelado. A placa foi lavada por três vezes com solução salina-0,05%Tween. A seguir anticorpos de cabra anti-Ig, IgG1 ou IgA de camundongo conjugados com biotina 0,5mg/mL (*Southern Biotechnology*) e diluídos (1:10000) em PBS-0,25% caseína foram adicionados aos poços (100 µL/poço) durante uma hora a 37°C. As placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05%Tween e incubadas com estreptavidina ligada a peroxidase (Sigma), 100µL/poço na concentração de 1:15000, por 1 hora. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feito através da incubação com 4mg de OPD, 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 10 mL de tampão citrato 100µl/poço. A reação foi bloqueada pela adição de 20µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura realizada em leitor de *ELISA* automático, em comprimento de onda de 492 nm.

As reações de *ELISA* descritas acima tiveram como controle positivo (padrão), soro de animal imunizado, diluído 1:10 em PBS-0,25% caseína. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

#### 4-16 Determinação de IgE anti-OVA

A quantificação da produção de IgE foi realizada pelo método *ELISA*. As placas foram incubadas com solução (100µl/poço) contendo anticorpo de cabra anti-IgE de camundongos 0,5mg/mL (*Southern Biotechnology*) e diluídos (1:400) 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 soro) foi incubado por 2h em temperatura ambiente. Na seqüência, as placas foram novamente lavadas e realizada a incubação com Ovalbumina (OVA) + Biotina, 1µg/100µL PBS/poço, por 1h. As placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05%Tween e incubadas com estreptavidina ligada a peroxidase (Sigma), 100µL/poço na concentração de 1:15000, por 1 hora; Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feito através da incubação com 4mg de OPD, 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 10 mL de tampão citrato 100µl/poço. A reação foi bloqueada pela adição de 20µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura realizada em leitor de *ELISA* automático, em comprimento de onda de 492 nm.

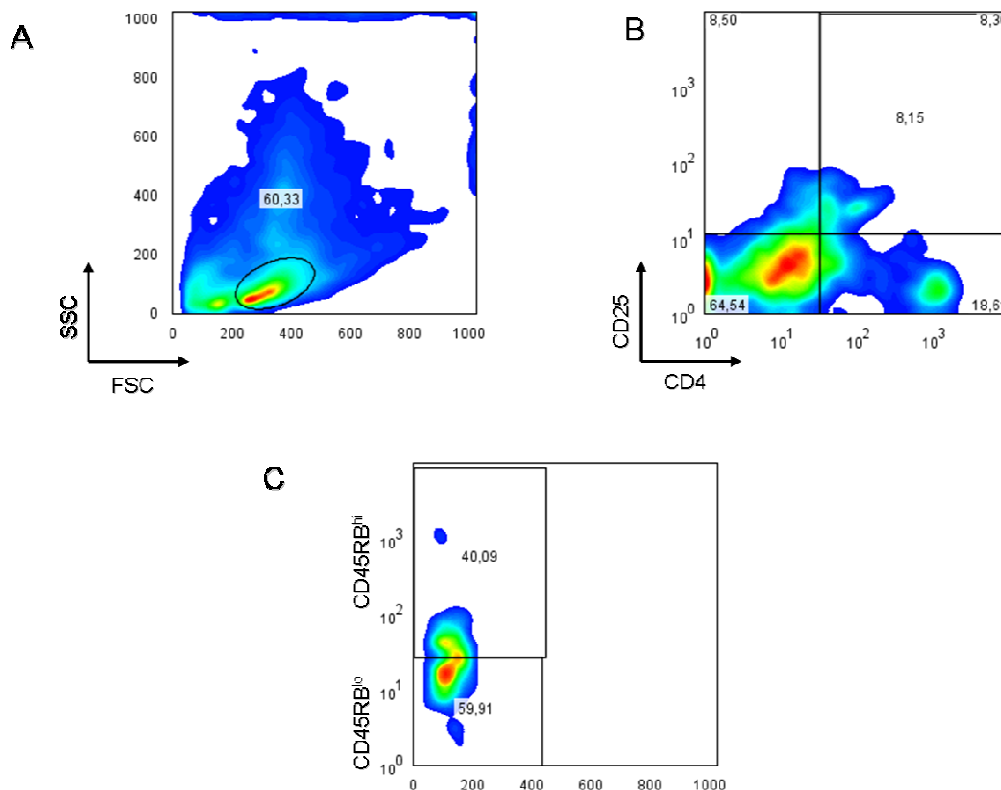
A reação de *ELISA* descrita acima teve como controle positivo (padrão), soro de animal imunizado, diluído 1:10 em PBS-0,25% caseína. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

#### 4-17 Análise fenotípica de células através de citometria de fluxo

Em uma placa de 96 poços de fundo em U foram colocados 25 µl de suspensão celular na ordem de 10<sup>7</sup> e 10 µl de anticorpos conjugados com fluorocromos – PE (ficoeritrina), FITC (fluoresceína) ou Cy (CyChrome) – que se ligam às moléculas de interesse, tais como CD45RB, CD25 e CD4 respectivamente expressas nas células de camundongos. As placas foram então incubadas a 4 °C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foram então acrescentados 200 µl de PBS azida/poço para lavagem das placas 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  $\mu$ l de fixador Mac Facs Fix e as suspensões armazenadas a 4 °C e protegidas de luz até a aquisição dos dados, utilizando-se FACScan de três cores (Becton Dickinson). Foram utilizados os anticorpos IgG2a Cy, IgG2a FITC e IgG2a PE para controle negativo. A porcentagem e o número absoluto de células positivas foram analisados através do *software Flow Jo* (Figura 6). Foram lidos 20.000 eventos dentro do *gate* de linfócitos e utilizado um *n* de cinco animais por grupo.



**Figura 6: Análise de linfócitos da lâmina própria por citometria de fluxo.**

A figura 2A representa um perfil celular de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de linfócitos. A figura 2B representa FL1 (CD25-FITC) versus FL2 (CD4-CY) dentro da população de linfócitos totais. A figura 2C representa a população CD45RB-PE dentro da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

## **4-18 Tolerância oral, imunização parenteral e indução de alergia alimentar**

Os protocolos de indução de tolerância oral foram realizados em animais com doze semanas de idade, ou seja, oito semanas de deita.

### **4-18-1 Gavagem**

Através de uma agulha com ponta em esfera e comprimento necessário para chegar ao estômago, foi administrado a cada camundongo 20mg/0,2ml de uma solução de Ovalbumina (OVA) grade III (Sigma) diluída em salina fisiológica estéril. Este tratamento foi realizado por um, dois ou três dias consecutivos e a primeira imunização parenteral foi feita sete dias após o último dia de indução de tolerância.

### **4-18-2 Ingestão voluntária**

Para a indução de tolerância oral, foi oferecida aos animais uma solução de OVA a 4mg/ml de água para beber por camundongo. Como cada camundongo consome em média 5mL de água por dia, foi oferecido para cada animal 20mg de OVA. O tratamento foi realizado durante um, dois ou três dias consecutivos (a solução com OVA foi trocada diariamente nos protocolos de dois e de três dias). Após sete dias os camundongos receberam a primeira imunização parenteral.

### **4-18-3 Imunizações parenterais**

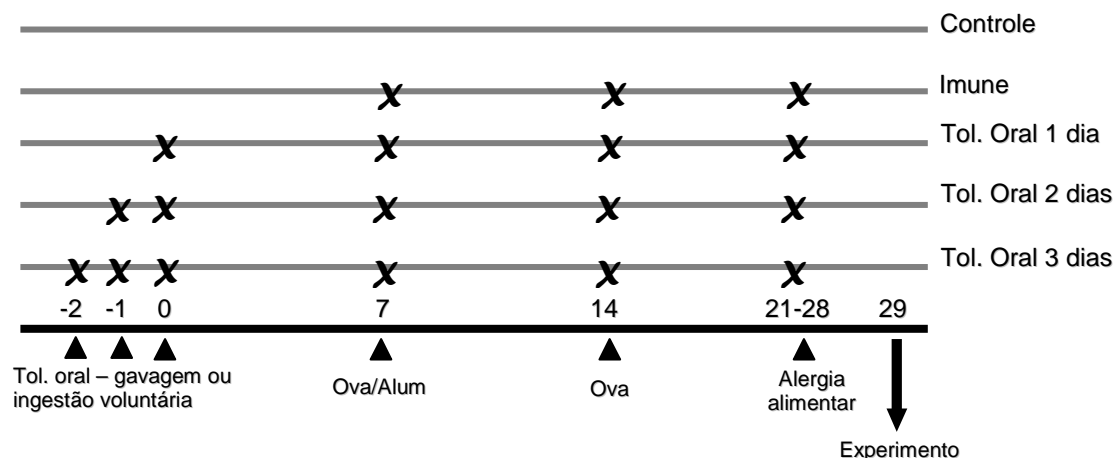
A imunização primária foi feita via intraperitoneal com 10 µg de Ova + 1 mg de Al(OH)<sub>3</sub>, como adjuvante, diluídos em 0,2 mL de salina fisiológica estéril.

A imunização secundária foi dada quatorze dias após a imunização primária via intraperitoneal com 10 µg de Ova diluídos em 0,2 mL de salina fisiológica estéril.

### **4-18-4 Indução de alergia alimentar**

Após 7 dias da segunda imunização, foi oferecida aos animais uma solução de clara de ovo a 20% diluída em água para beber *ad libitum*, durante 7 dias consecutivos. A solução foi trocada diariamente e o volume restante foi medido. Este protocolo de alergia alimentar foi adaptado de Saldanha e colaboradores (Saldanha, Gargiulo, et al, 2004).

Os procedimentos anteriores se resumem ao protocolo 1:



### Protocolo 1: Indução de tolerância oral à alergia alimentar

#### 4-19 Eosinófilos da medula óssea

A coloração para peroxidase resistente ao cianeto é uma técnica que permite a coloração específica de eosinófilos murinos, pois estas células possuem uma peroxidase (EPO – *eosinophil peroxidase*) cuja atividade não é inibida pela presença de cianeto (Gaspar Elsas, Maximiano, et al, 2000).

Amostras da medula óssea foram obtidas do fêmur direito, as epífises do osso foram perfuradas com uma agulha e o canal medular lavado com 5 mL de meio RPMI 1640 completo. As suspensões celulares foram homogeneizadas para desfazer os agregados. O conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 300g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido a 5 mL. As células foram citocentrifugadas na ordem de  $6 \times 10^4$  por 10 minutos a 25g e as lâminas foram fixadas por imersão em uma solução isotônica de formol a 10%, por 12 minutos. Após a fixação, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Uma solução com 1 ml de DAB (diaminobenzidina) 0,00075 g/ml, 6,7  $\mu$ L de KCN (cianeto de potássio) 600 mM e 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 V foi preparada e 50 $\mu$ L desta solução foram adicionados em cada lâmina. As lâminas foram incubadas por 10-12 minutos em câmara úmida, ao abrigo da luz, lavadas em água corrente e contra-coradas por imersão em Hematoxilina de *Harry's* por 1 minuto. As lâminas foram fotografadas em aumento de 400x e a contagem diferencial de cerca de 400 células foi realizada.

## 4-20 Preparação de suspensão de células de LnM

O LnM de cada animal foi retirado e mantido em meio RPMI 1640 completo em tubos de centrífuga de 15ml e mantidos no gelo. Os linfonodos foram macerados com lâminas estéreis friccionando-as uma contra a outra em 2ml de meio RPMI 1640 completo em uma placa de Petri. As suspensões foram então transferidas para novos tubos de 15ml e centrifugadas durante dez minutos a 300g a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspensionado em 500 µl de meio RPMI 1640 completo. O número de células viáveis nesta suspensão foi obtido contando-se alíquotas misturadas com uma solução de eritrocina em câmara de *Neubauer*. As concentrações das suspensões foram então todas padronizadas para se obter  $5 \times 10^6$  células/ml. As células foram cultivadas sem ou com estímulo (5 mg/mL de Ovalbumina) por 72 horas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de cultura estéreis de 24 poços. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem citocinas.

## 4-21 Determinação de citocinas

A presença de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-γ no LnM foi quantificada pelo método de *ELISA*. Placas de 96 poços (*Nunc-Immuno Plates MaxiSorp*) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura (*Pharmingen*) para IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-γ (2µg/mL) em tampão carbonato pH 9.6, 100µL/poço "overnight" a 4°C. Após três lavagens com solução salina-0,05% de Tween, foi realizado o bloqueio das placas com 200µL de PBS-0,25% de caseína. As placas foram incubadas por uma hora ou mais a temperatura ambiente e após a incubação foram lavadas três vezes com solução salina-0,05% Tween. Em seguida as amostras foram colocadas (100µL/poço para IL-4, IL-5 e IL-10 e 50µL/poço para IFN-γ) e incubadas "overnight" a 4°C. Depois de três lavagens com solução salina-0,05% Tween, foram adicionados os anticorpos de detecção biotinilados (*Pharmingen*) numa concentração de 1µg/mL de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-γ 100µL/poço. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após seis lavagens com solução salina-0,05% Tween, foi adicionada a estreptavidina conjugada com peroxidase (*Southern Biotechnology*), diluída em PBS-

0,25% de caseína 100µl/poço por 45 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas oito vezes com solução salina- 0,05% Tween. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feito através da incubação com 4mg de OPD, 2µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 10 mL de tampão citrato 100µl/poço; 7. A reação foi bloqueada pela adição de 20µL/poço de ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura realizada em leitor de *ELISA* automático, em comprimento de onda de 492 nm. Os valores das absorbâncias foram convertidos em pg/mL baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes, utilizadas como padrão.

## 4-22 Cálculos estatísticos

Comparações para avaliar a diferença entre dois grupos foram realizadas pelo Teste *t* de *Student*. E para comparar as diferenças entre mais de dois grupos foi utilizado à análise de variância (ANOVA), com pós-teste de *Tukey*. O limite de significância utilizado foi  $p < 0,05$ .

## 4-23 Soluções utilizadas

### PBS 10X – pH 7,2

- 80,00 g de NaCl;
- 2,00 g de KCl;
- 21,70 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;
- 2,00 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada,

### Salina 10X

- 85 g de NaCl;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada,

### Salina fisiológica a 0,85% (a partir da solução estoque 10X)

- 100 mL da solução salina 10X;
- 900 mL de água bidestilada ou deionizada;
- Filtrada em fluxo laminar ou autoclavada,

### Tampão carbonato ou Coating buffer - pH 9,6

- 1,86 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;

- 2,93 NaHCO<sub>3</sub> - 0,035M;
- 1000 mL de água destilada ou deionizada.

**PBS 0,25% caseína - pH 7,2**

- 1000 mL de solução PBS 1X;
- 2,5 g de caseína.

**Salina Tween 10x**

- 85 g de NaCl;
- 5 mL de Tween 20;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada.

**Tampão citrato - pH 5,0**

- 13,41 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;
- 5,19 g de Ácido cítrico;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada,

**Solução de ácido sulfúrico (2N)**

- 53,24 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada,

**RPMI 1640 incompleto - pH 7,3**

- 16,2g RPMI 1640 (Gibco)
- 2 g de NaHCO<sub>3</sub>
- 3,6 g/L de HEPES
- 1000 mL com água milli-Q.
- Filtrado em fluxo laminar e conservado em 4°C,

**RPMI 1640 completo**

- 450 ml de meio RPMI incompleto;
- 50 mL de soro fetal bovino;
- 5 mL de solução de aminoácidos não essenciais (100X - 10mM);
- 5 mL de solução de piruvato de sódio (100X - 100mM) ou 55 mg de piruvato de sódio;
- 5 mL de L-glutamina (100x - 200 mM);
- 0.450 mL de 2-mercaptoetanol.
- 2,5mL de gentamicina (5mg/mL);
- 1,5mL de fungizona

### **HBSS - ph 7,3**

- 0.4 g de KCl;
- 0.06 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;
- 0,35 g de  $\text{NaHCO}_3$ ;
- 8.0 g de NaCl;
- 0.04788 g de  $\text{NaHPO}_4$ ;
- g de D-glicose;
- 0.011 g de vermelho de fenol;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada.
- Filtrado,

### **Meio IEL**

- 1000 ml RPMI
- 20 ml de soro fetal bovino
- 20 ml 1M HEPES buffer
- 10 ml penicillin/streptomycin 100x
- 0.50 ml gentamicina (40 mg/ml)

### **PBS 1X azida - pH 7,2**

- 1000 ml de PBS 1X
- 0,1 g de azida sódica

### **Fixador (MAC FACS FIX) - ph 7,2**

- 0.665 g de NaCl;
- 1.08 g de ácido cacodílico;
- g de paraformaldeído;
- 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q qsp;
- Filtrado em rede de a 45  $\mu\text{m}$ ,

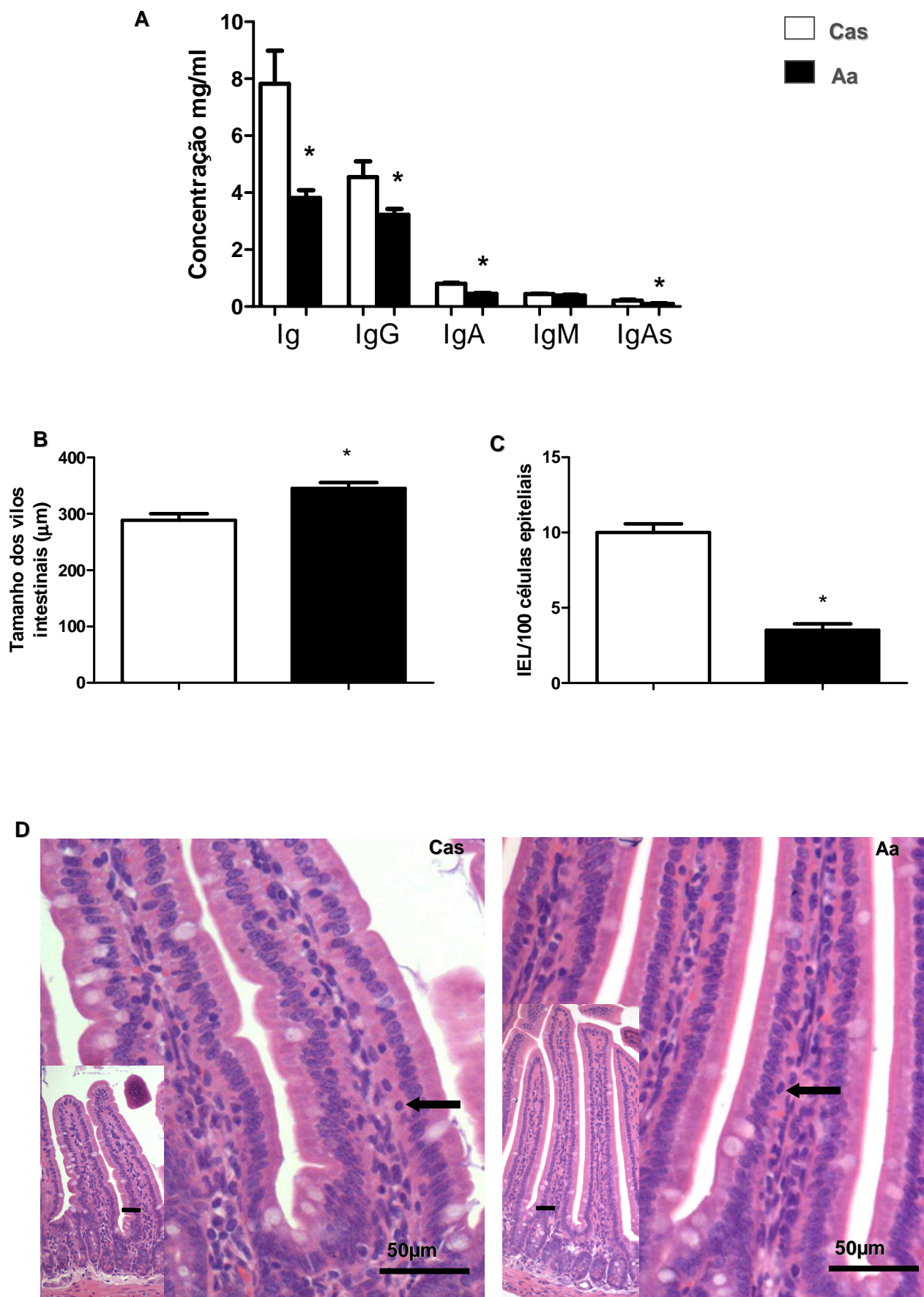
## *5- Resultados*

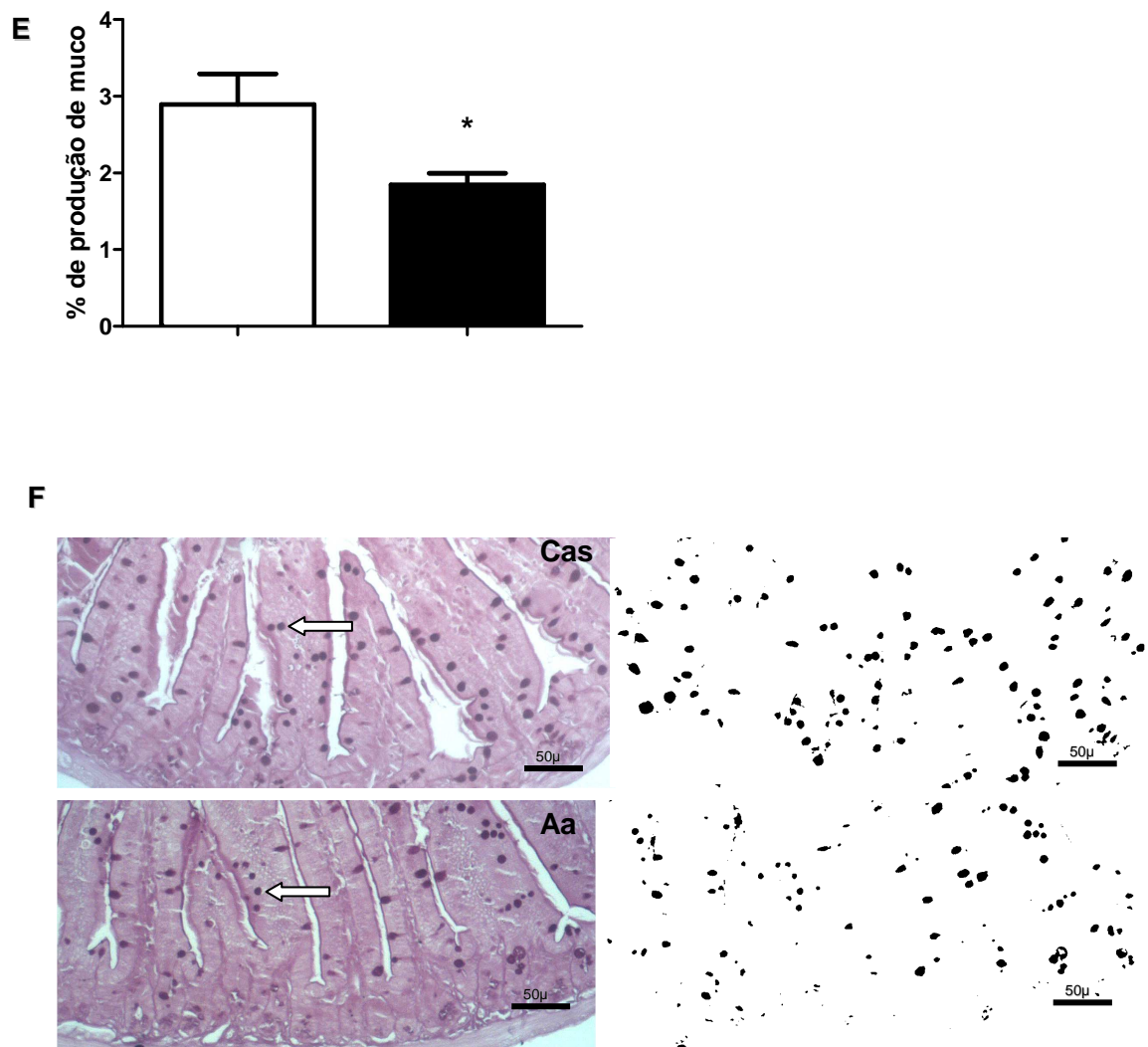
---



## **5-1 A estimulação pelas proteínas da dieta desempenha um papel essencial na maturação do sistema imune.**

Verificamos previamente em nosso laboratório que animais C57BL/6 mantidos na dieta de Aa apresentam características típicas de animais recém-nascidos ou isentos de germes. Estes animais apresentaram níveis de IgAS e imunoglobulinas totais séricas reduzidos e redução drástica do tecido linfóide associado ao intestino em relação aos animais que se alimentaram da dieta de Cas (Menezes, Mucida, et al, 2003). Decidimos então, analisar a produção de imunoglobulinas e a histologia do intestino delgado em animais BALB/c alimentados com ambas as dietas e quantificar a produção de muco, pelas células calciformes do intestino delgado destes animais. Os animais que se alimentaram da dieta de Aa apresentaram níveis reduzidos de todas as imunoglobulinas séricas analisadas, com exceção de IgM e redução de IgAS em relação ao grupo que se alimentou de Cas (Figura 7A). Os vilos da região do jejuno proximal e distal do grupo Aa apresentaram uma diferença de tamanho de aproximadamente 100 $\mu$ m (Figura 7B) e uma menor quantidade de linfócitos intraepiteliais (Figura 7C). A figura 7D caracteriza os vilos dos grupos que se alimentaram da dieta de Cas e Aa. A produção de muco também foi reduzida no grupo que se alimentou de Aa (Figura 7E e F).





**Figura 7: Análise da maturação do sistema imune de camundongos BALB/c alimentados com as dietas de Cas e Aa.**

Os animais recém-desmamados foram alimentados com uma dieta contendo caseína como única fonte protéica - Cas (barra branca) ou com uma dieta contendo quantidades equivalentes dos aminoácidos presentes na caseína - Aa (barra preta). O soro de camundongos alimentados com a dieta de Cas e Aa foi analisado por *ELISA* para determinar a concentração de Ig total, IgG, IgA, IgM e IgAS (Figura A). A figura B representa a morfometria dos vilos de Cas e Aa, o resultado é referente à média do tamanho de cinco vilos por animal. A quantidade de linfócitos intraepiteliais também foi quantificada de acordo com Materiais e Métodos (figura C). A figura D representa a histologia do intestino delgado de Cas e Aa corado com HE, as setas pretas apontam para os linfócitos intraepiteliais. Esta figura apresenta o vilão inteiro e a lâmina própria em detalhe. A figura E diferencia a produção de muco dos grupos Cas e Aa e a figura F demonstra a histologia do intestino delgado de ambos os grupos corados com PAS. A seta branca aponta para as células caliciformes. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 5 animais por grupo. \* $p < 0,05$ : Aa x Cas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de Student.

## 5-2 As proteínas da dieta interferem no desenvolvimento de respostas imunológicas associadas à alergia.

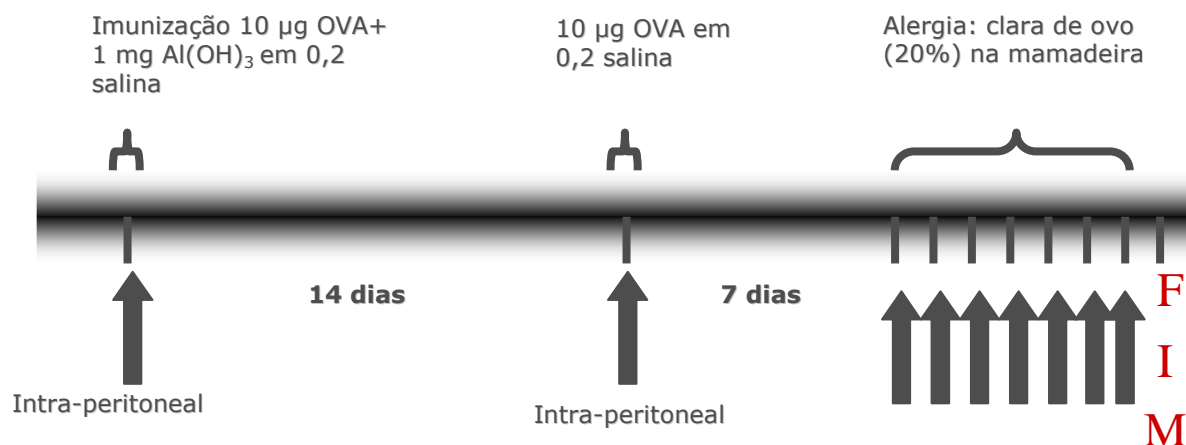
Como os animais do grupo Aa apresentam características típicas de animais imaturos, decidimos estudar a indução de alergia alimentar, uma patologia que se desenvolve, principalmente, na infância, e está associada a um padrão Th2. (van Wijk e. Knippels 2007). Em 2003, Menezes e colaboradores mostraram que camundongos C57BL/6 que se alimentaram apenas com a dieta de Aa apresentaram um perfil de citocinas similar aos de neonatos, com alta produção de IL-4 e IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$ . (Menezes, Mucida, et al, 2003). Decidimos, então, analisar a produção dessas citocinas no modelo de alergia alimentar para determinar se o aumento ou não da susceptibilidade nesta patologia estava associado ao perfil imaturo ou pelo fato destes animais apresentarem a produção de citocinas desviada para o padrão Th2. Analisamos a produção de IL-4, uma citocina que induz a diferenciação de células T *naïve* em Th2 e induz a troca de isotipo em IgE em linfócitos B; IL-5 que está relacionada com a diferenciação e crescimento de eosinófilos; IL-10, uma citocina imurreguladora, que inibe a diferenciação de células T *naïve* em Th1 e diminui a expressão de MHC de classe II e de moléculas co-estimuladoras em macrófagos e IFN- $\gamma$  que inibe a diferenciação de células T *naïve* em Th2 e ativa macrófagos aumentando a expressão de MHC de classes I e II (Murphy, Travers, et al, 2010)

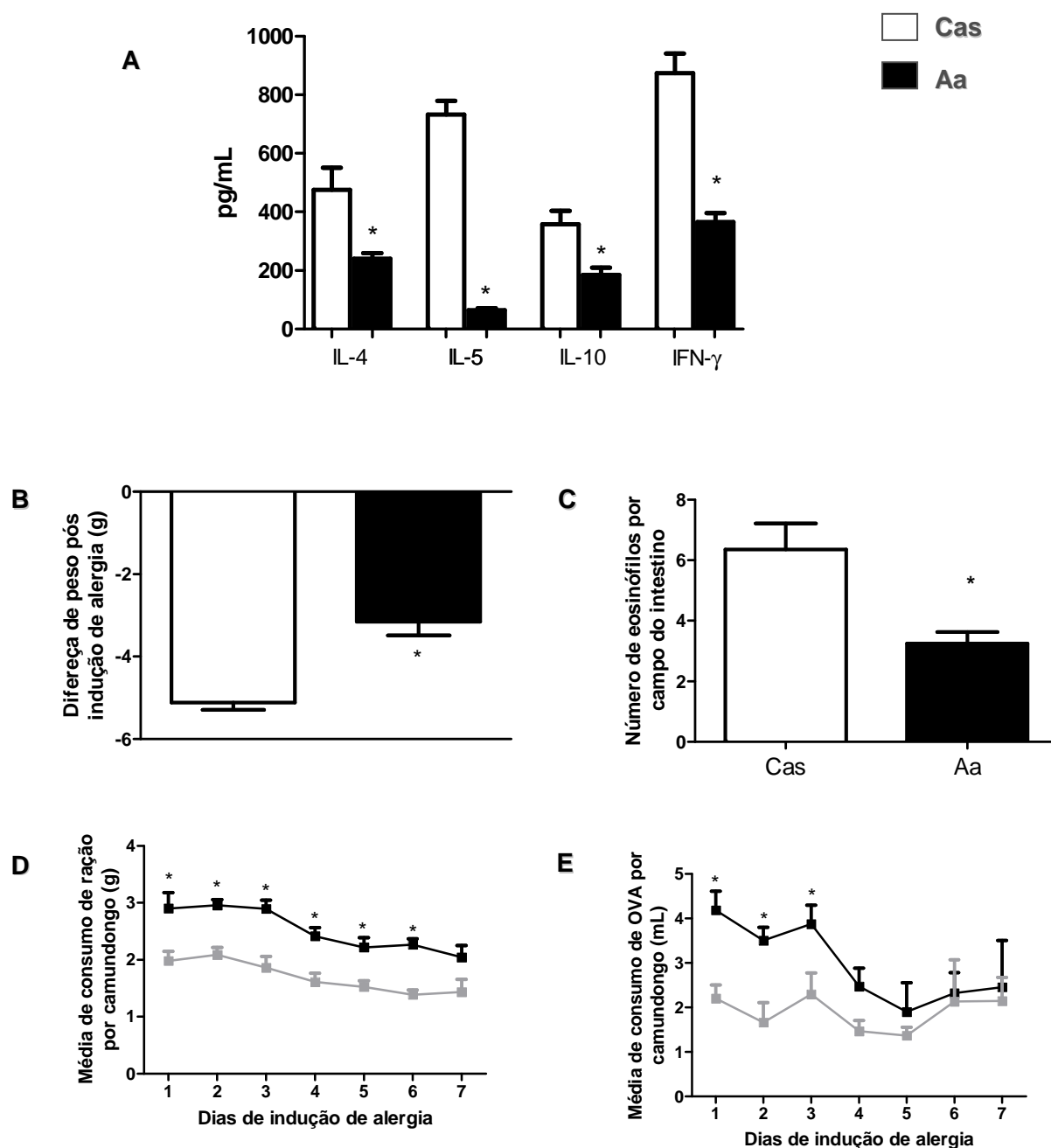
A alergia alimentar foi induzida de acordo com o protocolo abaixo. Os animais que foram imunizados e desafiados serão chamados de “Imune”, enquanto os animais que não foram imunizados, nem desafiados, serão chamados de “Controle”. Células do linfonodo mesentérico foram colocadas em cultura e estimuladas com OVA Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 72 horas e testados por *ELISA* para a produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Como observado na figura 8A, as células dos camundongos alimentados com a dieta de Aa quando estimuladas em cultura, produzem níveis menos elevados de citocinas do que as células dos camundongos alimentados com Cas. Verificamos também que os grupos imunes de Cas apresentaram em comparação com os grupos imunes de Aa, um aumento significativo de perda de peso após a indução da alergia

(Figura 8B). Curiosamente, os animais alimentados com a dieta contendo apenas aminoácidos, apresentaram uma inflamação intestinal mais discreta, com menor número de eosinófilos por campo (Figura 8C), maior consumo de ração (Figura 8D) e consumo de OVA (Figura 8E).

Concluimos que os animais alimentados com a dieta isenta de proteínas apresentaram uma menor tendência ao desenvolvimento de respostas imunológicas associadas à alergia.

### Protocolo de indução de alergia alimentar.



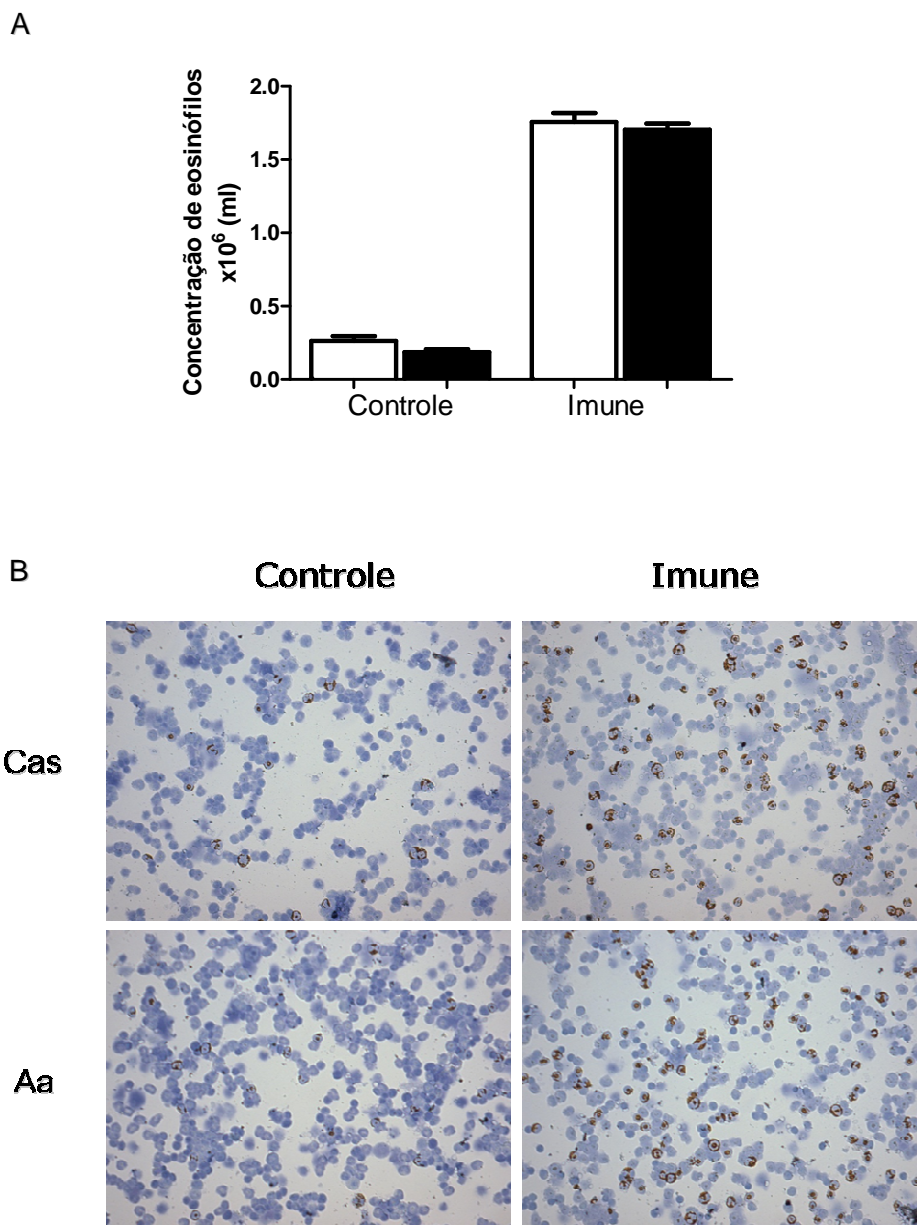


**Figura 8: Fatores relacionados à indução de alergia alimentar em camundongos BALB/c alimentados com a dieta de Cas e Aa.**

Animais com oito semanas de dieta alimentados com Cas e Aa foram submetidos aos protocolos de indução de alergia alimentar (Materiais e Métodos, protocolo 1). Os animais foram imunizados i.p. após 7 dias com 10 $\mu$ g OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 de salina, desafiados após 14 dias com 10  $\mu$ g de OVA diluídos em 0,2 de salina e após 7 dias, os animais ingeriram OVA a 20% por 7 dias consecutivos. As citocinas do sobrenadante foram mensuradas 72 horas após o início da cultura (Figura A). Os animais foram pesados antes e após da indução da alergia, a diferença foi expressa em gráfico (Figura B). O intestino delgado corado por HE foi analisado para contagem de eosinófilos da lâmina própria (Figura C). Durante os dias de indução de alergia o consumo de ração (Figura D) e o consumo de OVA (Figura E) foram determinados diariamente nos grupos Cas (■) e Aa (■). Após a indução de alergia, os animais foram sacrificados e as células do linfonodo mesentérico foram retiradas e colocadas em cultura. As barras dos animais alimentados de Cas estão representadas pela cor branca e dos Aa pela cor preta. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 5 animais por grupo. \* $p < 0,05$ ; Aa x Cas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de Student.

### **5-3 A ausência de proteínas na dieta não interfere na produção de eosinófilos da medula óssea**

Os eosinófilos são produzidos e armazenados na medula óssea e são atraídos para os tecidos como um processo reacional a inflamações, como as alergias. Durante um processo inflamatório, a produção de eosinófilos na medula óssea é aumentada (Rothenberg e Hogan 2006). Para avaliar se as proteínas da dieta poderiam interferir na produção de eosinófilos na medula óssea, avaliamos a produção destas células, através da coloração especial para peroxidase destas células (EPO), após a indução de alergia alimentar. Observamos que não houve diferença no número de eosinófilos entre os grupos imunes de Cas e Aa. (Figura 9A). A figura 9B representa uma lâmina no aumento de 400x dos grupos Cas e Aa, controle e imune. Pode ser visualizado, o aumento de eosinófilos, corados em marrom, nos grupo imune.



### Figura 9: Eosinófilos da medula óssea.

Animais com oito semanas de dieta alimentados com Cas e Aa foram submetidos aos protocolos de indução de alergia alimentar (Materiais e Métodos, protocolo 1). Os animais foram imunizados i.p. após 7 dias com  $10\mu\text{g}$  OVA+ $1\text{mg}$   $\text{Al}(\text{OH})_3$  diluídos em 0,2 de salina, desafiados após 14 dias com  $10\mu\text{g}$  de OVA diluídos em 0,2 de salina e após 7 dias, os animais ingeriram OVA a 20% por 7 dias consecutivos. Os animais do grupo controle não foram imunizados nem desafiados. Os animais foram sacrificados e a medula óssea do fêmur direito foi retirada. As células foram submetidas ao protocolo de EPO, descrito nos materiais e métodos.. As lâminas foram fotografadas no aumento de 400x e os eosinófilos foram diferenciados pela coloração marrom (Figura B). A concentração de eosinófilos nos grupos Cas e Aa são representados pela figura A. Os animais do grupo Cas são representados pelas barras brancas e animais do grupo Aa pelas barras pretas. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 5 animais por grupo. \* $p < 0,05$ : Aa x Cas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de Student.

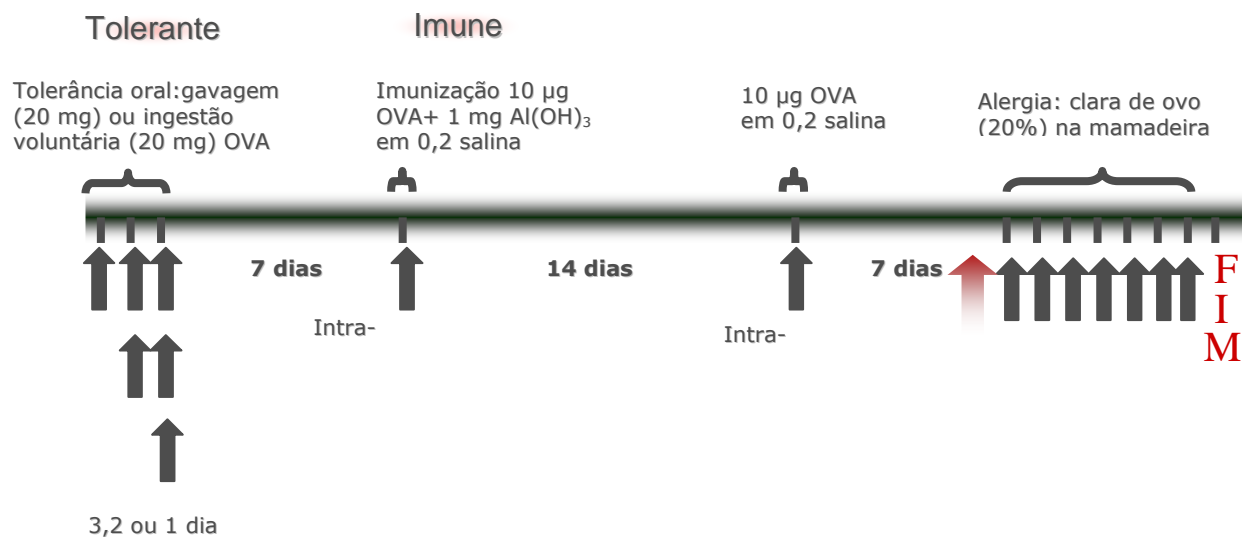


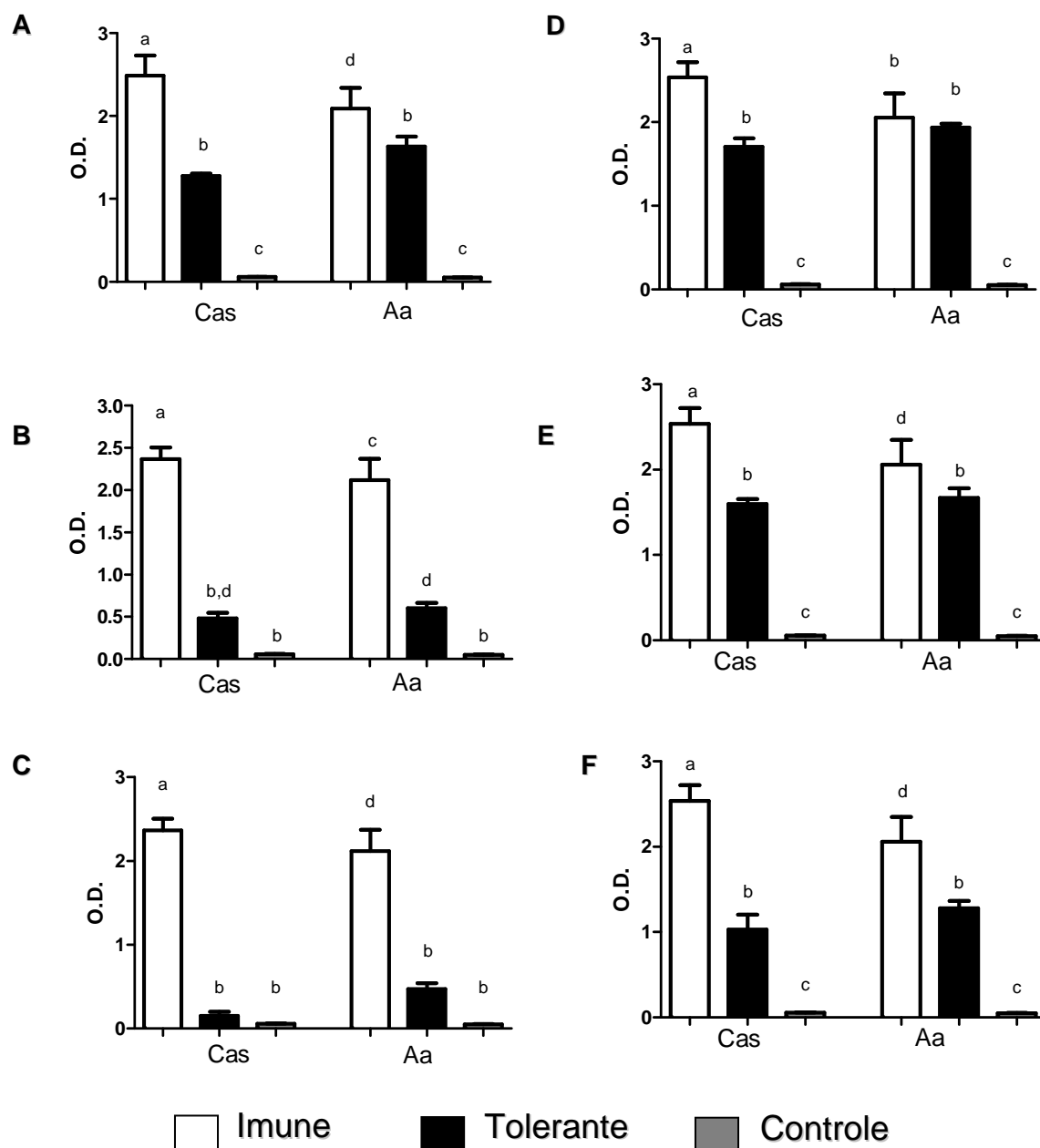
#### **5-4 As proteínas da dieta desempenham um papel importante na indução de tolerância oral.**

Para o estudo da tolerância imunológica, utilizamos diferentes protocolos (ver protocolo abaixo) com o objetivo de caracterizar a susceptibilidade dos animais Aa à tolerância oral. Os animais que foram imunizados e desafiados serão chamados de “Imune”, enquanto os animais que não foram imunizados, nem desafiados, serão chamados de “Controle”. E nos animais que foi induzida a tolerância oral antes das imunizações serão chamados de “Tolerantes”. Antes da indução de tolerância oral e alergia alimentar foi analisada a imaturidade imunológica dos animais pela produção de imunoglobulinas sérica e secretória.

Os grupos Cas ou Aa foram expostos por via oral à OVA antes da indução da alergia alimentar. Utilizamos dois protocolos para indução de tolerância oral, no primeiro, os animais foram mantidos por três, dois ou um dia em “ingestão voluntária” do antígeno (OVA) em água de beber. E no segundo, os animais receberam a OVA diretamente no estômago através de uma agulha de gavagem (com a ponta arredondada), por três, dois ou um dia. Todos os tratamentos foram feitos na semana anterior à primeira imunização. Quatorze dias após a primeira imunização foi realizado a segunda imunização (*booster*) e antes da indução de alergia alimentar foi dosado as imunoglobulinas totais anti-OVA. A redução na concentração de Ig anti-OVA nos animais tolerantes já pode ser vista com um dia de gavagem nos animais mantidos em dietas convencionais. (Santiago, 2008). No entanto, a figura 10D mostra que nos animais em que a tolerância foi induzida com apenas um dia de gavagem, o título de imunoglobulina Ig total do grupo Aa não apresentou diferença estatística em relação ao grupo imune. Já, no protocolo de ingestão voluntária três, dois ou um dia e nos protocolos de gavagem três e dois dias, todos os grupos em que a tolerância foi induzida, o título de Ig total foi menor em relação ao grupo imune (Figuras 10A,B,C,E e F). Outra observação importante é que os grupos imunes de Cas apresentam maiores títulos de Ig total que os grupos imunes de Aa e que quanto mais dias de indução de tolerância oral maior a diferença entre os grupos tolerantes e imunes (Figuras 10A-F).

**Protocolo de indução de tolerância oral**

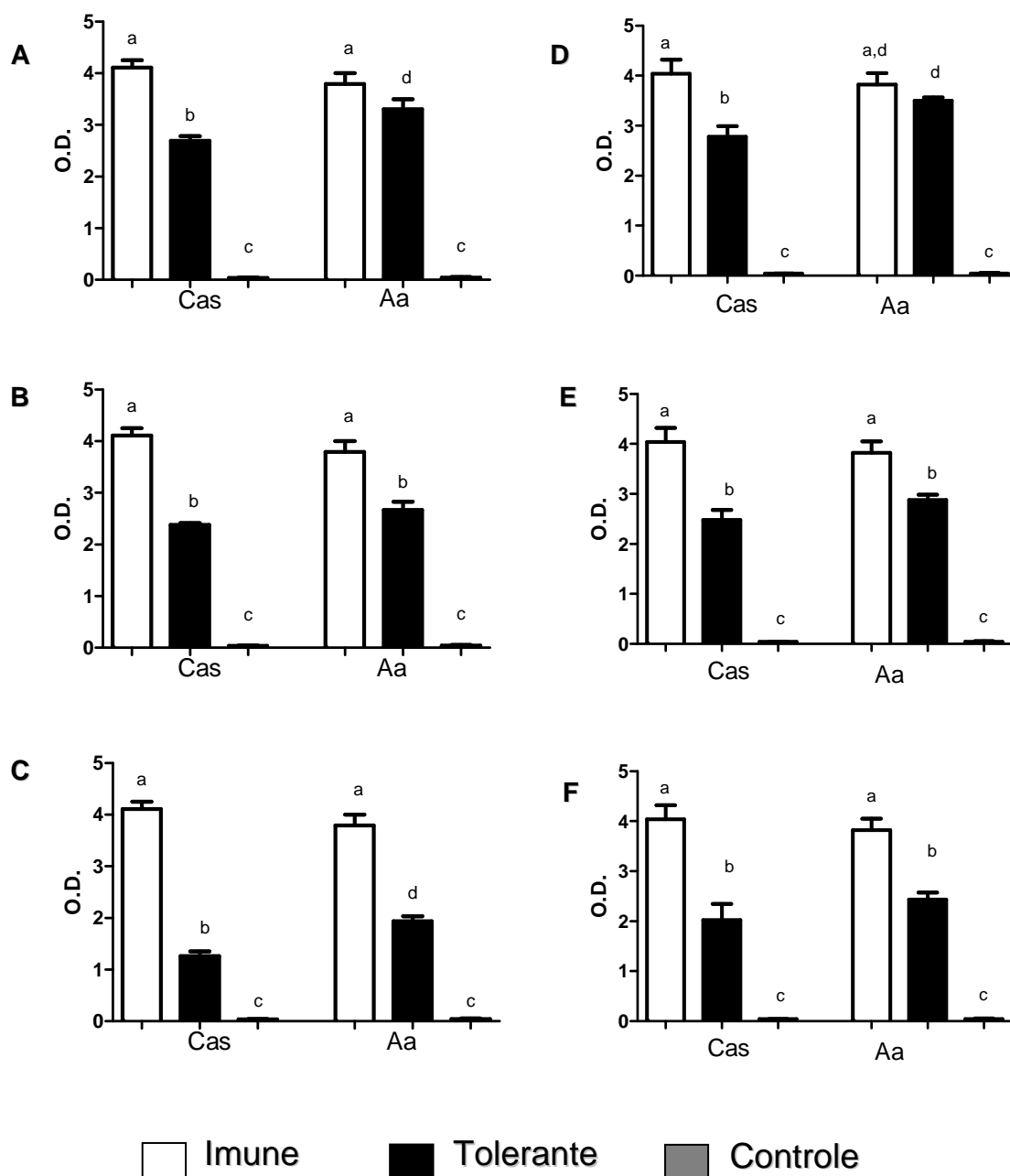




**Figura 10: Quantificação de imunoglobulinas totais séricas anti-OVA de camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral.**

Animais com oito semanas de dieta alimentados com Cas e Aa foram submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral (Materiais e Métodos, protocolo 1). Os animais foram tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária por 1, 2 ou 3 dias e imunizados i.p. após 7 dias com 10 $\mu$ g OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 de salina, desafiados após 14 dias com 10  $\mu$ g de OVA diluídos em 0,2 de salina e sangrados pelo plexo orbital 7 dias após o desafio para avaliação da tolerância. Os anticorpos séricos Ig total foram medidos por *ELISA* e os resultados expressos como média da somatória (O.D.) das absorbâncias obtidas com os soros de cada grupo. Animais “imunes” (barra branca), “tolerantes” (barra preta) e “controle” (barra cinza). As figuras A-C representam os resultados do protocolo de Ingestão Voluntária de 1, 2 ou 3 dias respectivamente e as figuras D-F representam os resultados do protocolo de Gavagem de 1, 2 ou 3 dias respectivamente. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 5 animais por grupo. As letras a,b,c,d representam a diferença estatística \*p<0,05 entre os grupos analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Tukey.

Após a indução de alergia alimentar, segundo o protocolo 1, outros parâmetros envolvendo a tolerância oral foram analisados, como: a produção de IgG1 (Figura 11), IgE (Figura 12) e IgAS (Figura 13) anti-OVA. Como descrito para Ig total, os títulos de IgG1 anti-OVA dos animais tolerantes do grupo Aa não foram diferentes em relação ao seu grupo imune, no protocolo de um dia de gavagem (Figura 11D). Em todos os outros grupos, os títulos de IgG1 anti-OVA foram menores nos grupos tolerantes que em seus grupos imunes (Figura 11A, B, C, E e F). Outra observação importante é que quanto mais dias de indução de tolerância oral maior a diferença entre os grupos tolerantes e imunes, principalmente nos grupos do protocolo de ingestão voluntária (Figura 11A-C).

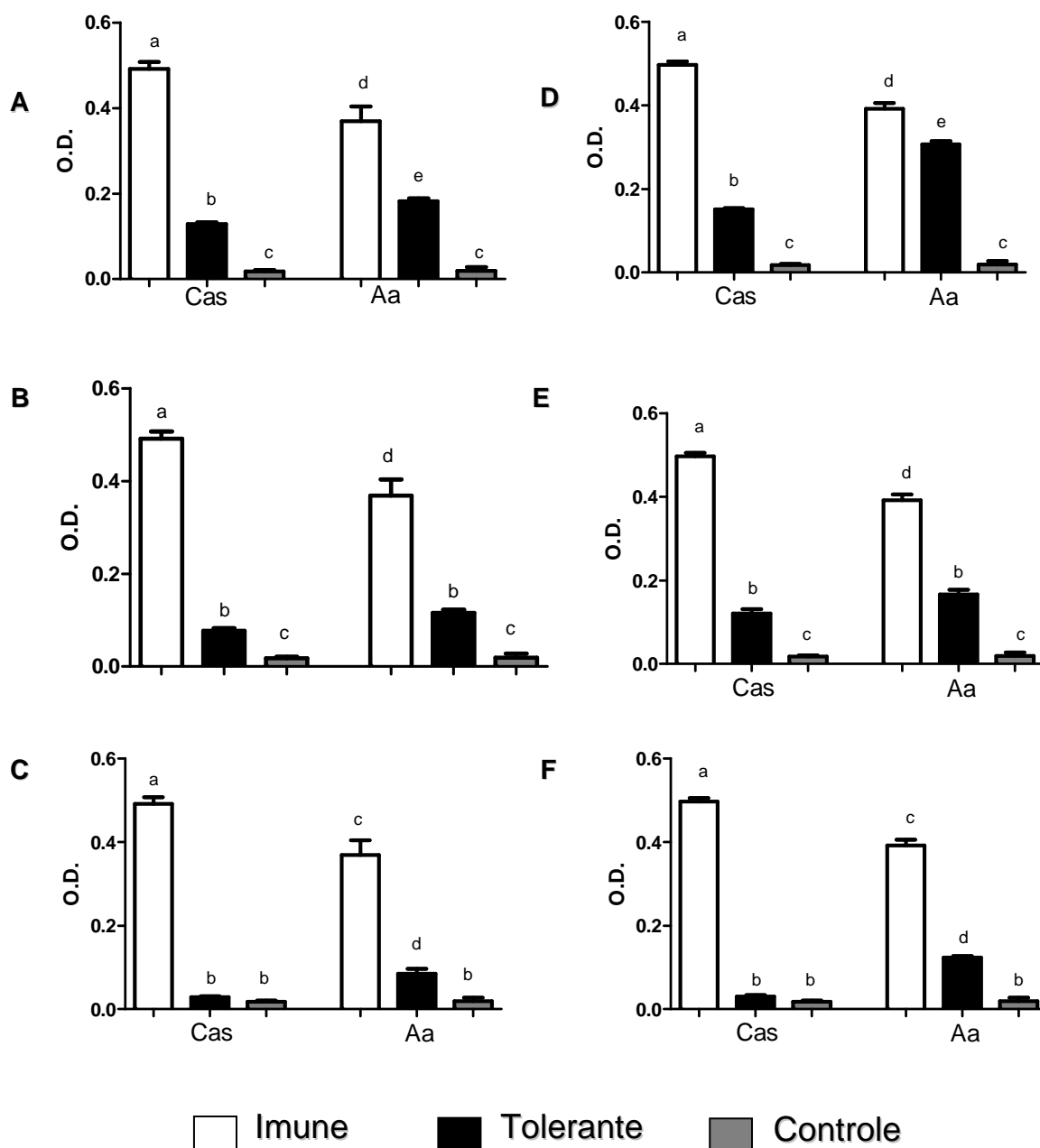


**Figura 11: Quantificação de IgG1 anti-OVA em camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar.**

Animais com oito semanas de dieta alimentados com Cas e Aa foram submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar (Materiais e Métodos, protocolo 1). Os animais foram tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária por 1, 2 ou 3 dias e imunizados i.p. após 7 dias com 10µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 de salina, desafiados após 14 dias com 10 µg de OVA diluídos em 0,2 de salina e após 7 dias, os animais ingeriram OVA a 20% por 7 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados e o sangue coletado do plexo axial. O soro foi separado e os anticorpos IgG1 anti-OVA foram medidos por *ELISA* e os resultados expressos como média da somatória (O.D.) das absorbâncias obtidas com os soros de cada grupo. Animais “imunes” (barra branca), “tolerantes” (barra preta) e “controle” (barra cinza). As figuras A-C representam os resultados do protocolo de Ingestão Voluntária de 1, 2 ou 3 dias respectivamente e as figuras D-F representam os resultados do protocolo de Gavagem de 1, 2 ou 3 dias respectivamente. Os resultados representam a média ± SD de 5 animais por grupo. As letras a,b,c,d representam a diferença estatística \*p<0,05 entre os grupos analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Tukey

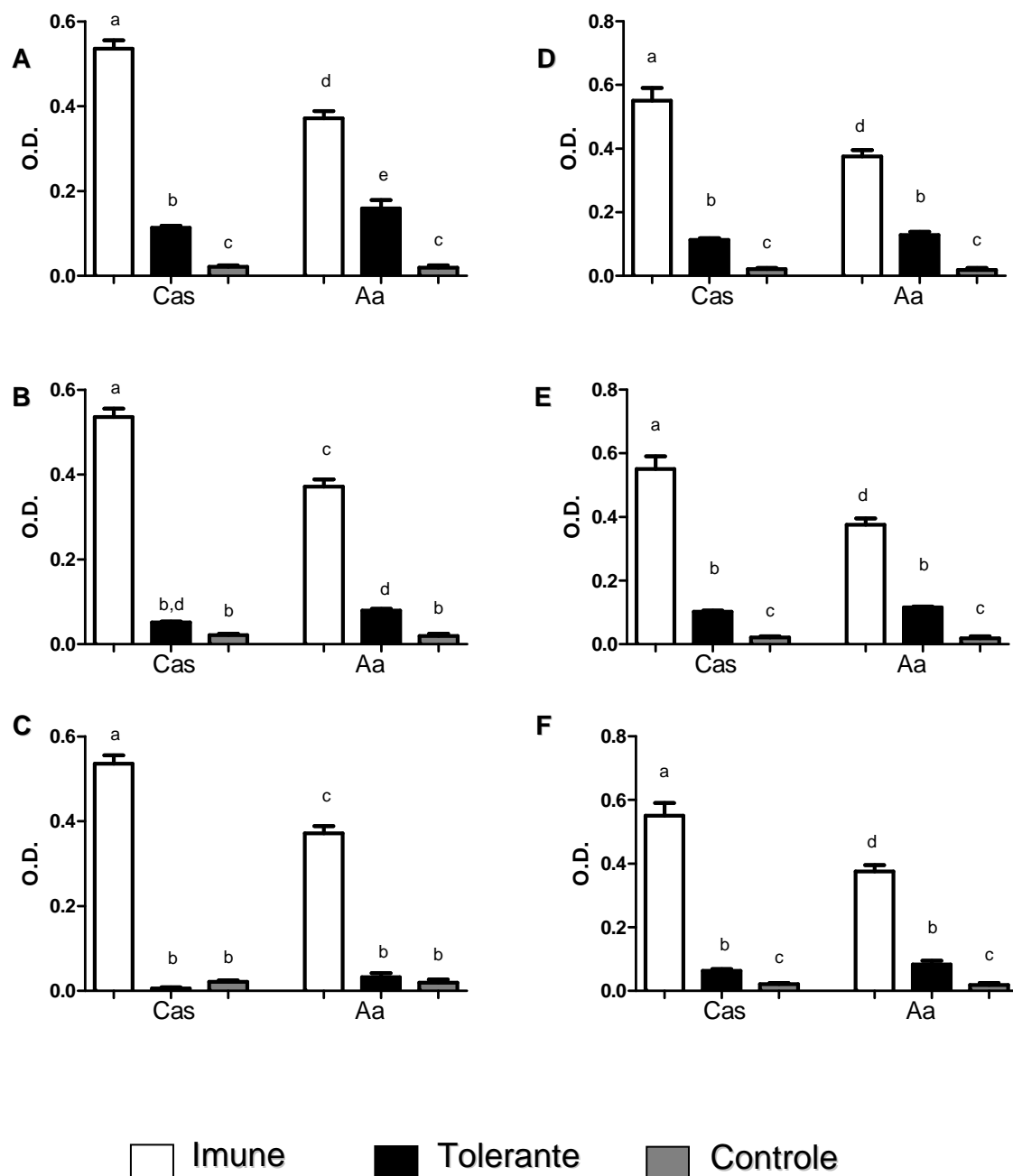
Todos os grupos tolerantes apresentaram títulos de IgE e IgAS anti-OVA menores que seus grupos imunes, nos dois protocolos (Figura 12 e 13). Outra observação importante é que os grupos imunes de Cas apresentam maiores títulos tanto de IgE quanto de IgAS em relação aos grupos imunes de Aa e que quanto mais dias de indução de tolerância oral maior a diferença entre os grupos tolerantes e imunes (Figuras 12 e 13).

Concluimos que os animais alimentados com a dieta isenta de proteínas apresentaram uma menor susceptibilidade à indução de tolerância oral.



**Figura 12: Quantificação de IgE anti-OVA em camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar.**

Animais com oito semanas de dieta alimentados com Cas e Aa foram submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar (Materiais e Métodos, protocolo 1). Os animais foram tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária por 1, 2 ou 3 dias e imunizados i.p. após 7 dias com 10 $\mu$ g OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 de salina, desafiados após 14 dias com 10  $\mu$ g de OVA diluídos em 0,2 de salina e após 7 dias, os animais ingeriram OVA a 20% por 7 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados e o sangue coletado do plexo axial. O soro foi separado e os anticorpos IgE anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média da somatória (O.D.) das absorbâncias obtidas com os soros de cada grupo. Animais “imunes” (barra branca), “tolerantes” (barra preta) e “controle” (barra cinza). As figuras A-C representam os resultados do protocolo de Ingestão Voluntária de 1, 2 ou 3 dias respectivamente e as figuras D-F representam os resultados do protocolo de Gavagem de 1, 2 ou 3 dias respectivamente. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 5 animais por grupo. As letras a,b,c,d representam a diferença estatística \* $p$ <0,05 entre os grupos analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Tukey.



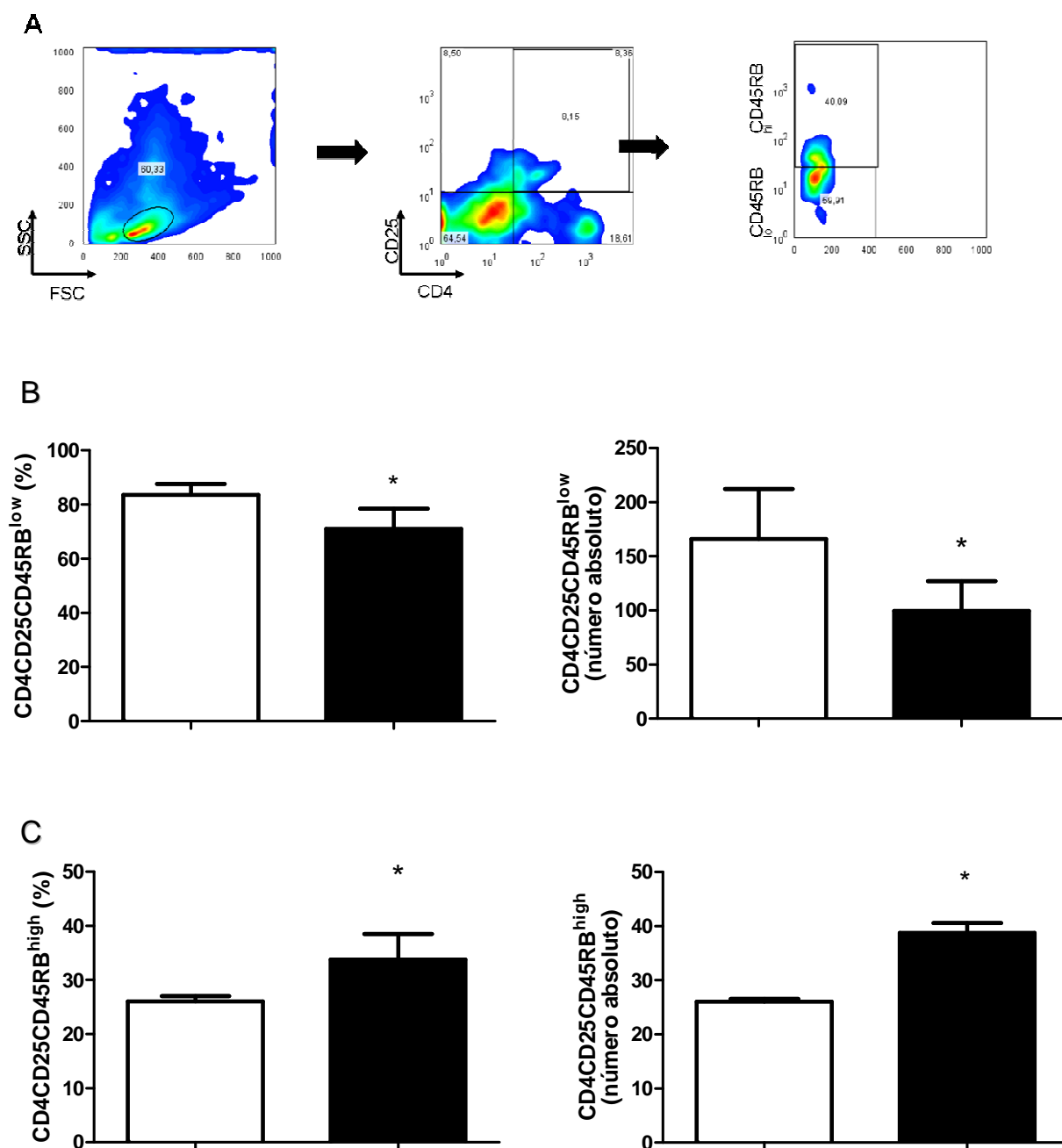
**Figura 13: Quantificação de IgAS anti-OVA em camundongos BALB/c alimentados pela dieta de Cas e Aa e submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar.**

Animais com oito semanas de dieta alimentados com Cas e Aa foram submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral e alergia alimentar (Materiais e Métodos, protocolo 1). Os animais foram tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem ou ingestão voluntária por 1, 2 ou 3 dias e imunizados i.p. após 7 dias com 10 $\mu$ g OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 de salina, desafiados após 14 dias com 10  $\mu$ g de OVA diluídos em 0,2 de salina e após 7 dias, os animais ingeriram OVA a 20% por 7 dias consecutivos. O conteúdo fecal foi coletado e os anticorpos IgAS anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média da somatória (O.D.) das absorvâncias obtidas com os soros de cada grupo. Animais “imunes” (barra branca), “tolerantes” (barra preta) e “controle” (barra cinza). As figuras A-C representam os resultados do protocolo de Ingestão Voluntária de 1, 2 ou 3 dias respectivamente e as figuras D-F representam os resultados do protocolo de Gavagem de 1, 2 ou 3 dias respectivamente. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 5 animais por grupo. As letras a,b,c,d representam a diferença estatística \*p<0,05 entre os grupos analisados estatisticamente por ANOVA e pós-teste de Tukey.



## 5-5 A ausência das proteínas na dieta interfere na ativação de células T reguladoras.

Vários subgrupos de linfócitos T com fenótipo regulador já foram descritos como importantes na indução de imunossupressão via mucosa oral, tais como: Th3, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> e CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Faria e Weiner, 2005 / Powrie, Correa-Oliveira, et al, 1994). Já que os animais que se alimentaram da dieta de Aa apresentaram um perfil imaturo e uma menor susceptibilidade de indução de tolerância oral decidimos analisar a interferência das proteínas da dieta na população de célula reguladora CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> na lâmina própria do intestino delgado. Os animais foram alimentados por oito semanas com a dieta de caseína ou com a dieta de aminoácidos. Observamos que os grupos mantidos na dieta Aa apresentam menor porcentagem e número absoluto destas células. (Figura 14B). No entanto, os animais do grupo Aa apresentaram maior porcentagem e número absoluto de células T *naïve* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> (Figura 14C). A figura 14A representa um perfil celular de tamanho x granulidade, onde foi selecionada a região correspondente à população de linfócitos. A seguir a população CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> dentro da população de linfócitos totais foi selecionada e finalmente, a população CD45RB foi identificada dentro da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.



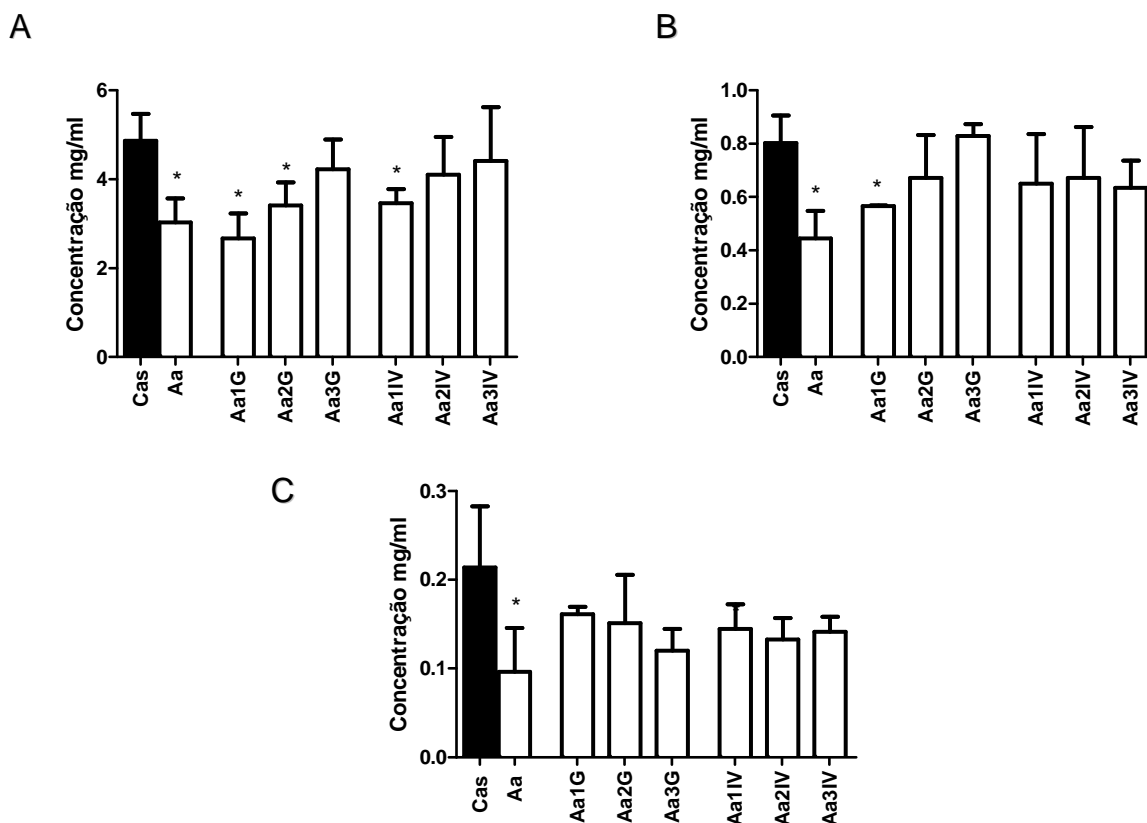
**Figura 14: Porcentagem e número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB na lâmina própria do intestino delgado de animais alimentados com as dietas de Cas e Aa.**

Os animais recém-desmamados foram alimentados com uma dieta contendo caseína como única fonte protéica - Cas (barra branca) ou com uma dieta contendo quantidades equivalentes dos aminoácidos presentes na caseína - Aa (barra preta). As células da lâmina própria foram retiradas segundo a descrição nos Materiais e Métodos e marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE respectivamente e analisados por citometria de fluxo. A figura A representa os *gates* do perfil celular analisado. A figura B demonstra a porcentagem e número absoluto da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> e a figura C demonstra a porcentagem e número absoluto da população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>. Os resultados representam a média ± SD de 5 animais por grupo. \*p<0,05: Aa x Cas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de Student.

## **5-6 O processo de indução de tolerância oral desencadeia a maturação do sistema imune nos animais do grupo Aa.**

A reintrodução da dieta de Cas por três dias nos animais que se alimentavam somente pela dieta de Aa foi capaz de restabelecer os níveis de imunoglobulinas séricas e secretória em camundongos C57BL/6 (Amaral, Foschetti, et al, 2006).

Para avaliar se durante o processo de indução de tolerância oral, o contato com a OVA seria capaz de desencadear a maturação imunológica nos animais submetidos à dieta de Aa, equiparando-os aos níveis de imunoglobulinas do grupo Cas, utilizamos os protocolos de gavagem e ingestão voluntária. Os grupos Cas ou Aa foram expostos por via oral à OVA. Os animais foram mantidos por três, dois ou um dia em “ingestão voluntária” do antígeno (OVA) em água de beber ou receberam a OVA diretamente no estômago através de uma agulha de gavagem também por três, dois ou um dia. 24 horas após cada processo de indução de tolerância, as fezes foram coletadas, os animais foram sacrificados e o sangue retirado do plexo axial. Para IgG, o título de anticorpo aumentou com o aumento nos dias de indução de tolerância. Três dias de gavagem e dois ou três dias de ingestão voluntária foram suficientes para equiparar os níveis de imunoglobulinas do grupo Aa aos do grupo Cas. (Figura 15A). Já para IgA sérica, somente um dia de gavagem não foi suficiente para restabelecer os títulos desta imunoglobulina aos níveis de Cas. (Figura 15B). Para IgAS, todos os protocolos de indução de tolerância oral, inclusive 1 dia de gavagem foram suficientes para restabelecer os níveis de imunoglobulinas do grupo Aa a níveis semelhantes ao grupo Cas (Figura 15C).



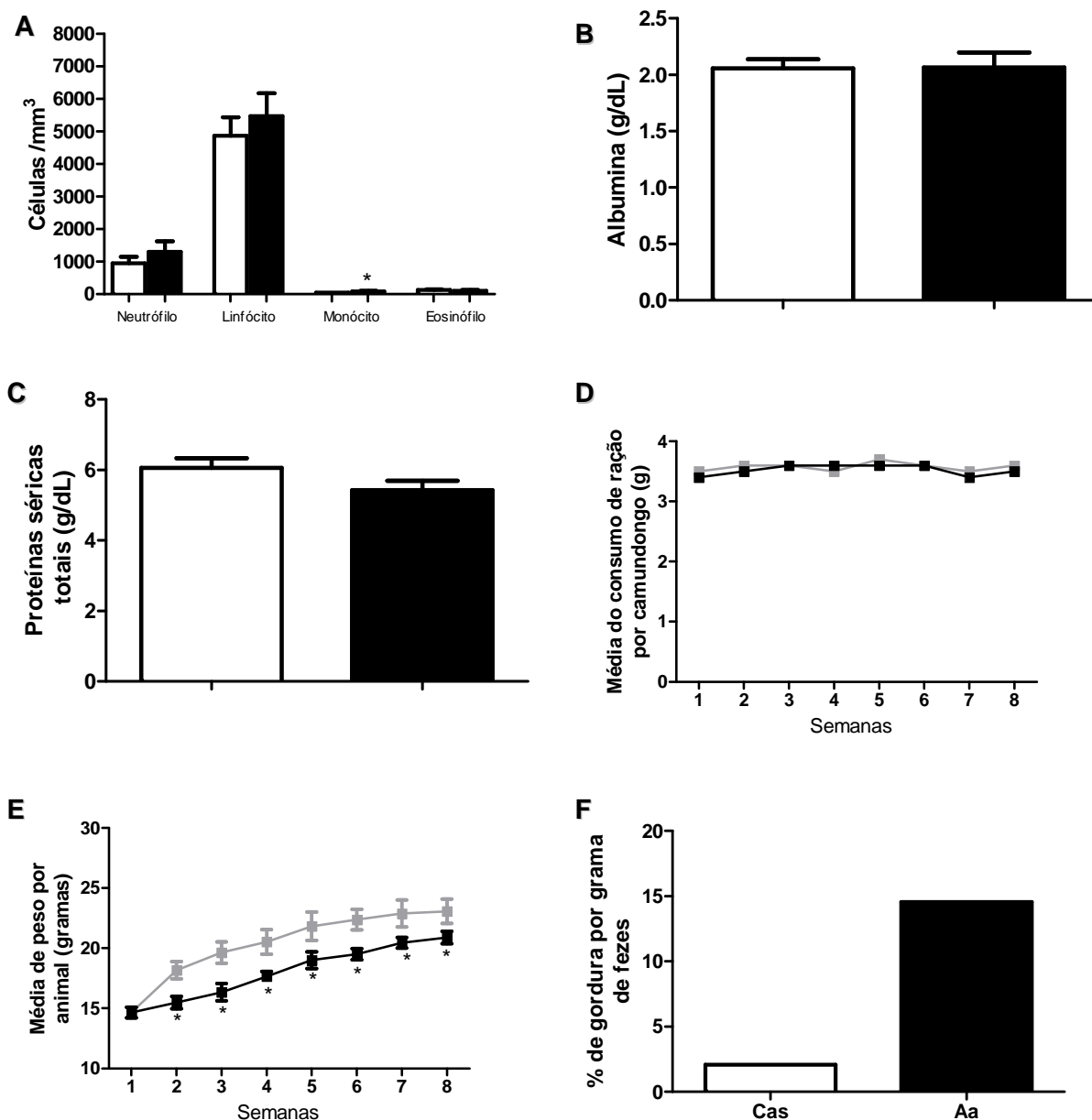
**Figura 15: Dosagem de imunoglobulinas séricas IgG e IgA e IgA secretória em camundongos submetidos a dieta de Aa após o processo de indução de tolerância oral.**

Animais com oito semanas de dieta alimentados com Aa foram submetidos aos protocolos de indução de tolerância oral. Os animais foram tratados oralmente com 20mg de OVA por gavagem (G) ou ingestão voluntária (IV) por 1, 2 ou 3 dias. Após 24 horas do processo de indução de tolerância, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado para dosagem de IgG (A) e IgA (B) séricas e as fezes foram coletadas para dosagem de IgAS (C) por *ELISA*. O grupo Cas é representado pelas barras pretas e os grupos de Aa pelas barras brancas. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 3 animais por grupo. \* $p < 0,05$ : Aa x Cas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de Student.

## **5-7 O estado nutricional dos camundongos não é afetado pela falta das proteínas da dieta**

Como este trabalho envolve a manipulação de dieta, um controle nutricional dos animais mantidos nas dietas de aminoácido (Aa) e caseína (Cas) foi realizado. Este controle se fez necessário para verificar se alterações nutricionais estariam interferindo na maturação do sistema imune.

Camundongos BALB/c recém-desmamados foram alimentados com uma dieta contendo caseína como única fonte protéica ou com uma dieta contendo quantidades equivalentes dos aminoácidos presentes na caseína. Todos os parâmetros analisados foram feitos em camundongos com doze semanas de idade. Ambos os grupos mostraram-se nutricionalmente normais como demonstrado pela contagem de células sanguíneas (Figura 16A), bem como pela concentração normal de albumina (Figura 16B), proteínas totais séricas (Figura 16C) e consumo de ração (Figura 16D). No entanto, os animais alimentados com a dieta de Aa apresentaram curva de crescimento (Figura 16E) e eliminação de gordura nas fezes (Figura 16F) reduzidas em relação aos animais alimentados com a dieta de Cas.



**Figura 16: Avaliação nutricional de camundongos BALB/c alimentados com dietas de Cas ou Aa.**

Os animais recém-desmamados foram alimentados com uma dieta contendo caseína como única fonte protéica - Cas (barra branca e linha cinza) ou com uma dieta contendo quantidades equivalentes dos aminoácidos presentes na caseína - Aa (barra e linha preta). Na figura A foi feita uma análise das células sanguíneas (neutrófilo, linfócito, monócito e eosinófilo). A concentração sérica de albumina e das proteínas totais podem ser visualizadas nas figuras B e C respectivamente. A média do consumo de ração (figura D) e o controle do peso (figura E) foram avaliados semanalmente. A figura F corresponde à eliminação de gordura pelas fezes. Os resultados representam a média  $\pm$  SD de 10 animais por grupo e para bromatologia um *pool* de 25 animais. \* $p < 0,05$ ; Aa x Cas. As análises estatísticas foram feitas pelo teste *t* de Student.

## *6-Discussão*

---

A ingestão de proteínas representa uma grande “parceria” com a atividade imunológica (Nelson Vaz, texto não publicado). A degradação de proteínas a aminoácidos no intestino desempenha um papel nutritivo essencial, mas, ao mesmo tempo, gera peptídeos importantes para a ativação do sistema imune. Camundongos em ambientes convencionais, alimentados com uma dieta de aminoácido (Aa), assim como em animais isentos de germes, representam um modelo eficiente para o estudo do papel dos antígenos naturais (microbiota e antígenos da dieta) no desenvolvimento e na maturação do sistema imune (Eberl, 2005 / Duerkop, Vaishnav, et al, 2009 / Suzuki e Fagarasan, 2008 / Jiang, Thurnheer, et al, 2004 / Menezes, Mucida, et al, 2003).

Dados descritos em animais isentos de germes relacionam a privação antigênica com a diminuição do título de imunoglobulinas (Hooijkaas, Benner, et al, 1984 / Bos, Meeuwssen, et al, 1988). Estes estudos mostraram uma diminuição na produção de IgG, IgA e IgE nesses animais (Sudo, Sawamura, et al, 1997). O mesmo ocorreu em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta de aminoácidos (Menezes, Mucida, et al, 2003). Nossos resultados estão de acordo com os anteriormente descritos, pois foi constatada uma redução significativa de imunoglobulinas séricas em camundongos BALB/c alimentados com a dieta Aa (Figura 7A). A IgM, entretanto, não apresentou diferença entre os grupos Cas e Aa, o que indica uma atividade interna e autônoma do sistema imune independente de estímulos externos.

Após o desmame e com a introdução da dieta livre é possível observar uma mudança rápida na morfologia do intestino caracterizada pelo aumento e maturação do tecido linfóide (Vega-Lopez, Bailey, et al, 1995). O desmame também é acompanhado pelo aparecimento de centros germinativos nas placas de Peyer e pelo aumento da produção de IgAS. Com a diminuição de estímulos antigênicos no GALT, incluindo lâmina própria e placas de Peyer pode haver um comprometimento na estimulação de linfócitos B, levando a uma diminuição na produção de IgAS, como visto em nossos animais (Figura 7A).

É importante ressaltar que a produção de IgAS pode ter uma contribuição de linfócitos B derivados da medula óssea (convencionais ou B-2) e de linfócitos B derivados do



omento (não convencionais ou B-1). Células B-1 diferem das tradicionais B-2 pela localização, expressão de marcadores específicos e repertório de anticorpos (Martin e Kearney, 2001). Linfócitos B-1 localizam-se na cavidade peritoneal e contribuem significativamente para produção de imunoglobulinas naturais da classe IgM. Essas células expressam altos níveis de integrinas  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  e  $\beta 1$  e CD9 que facilitam a sua adesão na matriz da cavidade peritoneal. Após a exposição a produtos bacterianos, como LPS, as células B-1 diminuem a expressão dessas moléculas e egressam da cavidade peritoneal para tecidos efetores como na lâmina própria, diferenciando-se em plasmócitos secretores de IgAS (Ha, Tsuji, et al, 2006 / Berberich, Forster, et al, 2007).

Além da deficiência na produção de imunoglobulinas como IgAS, algumas alterações na morfologia do intestino delgado de animais isentos de germes também foram descritas. Exames histológicos desses animais mostraram um estroma escasso, com poucos linfócitos e macrófagos, as placas de Peyer são menores e os vilos intestinais são mais estreitos e aparentemente mais alongados que camundongos tradicionais. (Thompson e Trexler, 1971). Em 2003, Menezes e colaboradores demonstraram que camundongos adultos C57BL/6, assim como neonatos, apresentaram um perfil dos vilos intestinais, mais alongados que animais convencionais, semelhante ao encontrado nos animais isentos de germes (Menezes, Mucida, et al, 2003). Nossos resultados demonstraram que os camundongos BALB/c alimentados com a dieta de Aa, de maneira similar, apresentaram as mesmas características (Figuras 7B e D).

Como os camundongos alimentados com a dieta Aa e os camundongos isentos de germe apresentam redução dos linfócitos da mucosa intestinal, uma possível explicação para as modificações na arquitetura dos vilos observadas nesses animais seria a redução da influência de fatores produzidos por linfócitos da mucosa intestinal. De fato, camundongos portadores de imunodeficiência combinada grave (SCID) que possuem poucos linfócitos, apresentam um perfil de alongamento do vilo similar ao padrão encontrado em animais neonatos e que se alimentaram da dieta de Aa (dados não publicados do nosso laboratório). Esses dados sugerem que a redução de linfócitos pode ser responsável por

esta alteração na estrutura dos vilos, demonstrando a estreita relação existente entre células epiteliais e linfócitos da mucosa intestinal. De fato, no nosso estudo, também observamos uma redução no número de IELs no grupo em que houve a restrição de proteínas da dieta (Figura 7C).

Os camundongos SCID formam um grupo heterogêneo de animais portadores de mutações que prejudicam o desenvolvimento normal de linfócitos T e B. Alguns dos camundongos portadores dessa imunodeficiência combinada grave (SCID) apresentam, por exemplo, mutação no gene correspondente à cadeia  $\gamma$  comum dos receptores de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Como resultado desse defeito genético, as células T apresentam falhas no seu desenvolvimento e as células B em suas funções. Esses animais também podem apresentar defeitos em enzimas que degradam nucleotídeos e o acúmulo destes são tóxicos para as células T em desenvolvimento. Outro defeito que leva a imunodeficiência combinada grave observada no fenótipo chamado de SCID inclui mutações nas enzimas de reparo do DNA (Murphy, Travers, et al, 2010).

Essas alterações morfológicas dos vilos intestinais também podem contribuir para uma menor capacidade de diferenciação das células caliciformes e, conseqüentemente, uma diminuição na produção de muco intestinal (Figuras 7E e F).

Além das alterações morfológicas intestinais observadas, a privação das proteínas da dieta poderia interferir na reatividade imune? Em 2005, Mucida e colaboradores observaram que a administração da dieta de Aa em camundongos BALB/c submetidos a um protocolo de indução de asma experimental agravou o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas juntamente com a produção aumentada de IgE e muco (Mucida, 2005). Esse resultado, o agravamento da inflamação alérgica das vias aéreas, nos levou à pergunta subsequente: o perfil Th2 observado nos camundongos alimentados com a dieta Aa (Menezes, Mucida, et al, 2003) poderia deixar esses animais mais susceptíveis ao desenvolvimento da alergia? Em estudo recente do nosso grupo, o papel das proteínas da dieta foi avaliado em um modelo de infecção por *Leishmania major*. Camundongos do grupo Aa, com um perfil imune imaturo apresentaram um aumento transitório da lesão, maior

parasitismo tecidual e menor capacidade de produção de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico. Esse trabalho mostrou, então, que a dieta de Aa se relaciona com uma diminuição da reação inflamatória. No entanto, esses resultados não estavam relacionados a um desvio da reatividade imunológica ao parasito para um padrão Th2. A produção específica de IL-4 não estava aumentada, apenas a produção de IL-10. Sugerimos, então, que a redução da imunidade protetora anti-Leishmania se relacione à imaturidade dos animais e não a um suposto desvio Th2 (Amaral, Gomes-Santos, et al, 2009).

Como seria, então, o desenvolvimento de uma resposta imune inflamatória associada à mucosa intestinal como a alergia alimentar? Em nosso modelo, observamos que a ausência das proteínas na dieta diminuiu a susceptibilidade ao desenvolvimento da alergia em relação aos animais que ingeriram Cas. Os animais imunes Cas produziram maiores quantidades de IgE e IgAS anti-OVA (Figura 12 e 13), maior secreção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ , menor consumo de ração e OVA durante os dias de indução de alergia, uma maior perda de peso e maior quantidade de eosinófilos na lâmina própria dos vilos intestinais em relação aos animais que se alimentaram de Aa (Figura 8). Estes resultados sugerem que é necessária uma maturação imunológica para desencadear uma resposta imune inflamatória frente a um antígeno. Uma explicação possível para as características apresentadas é que os animais submetidos à dieta de Aa não são tão susceptíveis à imunização quanto os animais que ingeriram a proteína íntegra, como mostrado pelos níveis de IgE e IgAS anti-OVA nos grupos imunes (Figuras 12 e 13). De um modo geral, todos os parâmetros analisados durante um processo de alergia alimentar estão reduzidos nos animais da dieta de Aa em comparação à dieta de Cas, demonstrando que esses animais não são atópicos e sim imaturos. Por outro lado, a concentração de eosinófilos na medula óssea dos animais Aa imunes, quando comparada com o grupo Cas não apresentou qualquer diferença (Figura 9). O mesmo não ocorre no local da inflamação, onde o grupo Cas apresentou maior quantidade destas células (Figura 8C). Este resultado sugere uma possível perda na capacidade de migração destas células para o sítio inflamatório.

Camundongos que se alimentaram apenas com a dieta de Aa, assim como os animais neonatos, apresentam DCs com a capacidade reduzida de expressar moléculas co-estimuladoras como CD40 e CD86 (Amaral, Gomes-Santos, et al, 2009 / Marshall-Clarke, Reen et al, 2000). A diminuição destas moléculas pode prejudicar a expansão de células T e B e a troca de isotipos das imunoglobulinas (Morein, Abusugra, et al, 2002). Esta alteração justificaria a menor produção de IgE e IgAS anti-OVA (Figuras 12 e 13) e a menor produção de citocinas dos animais imunes que se alimentaram da dieta de Aa (Figura 8A).

Uma resposta alérgica que se inicia posteriormente à sensibilização é caracterizada pela produção de citocinas tipo Th2 como IL-4, IL-13 e IL-5. Além de IL-4 promover eosinofilia indiretamente diferenciando linfócitos T *naïve* em linfócitos do tipo Th2, também ativam o endotélio vascular para a liberação de moléculas quimiotáticas (Terada, Hamano, et al, 2000). IL-5 também apresenta um fator central na expansão de eosinófilos na medula óssea e para o seu recrutamento nos locais de inflamação. Eosinófilos maduros deixam a medula óssea e são direcionados aos locais de inflamação alérgica pela ação de quimiocinas pró-inflamatórias. Eosinófilos expressam receptores para o grupo CC de quimiocinas (aqueles que contêm cisteínas adjacentes próximas a amina terminal) (Rosenberg, Phipps, et al, 2007). Várias quimiocinas CC têm sido caracterizadas como quimioatrativas para eosinófilos, incluindo RANTES e CCL3, mas somente a eotaxina é a molécula quimiotática específica para eosinófilos (Jose, Griffiths-Johnson, et al, 1994). A identificação destas moléculas quimiotáticas não foi realizada em nossos experimentos, no entanto, dados preliminares do nosso laboratório mostraram uma diminuição na expressão de moléculas de adesão no endotélio do intestino, como V-CAM e ICAM-1 nos animais que se alimentaram da dieta de Aa( dados não publicados). Estes dados podem justificar uma menor população de eosinófilos no local da inflamação.

Animais isentos de germes apresentam a microvasculatura dos vilos intestinais reduzidos em relação aos animais com microbiota (Stappenbeck, Hooper, et al, 2002), demonstrando que a ausência destes antígenos pode prejudicar inclusive a circulação normal de células para estas regiões. A ausência das proteínas da dieta também poderia interferir

neste processo de formação de vasos, prejudicando a migração de células para o local da inflamação. Experimentos que identificam tal acontecimento não foram realizados.

Em nossos estudos, observamos que a ingestão de proteínas inteiras pode ser um fator que resulta no aumento da susceptibilidade à indução de tolerância oral. Verificamos que os animais que não ingerem proteínas após a amamentação, embora ainda aptos à indução da tolerância via mucosas, têm essa capacidade reduzida em relação aos animais que ingerem proteínas inteiras. Notamos uma resistência à indução de tolerância oral pelo protocolo de um dia de gavagem no que diz respeito ao isotipo Ig total e IgG1 nos animais mantidos na dieta de Aa (Figuras 10 e 11). No entanto, imunoglobulinas antígeno-específico das subclasses IgE e IgAS estão suprimidas nesses animais, quando submetidos a todos os protocolos de indução de tolerância oral, inclusive em um dia de gavagem (Figuras 12 e 13).

Nossos resultados estão em concordância com trabalhos realizados em animais isentos de germes em que o isotipo IgG é pouco passível de supressão e a capacidade de inibição de IgE se assemelha aos animais convencionais (Moreau e Gaboriau-Routhiau 1996). A ingestão voluntária é o protocolo ideal de indução de tolerância oral, capaz de induzi-la até mesmo em animais idosos, menos susceptíveis a sua indução. Já o protocolo sub-ótimo como um dia de gavagem não é suficiente para este feito (Faria, Garcia, et al, 1993). Quanto mais dias de indução de tolerância oral, maior a diferença entre os grupos imunes e tolerantes, cuja maior diferença foi sempre visualizada com três dias de ingestão voluntária. Vários trabalhos relatam resultados semelhantes ao nosso, nos quais a administração oral do antígeno por ingestão voluntária se mostra mais eficiente que a gavagem (Peng, Turner, et al, 1989). A ingestão voluntária é um processo no qual há uma maior frequência do contato do antígeno com o intestino, semelhante ao que ocorre na alimentação diária. De acordo com Faria e colaboradores em 1998, a diferença encontrada nos dois modelos de administração oral do antígeno se deve ao seu processamento e apresentação por APCs da mucosa. Estas têm sido diretamente relacionadas ao desenvolvimento da tolerância, tanto nasal quanto oral. DCs presentes nos linfonodos mesentéricos produzem altas concentrações de TGF- $\beta$  e são capazes de induzir células T

CD4 produtoras de TGF- $\beta$  (características das Treg TH3) (Akbari, DeKruyff, et al, 2001). Quando uma alta dose de antígeno protéico alcança de uma vez o GALT, provavelmente todas as APCs são recrutadas para processar e apresentar o antígeno, entretanto se a mesma quantidade de antígeno protéico for gradualmente administrada em pequenas doses, apenas as APCs mais eficientes (DCs) serão mobilizadas. Esta apresentação diferenciada pode levar a diferentes formas de ativação de células T, resultando num perfil de produção de citocinas distinto. Na ingestão voluntária, o antígeno é administrado em doses pequenas e contínuas, o que levaria a uma maior exposição às enzimas digestivas presentes no lúmen intestinal; por gavagem, essa exposição seria menor, já que o antígeno chega ao lúmen em grande quantidade de uma só vez. O resultado desse maior processamento luminal do antígeno pode gerar um maior número de epitopos expostos e um menor requerimento do processamento do mesmo por APCs no intestino com conseqüentes diferenças na resposta de células T (Faria, Ficker, et al, 1998).

Vários mecanismos são propostos para explicar a tolerância via mucosas, entre eles estão a anergia e a deleção dos linfócitos T (Weiner, Friedman, et al, 1994), que representam mecanismos passivos e regulação ativa por células Tregs (Zhang, Izikson, et al, 2001). Algumas teorias propõem mecanismos “negativos” para a indução de tolerância oral (deleção, a anergia e ignorância). Atualmente, células Tregs com fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> têm sido associadas ao mecanismo ativo de indução de tolerância via mucosas (Hauet-Broere, Unger, et al, 2003 / Unger, Hauet-Broere, et al, 2003). Como os animais que se alimentaram da dieta de Aa apresentaram uma capacidade reduzida para indução de tolerância oral, decidimos analisar células reguladoras com o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>. O CD45RB é uma fosfatase expressa em altos níveis na superfície de linfócitos virgens. A expressão de CD45RB diminui após a ativação dos linfócitos T. Células com baixa expressão desta molécula (CD45RB<sup>low</sup>) são reconhecidas como células de memória, alguns trabalhos, entretanto, apontam nestas células propriedades reguladoras (Lee e Vetetta, 1990), sendo essa sub-população de Tregs indispensáveis para o controle de colite (Powrie, Leach, et al, 1993 / Alyanakian, You, et al, 2003). O desenvolvimento de colite experimental

em camundongos pode ser induzido após a transferência de células T CD4 *naïve* expressando altos níveis de CD45RB (CD45RB<sup>high</sup>) (Morrissey, Charrier, et al, 1993 / Powrie, Correa-Oliveira, et al, 1994). A indução de colite pode ser evitada pela transferência concomitante de células que expressam CD45RB<sup>low</sup>. De acordo com nossos resultados, a ausência de estímulos pelas proteínas da dieta diminuiu a capacidade das células T em se diferenciarem em células com perfil regulador. Os animais do grupo Aa apresentaram uma diminuição de células com perfil regulador e uma maior expressão de células T CD4 *naïve* (Figura 14), evidenciando, assim, a necessidade de estímulos protéicos na diferenciação de células importantes para o desenvolvimento de tolerância oral. Camundongos neonatos também apresentam imunidade mediada por células T *naïve* (Niers, Stasse-Wolthuis, et al, 2007).

Como o aumento nos dias de ingestão do antígeno resultou em uma maior eficiência na tolerância, esses três dias de contato com a OVA seriam suficientes para desencadear o amadurecimento imunológico destes animais? De acordo com Amaral, o contato oral com uma proteína por três dias consecutivos pode resultar em uma maturação do sistema imune no grupo Aa ou aproximação em relação ao grupo Cas (Amaral, Foschetti, et al, 2006). Por isso, investigamos parâmetros que indicam a maturidade imunológica destes animais, como as imunoglobulinas. Para IgG, o título de anticorpo se elevou com o aumento dos dias de indução de tolerância. Em três dias de gavagem e dois e três dias de ingestão voluntária foram suficientes para equiparar com os níveis de imunoglobulinas do grupo Cas. Para IgA sérica, somente um dia de gavagem não foi suficiente para restabelecer os títulos desta imunoglobulina aos níveis de Cas. E para IgAS, todos os protocolos de indução de tolerância oral, inclusive um dia de gavagem, já foram suficientes para restabelecer os níveis de imunoglobulinas aos níveis de Cas (Figura 16). Este resultado nos leva a pensar que diferentes isotipos de imunoglobulinas requerem diferentes quantidades de antígenos para serem produzidos, mostrando uma hierarquia na troca de classes de isotipos.

A imaturidade imunológica não influenciou em parâmetros nutricionais gerais. Os camundongos BALB/c alimentados com a dieta de Aa apresentaram parâmetros nutricionais

normais, demonstrando que esses animais podem constituir um modelo para o estudo da influência seletiva das proteínas da dieta no sistema imune. Como observado na Figura 16, os animais do grupo Aa apresentaram concentrações de albumina e proteínas séricas normais, células sanguíneas sem diferenças significativas em relação ao grupo Cas e consumo de ração igual aos animais mantidos na dieta de Cas. Apesar de o grupo Aa apresentar uma curva de crescimento com um grama e meio de diferença em relação ao grupo Cas, esta curva foi crescente. Uma diferença notável em relação aos grupos foi a eliminação de gordura pelas fezes. Os animais que se alimentaram da dieta de Aa apresentaram uma eliminação de gordura mais marcante que o grupo de Cas, o que explica a alteração da curva de crescimento dos animais do grupo Aa. Esta perda de gordura pelas fezes pode ser justificada pela saturação dos aminoácidos no lúmen intestinal e sua conseqüente interação com lipídios, impedindo uma absorção adequada. A absorção dos produtos da digestão protéica, Aa, di e tripeptídeos ocorrem por processos complementares, podendo ser transportados através de transferência passiva por difusão simples ou facilitada e transferência ativa por co-transporte (Hirst, 1993). Alguns aminoácidos livres competem pelo mesmo carreador de aminoácidos, inibindo a absorção de um ou de outro (Frenhani e Burini, 1999). Além disso, aminoácidos básicos em excesso no lúmen podem interagir com ácidos graxos, desencadeando uma reação de saponificação que prejudicaria a absorção, justificando uma maior liberação destes lipídios pelas fezes.

Assim sendo, outros componentes como os lipídeos, por exemplo, podem exercer funções importantes no desenvolvimento de respostas imunológicas. Dentre os lipídeos destacam-se os ácidos graxos poliinsaturados que apresentam os seus efeitos imunorreguladores ao alterar a organização da bicamada lipídica, modificando a sinalização celular e conseqüentemente a expressão de genes. Podem estar relacionados com a produção de citocinas, proliferação de linfócitos, expressão de moléculas de superfície, como o MHC, fagocitose e apoptose. Os ácidos graxos poliinsaturados também estão envolvidos no metabolismo de eicosanóides. (Stulnig, 2003 / Nakamura, Cheon, et al, 2004 / Benatti, Peluso, et al, 2004 / Yaqoob, 2003).



Vitaminas lipossolúveis também apresentam relações com as atividades do sistema imune. Dentre elas, destacam-se os metabólitos das vitaminas D e A. O calcitriol, metabólito ativo da vitamina D, modula a proliferação celular, regulando a produção de citocinas e imunoglobulinas e atua na diferenciação de precursores de monócitos (Mora, Iwata, et al, 2008). O ácido retinóico, metabólito da vitamina A, desempenha um importante papel na regulação da resposta imune. Células T CD4<sup>+</sup> cultivadas *in vitro* com ácido retinóico, TGF- $\beta$  e IL-6 se diferenciam em células Tregs foxp3<sup>+</sup>, bloqueando a indução de células pró-inflamatórias Th17 (Mucida, et al, 2007 / Ivanov, et al, 2006). Não somente as proteínas, mas outros componentes da dieta certamente apresentam funções importantes no direcionamento de respostas imunes.

Com o nosso trabalho podemos concluir que a ingestão de uma dieta com proteínas íntegras, além de ser importante para a maturação do sistema imune, também interfere na susceptibilidade à indução de tolerância oral e no desenvolvimento de respostas imunes inflamatórias como a alergia alimentar. Isto mostra uma complexidade do sistema imune, altamente modulado por antígenos naturais da mucosa intestinal, como a microbiota e antígenos da dieta.

## *7- Conclusão*

---

- As interações com antígenos da dieta são necessárias para a maturação do sistema imune.
- A imaturidade imunológica gerada pela ausência de proteínas íntegras influencia tanto na atividade inflamatória quanto na atividade imunoreguladora.
- O desenvolvimento da alergia alimentar parece depender destas interações, pois a ausência das proteínas da dieta diminui a resposta alérgica.
- Os animais imaturos, que não ingerem proteínas íntegras da dieta apresentam uma eficiência reduzida na indução de tolerância oral.
- Portanto, não somente a microbiota, mas também outros antígenos não patogênicos que entram em contato com o corpo diariamente, como os das proteínas dieta, são provavelmente importantes para a maturação, ativação e migração das células do sistema imune.

## *8- Referências Bibliográficas*

---

- Afuwape, A. O., M. W. Turner, et al. (2004). "Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent." Clin Exp Immunol **136**(1): 40-48.
- Akbari, O., R. H. DeKruyff, et al. (2001). "Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen." Nat Immunol **2**(8): 725-731.
- Alyanakian, M. A., S. You, et al. (2003). "Diversity of regulatory CD4+T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15806-15811.
- Amaral, J.F. (2006). "O papel das proteínas da dieta na maturação do sistema imune após o desmame e na infecção experimental por *Leishmania major*". Departamento de Bioquímica e Imunologia - UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais. Tese de doutorado.
- Amaral, J. F., A. C. Gomes-Santos, et al. (2009). "Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice." Immunology.
- Amaral, J. F., D. A. Foschetti, et al. (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.
- Baatjes, A. J., R. Sehmi, et al. (2002). "Anti-allergic therapies: effects on eosinophil progenitors." Pharmacol Ther **95**(1): 63-72.
- Bashir, M. E., S. Louie, et al. (2004). "Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy." J Immunol **172**(11): 6978-6987.
- Benatti, P., G. Peluso, et al. (2004). "Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties." J Am Coll Nutr **23**(4): 281-302.
- Berberich, S., R. Forster, et al. (2007). "The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine." Blood **109**(11): 4627-4634.
- Bos, N. A., C. G. Meeuwse, et al. (1988). "The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes." Cell Immunol **112**(2): 371-380.
- Brandtzaeg, P. (1998). "Development and basic mechanisms of human gut immunity." Nutr Rev **56**(1 Pt 2): S5-18.
- Brandtzaeg, P. and R. Pabst (2004). "Let's go mucosal: communication on slippery ground." Trends Immunol **25**(11): 570-577.
- Burks, A. W., S. Laubach, et al. (2008). "Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment." J Allergy Clin Immunol **121**(6): 1344-1350.
- Cepek, K.L., Shaw, S.K., et al. (1994). "Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin." Nature **372** (6502): 190-193
- Cehade, M. e L. Mayer (2005). "Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 3-12; quiz 13.

- Cheroutre, H. (2004). "Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells." Annu Rev Immunol **22**: 217-246
- Chung, Y., S. H. Lee, et al. (2005). "Complementary role of CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in oral tolerance." J Leukoc Biol **77**(6): 906-913.
- Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, et al. (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." J Exp Med **204**(8): 1757-1764.
- Corr, S. C., C. C. Gahan, et al. (2008). "M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis." FEMS Immunol Med Microbiol **52**(1): 2-12.
- Crivellato, E., A. Vacca, et al. (2004). "Setting the stage: an anatomist's view of the immune system." Trends Immunol **25**(4): 210-217.
- Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, et al. (2004). "CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion." J Immunol **173**(12): 7259-7268.
- Eberl, G. (2005). "Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway?" Nat Rev Immunol **5**(5): 413-420.
- Duerkop, B. A., S. Vaishnava, et al. (2009). "Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface." Immunity **31**(3): 368-376.
- Erickson, R. H. and Y. S. Kim (1990). "Digestion and absorption of dietary protein." Annu Rev Med **41**: 133-139.
- Fahrer, A. M., Y. Konigshofer, et al. (2001). "Attributes of gammadelta intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10261-10266.
- Fagarasan, S., K. Kinoshita, et al. (2001). "In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria." Nature **413**(6856): 639-643.
- Fagarasan, S., M. Muramatsu, et al. (2002). "Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora." Science **298**(5597): 1424-1427
- Faria, A. M., G. Garcia, et al. (1993). "Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization." Immunology **78**(1): 147-151.
- Faria, A. M. e H. L. Weiner (2005). "Oral tolerance." Immunol Rev **206**: 232-259.
- Faria, A. M., R. Maron, et al. (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., S. M. Ficker, et al. (1998). "Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance." Braz J Med Biol Res **31**(1): 35-48.
- Faquim-Mauro, E. L. and M. S. Macedo (2000). "Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants." Int Immunol **12**(12): 1733-1740.

- Ferguson, A. and D. Murray (1971). "Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum." Gut **12**(12): 988-994.
- Fowler, S. and F. Powrie (2002). "CTLA-4 expression on antigen-specific cells but not IL-10 secretion is required for oral tolerance." Eur J Immunol **32**(10): 2997-3006.
- Frenhani, P.B. e R.C, Burini (1999). "Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. Controle e implicações na dietoterapia humana." Arq Gastroenterol **36**(4): 227-237.
- Gaspar Elsas, M. I., E. S. Maximiano, et al. (2000). "Upregulation by glucocorticoids of responses to eosinopoietic cytokines in bone-marrow from normal and allergic mice." Br J Pharmacol **129**(8): 1543-1552.
- Griffiths-Johnson, D. A., P. D. Collins, et al. (1993). "The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo." Biochem Biophys Res Commun **197**(3): 1167-1172.
- Guarner, F. e J. R. Malagelada (2003). "Gut flora in health and disease." Lancet **361**(9356): 512-519.
- Guy, B. (2007). "The perfect mix: recent progress in adjuvant research." Nat Rev Microbiol **5**(7): 505-517.
- Ha, S. A., M. Tsuji, et al. (2006). "Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors." J Exp Med **203**(11): 2541-2550.
- Hamada, H., T. Hiroi, et al. (2002). "Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine." J Immunol **168**(1): 57-64.
- Hanson, D. G., N. M. Vaz, et al. (1979). "Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies." J Immunol **123**(5): 2337-2343.
- Hauet-Broere, F., W. W. Unger, et al. (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.
- Hayday, A., E. Theodoridis, et al. (2001). "Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology." Nat Immunol **2**(11): 997-1003.
- Hirst, B. H. (1993). "Dietary regulation of intestinal nutrient carriers." Proc Nutr Soc **52**(2): 315-324
- Hooijkaas, H., R. Benner, et al. (1984). "Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet." Eur J Immunol **14**(12): 1127-1130.
- Hooper, L. V. e J. I. Gordon (2001). "Commensal host-bacterial relationships in the gut." Science **292**(5519): 1115-1118.
- Isolauri, E. (2004). "Dietary modification of atopic disease: Use of probiotics in the prevention of atopic dermatitis." Curr Allergy Asthma Rep **4**(4): 270-275.

- Ivanov, II, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-1133.
- Jiang, H. Q., M. C. Thurnheer, et al. (2004). "Interactions of commensal gut microbes with subsets of B- and T-cells in the murine host." Vaccine **22**(7): 805-811.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2001). "Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells." Trends Immunol **22**(7): 394-400.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-1222.
- Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, et al. (1994). "Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation." J Exp Med **179**(3): 881-887.
- Kalliomaki, M., S. Salminen, et al. (2001). "Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **357**(9262): 1076-1079.
- Kay, R. A. e A. Ferguson (1989). "The immunological consequences of feeding cholera toxin. I. Feeding cholera toxin suppresses the induction of systemic delayed-type hypersensitivity but not humoral immunity." Immunology **66**(3): 410-415.
- Knippels, L. M., A. H. Penninks, et al. (1999). "Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin." Food Chem Toxicol **37**(8): 881-888.
- Kraehenbuhl, J. P. and M. R. Neutra (2000). "Epithelial M cells: differentiation and function." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 301-332.
- Kunisawa, J. e H. Kiyono (2005). "A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense." Cell Mol Life Sci **62**(12): 1308-1321.
- Kunisawa, J., I. Takahashi, et al. (2007). "Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine." Immunol Rev **215**: 136-153.
- Lee, W. T. e E. S. Vitetta (1990). "Limiting dilution analysis of CD45Rhi and CD45Rlo T cells: further evidence that CD45Rlo cells are memory cells." Cell Immunol **130**(2): 459-471.
- Lefrancois, L. and L. Puddington (2006). "Intestinal and pulmonary mucosal T cells: local heroes fight to maintain the status quo." Annu Rev Immunol **24**: 681-704.
- Leung, D. Y. (1998). "Molecular basis of allergic diseases." Mol Genet Metab **63**(3): 157-167.
- Maassen, C. B., C. van Holten-Neelen, et al. (2000). "Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains." Vaccine **18**(23): 2613-2623.
- Macpherson, A. J. and N. L. Harris (2004). "Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system." Nat Rev Immunol **4**(6): 478-485.
- Macpherson, A. J., K. D. McCoy, et al. (2008). "The immune geography of IgA induction and function." Mucosal Immunol **1**(1): 11-22.



- Maloney, J. M., H. A. Sampson, et al. (2006). "Food allergy and the introduction of solid foods to infants: a consensus document." Ann Allergy Asthma Immunol **97**(4): 559-560; author reply 561-552.
- Mansueto, P., G. Montalto, et al. (2006). "Food allergy in gastroenterologic diseases: Review of literature." World J Gastroenterol **12**(48): 7744-7752.
- Martin, F. and J. F. Kearney (2001). "B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets." Curr Opin Immunol **13**(2): 195-201.
- Murphy, K., Travers, P., et al. (2010). "Imunobiologia de Janeway". 7ed. - Porto Alegre: Artmed: 795-799.
- Marshall-Clarke, S., D. Reen, et al. (2000). "Neonatal immunity: how well has it grown up?" Immunol Today **21**(1): 35-41.
- Menezes, J. S., D. S. Mucida, et al. (2003). "Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system." Int Immunol **15**(3): 447-455.
- Mestecky, J. (1987). "The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions." J Clin Immunol **7**(4): 265-276.
- Moog, F. (1981). "The lining of the small intestine." Sci Am **245**(5): 154-158, 160, 162 et passiom.
- Mora, J. R., M. Iwata, et al. (2008). "Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage." Nat Rev Immunol.
- Moreau, M. C. and V. Gaboriau-Routhiau (1996). "The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice." Res Immunol **147**(1): 49-59.
- Morein, B., I. Abusugra, et al. (2002). "Immunity in neonates." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 207-213.
- Morrissey, P. J., K. Charrier, et al. (1993). "CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells." J Exp Med **178**(1): 237-244.
- Mowat, A. M. (1999). "Basic mechanisms and clinical implications of oral tolerance." Curr Opin Gastroenterol **15**(6): 546-556.
- Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-341.
- Mowat, A. M., L. A. Parker, et al. (2004). "Oral tolerance: overview and historical perspectives." Ann N Y Acad Sci **1029**: 1-8.
- Mowat, A. M., M. Steel, et al. (1996). "Inactivation of Th1 and Th2 cells by feeding ovalbumin." Ann N Y Acad Sci **778**: 122-132.
- Mowat, A. M., S. Strobel, et al. (1982). "Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide." Immunology **45**(1): 105-113.

- Mucida, D.S. (2005). "O sistema imune na diversidade interna e externa". Departamento de Imunologia - USP, São Paulo, São Paulo. Tese de doutorado.
- Mucida, D., N. Kutchukhidze, et al. (2005). "Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs." J Clin Invest **115**(7): 1923-1933.
- Mucida, D. e H. Cheroutre (2007). "TGFbeta and retinoic acid intersect in immune-regulation." Cell Adh Migr **1**(3): 142-144.
- Mucida, D., Y. Park, et al. (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." Science **317**(5835): 256-260.
- Nakamura, K., A. Kitani, et al. (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." J Exp Med **194**(5): 629-644.
- Nakamura, M. T., Y. Cheon, et al. (2004). "Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids." Lipids **39**(11): 1077-1083.
- Neutra, M. R., A. Frey, et al. (1996). "Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization." Cell **86**(3): 345-348.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis, et al. (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." Nat Immunol **2**(11): 1004-1009.
- Newberry, R. D. e R. G. Lorenz (2005). "Organizing a mucosal defense." Immunol Rev **206**: 6-21.
- 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.
- Niers, L., M. Stasse-Wolthuis, et al. (2007). "Nutritional support for the infant's immune system." Nutr Rev **65**(8 Pt 1): 347-360.
- Niess, J. H. and H. C. Reinecker (2006). "Dendritic cells: the commanders-in-chief of mucosal immune defenses." Curr Opin Gastroenterol **22**(4): 354-360.
- Novak, N., J. Haberstick, et al. (2008). The immune privilege of the oral mucosa. Trends Mol Med. **14**: 191-198.
- Ogawa, Y. e J. A. Grant (2007). "Mediators of anaphylaxis." Immunol Allergy Clin North Am **27**(2): 249-260, vii.
- Owen, R. L. (1999). "Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches--a personal and historical perspective." Semin Immunol **11**(3): 157-163.
- Peng, H. J., M. W. Turner, et al. (1989). "The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration." Immunology **67**(3): 425-430.
- Pilegaard, K. e C. Madsen (2004). "An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation." Toxicology **196**(3): 247-257.

- Powrie, F., R. Correa-Oliveira, et al. (1994). "Regulatory interactions between CD45RB<sup>high</sup> and CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity." J Exp Med **179**(2): 589-600.
- Powrie, F., M. W. Leach, et al. (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." Int Immunol **5**(11): 1461-1471.
- Prioult, G. e C. Nagler-Anderson (2005). "Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation?" Immunol Rev **206**: 204-218.
- Ramiro-Puig, E., F. J. Perez-Cano, et al. (2008). "[The bowel: a key component of the immune system]." Rev Esp Enferm Dig **100**(1): 29-34.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." J Nutr **123**(11): 1939-1951.
- Rescigno, M., M. Urbano, et al. (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." Nat Immunol **2**(4): 361-367.
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." Immunol Rev **212**: 28-50.
- Rosenberg, H. F., S. Phipps, et al. (2007). "Eosinophil trafficking in allergy and asthma." J Allergy Clin Immunol **119**(6): 1303-1310; quiz 1311-1302.
- Rothenberg, M. E. e S. P. Hogan (2006). "The eosinophil." Annu Rev Immunol **24**: 147-174.
- Sakaguchi, S. e F. Powrie (2007). "Emerging challenges in regulatory T cell function and biology." Science **317**(5838): 627-629.
- Saklayen, M. G., A. J. Pesce, et al. (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.
- Saldanha, J. C., D. L. Gargiulo, et al. (2004). "A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice." Braz J Med Biol Res **37**(6): 809-816.
- Sampson, H. A. (1999). "Food allergy. Part 2: diagnosis and management." J Allergy Clin Immunol **103**(6): 981-989.
- Santiago, A. F. (2008). "Papel dos eventos inflamatórios induzidos pela imunização na manutenção de tolerância oral". Departamento de Bioquímica e Imunologia - UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais. Dissertação de mestrado.
- Satter, M. A., K. Sakai, et al. (2002). "Low-protein diet induces oral tolerance to ovalbumin in mice." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **48**(1): 51-58.
- Saurer, L. e C. Mueller (2009). "T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract." Allergy **64**(4): 505-519.

- Saurer, L., I. Seibold, et al. (2004). "Virus-induced activation of self-specific TCR alpha beta CD8 alpha alpha intraepithelial lymphocytes does not abolish their self-tolerance in the intestine." J Immunol **172**(7): 4176-4183.
- Sicherer, S. H. (2002). "Food allergy." Lancet **360**(9334): 701-710.
- Sicherer, S. H. e H. A. Sampson (2009). "Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment." Annu Rev Med **60**: 261-277.
- Shires, J., E. Theodoridis, et al. (2001). "Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE)." Immunity **15**(3): 419-434.
- Shreffler, W. G., R. R. Castro, et al. (2006). "The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro." J Immunol **177**(6): 3677-3685.
- Smith, D. W. e C. Nagler-Anderson (2005). "Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa." J Immunol **174**(7): 3851-3857.
- Sonnenburg, J. L., L. T. Angenent, et al. (2004). "Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine?" Nat Immunol **5**(6): 569-573.
- Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper, et al. (2002). "Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15451-15455.
- Steinman, R. M. e M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-358.
- Steinman, R. M., S. Turley, et al. (2000). "The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells." J Exp Med **191**(3): 411-416.
- 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. M. Mowat (1998). "Immune responses to dietary antigens: oral tolerance." Immunol Today **19**(4): 173-181.
- Strobel, S. e A. M. Mowat (2006). "Oral tolerance and allergic responses to food proteins." Curr Opin Allergy Clin Immunol **6**(3): 207-213.
- Stulnig, T. M. (2003). "Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects." Int Arch Allergy Immunol **132**(4): 310-321.
- Sudo, N., S. Sawamura, et al. (1997). "The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction." J Immunol **159**(4): 1739-1745.
- Sun, C. M., J. A. Hall, et al. (2007). "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid." J Exp Med **204**(8): 1775-1785.

- Suzuki, K. e S. Fagarasan (2008). "How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut." Trends Immunol **29**(11): 523-531.
- Terada, N., N. Hamano, et al. (2000). "Interleukin-13 and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts." Clin Exp Allergy **30**(3): 348-355.
- Thompson, G. R. and P. C. Trexler (1971). "Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals." Gut **12**(3): 230-235.
- Tsuji, N. M. e A. Kosaka (2008). "Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells." Trends Immunol **29**(11): 532-540.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2007). "The human microbiome project." Nature **449**(7164): 804-810.
- Unger, W. W., F. Hauet-Broere, et al. (2003). "Early events in peripheral regulatory T cell induction via the nasal mucosa." J Immunol **171**(9): 4592-4603.
- Uhlig, H.H. e Powrie F. (2005). "The role of mucosal T lymphocytes in regulating intestinal inflammation." Springer Semin Immunopathol. **27**(2):167-180
- van Wijk, F. e L. Knippels (2007). "Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization." Biomed Pharmacother **61**(1): 8-20.
- Vaz, N. M., L. C. Maia, et al. (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.
- Veldhoen, M. e B. Stockinger (2006). "TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells." Trends Immunol **27**(8): 358-361.
- Vignali, D. A., L. W. Collison, et al. (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-532.
- Wakabayashi, A., Y. Kumagai, et al. (2006). "Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction." Immunology **119**(2): 167-177.
- Weiner, H. L. (1994). "Oral tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10762-10765.
- Weiner, H. L., A. Friedman, et al. (1994). "Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens." Annu Rev Immunol **12**: 809-837.
- Woof, J. M. e J. Mestecky (2005). "Mucosal immunoglobulins." Immunol Rev **206**: 64-82.
- Xu, J., D. S. Postma, et al. (2000). "Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma." Am J Hum Genet **67**(5): 1163-1173.
- Yaqoob, P. (2003). "Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation." Trends Immunol **24**(12): 639-645.

Young, V. R. and P. L. Pellett (1987). "Protein intake and requirements with reference to diet and health." Am J Clin Nutr **45**(5 Suppl): 1323-1343.

Zhang, X., L. Izikson, et al. (2001). "Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration." J Immunol **167**(8): 4245-4253.

Zhou, L., M. M. Chong, et al. (2009). "Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation." Immunity **30**(5): 646-655.