

ANDREZZA FERNANDA SANTIAGO

**Efeitos do envelhecimento na mucosa  
intestinal: indução e declínio da  
tolerância oral**

Belo Horizonte  
2011

ANDREZZA FERNANDA SANTIAGO

**Efeitos do envelhecimento na mucosa  
intestinal: indução e declínio da  
tolerância oral**

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria  
Co-orientadora: Dra. Cláudia Rocha Carvalho

Área de concentração: Imunologia

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

Belo Horizonte  
2011

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

**Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fogarty International Center (NIH) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).**

**“In a fast moving field there is plenty of froth and confusion.  
This is the exciting place to be in science... the calm wave left  
behind represents the fact that has to be learnt...”**

**Denis Alexandre**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço pela oportunidade e confiança, pela sabedoria generosamente compartilhada e principalmente pela paciência com que me ajudaram a conduzir este trabalho.**

**À Ana Maria Caetano de Faria e Cláudia Rocha Carvalho**

**Obrigada por serem a razão de tudo e a grande inspiração da minha vida. Por me acolherem e estarem ao meu lado sempre.**

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

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

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

Às queridas Ildinha e Nilda por cuidarem sempre de tudo.

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

Às queridas amigas Frank, Elaine, Dani, Josy e Rafaela por terem sido muito mais do que colegas de laboratório e sim grandes amigas que levarei pelo resto da vida!

Aos queridos amigos eternos de Bases I Érica (que sempre me ajudou muito!), Nataly, Richard, Leody, Taty, Paty, Luidy e Bruno pela amizade, força e bons momentos!

Aos amigos Rafael Pires, Rafaela, Andréa e Bárbara que foram essenciais para a elaboração deste trabalho. Muito obrigada pela força e principalmente pela paciência de trabalhar comigo.

Aos amigos Samara, Rafael Rezende, Magda, e André por sempre me ajudarem de alguma forma e pela amizade.

Ao Professor Howard Weiner e seu grupo pela calorosa acolhida em seu laboratório durante o doutorado sanduíche.

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

À amiga Adaliene (Dada) que além de companheira de Ouro Preto me deu muita força e a oportunidade de colaborar em seus trabalhos.

Aos queridos amigos de Mococa Rô, Dan, Lala, Dany, Márcia e Vi.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 - Tolerância Oral .....	21
1.2 – Tolerância oral e Imuno-senescência .....	22
1.2.1 - Imuno-senescência .....	25
1.3 - Tolerância Oral e Adjuvante.....	28
1.4 - Mecanismos Explicativos da Tolerância Oral .....	32
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
2.1 – Objetivo Geral.....	39
2.2 – Objetivos Específicos .....	39
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 – Animais.....	41
3.2- Antígenos.....	41
3.3 – Adjuvantes .....	41
3.4 - Tratamento Oral para Indução de Tolerância Oral .....	42
3.5 - Preparo da OVA Coagulada e Inoculação.....	42
3.6 – Obtenção do Soro .....	42
3.7 - Obtenção das Fezes e Preparo para Dosagem de S-IgA .....	43
3.8 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de Anticorpos Anti-OVA.....	43
3.9 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de Anticorpos Totais.....	44
3.10 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de IgE Anti-OVA .....	44
3.11 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de IgE Total.....	45

3.12 – Preparação de Suspensão Celular.....	46
3.13 – Contagem de Células Viáveis .....	47
3.14 – Cultura de Células .....	47
3.15 – Ensaio de Proliferação Celular.....	47
3.16 - Ensaio Imunoenzimático para Medida da Concentração de Citocinas .....	48
3.17 - Análise Fenotípica de Células Através de Citometria de Fluxo .....	48
3.18 - Histologia do Intestino Delgado .....	50
3.19 - Morfometria dos Vilos Intestinais.....	51
3.20 - Contagem de Linfócitos Intraepiteliais .....	52
3.21 - Separação de Células por Microesferas Magnéticas.....	52
3.22 – Soluções Utilizadas .....	52
3.23 - Protocolos Experimentais .....	55
<b>4 - RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>Resultados Parte I: .....</b>	<b>61</b>
4.1 - Avaliação das Alterações Basais na Morfologia Intestinal e Perfil Celular das Células Intraepiteliais Durante o Envelhecimento.....	62
4.2 - Avaliação da Produção Basal de Citocinas no Duodeno, Jejuno Proximal, Jejuno Distal e Íleo Durante o Envelhecimento .....	65
4.3 - Avaliação das Populações de Células T Naives, Ativadas e Reguladoras nos Principais Sítios de Indução de Tolerância Oral Durante o Envelhecimento .....	67
4.4 - Avaliação das Populações de Células Apresentadoras de Antígenos nos Principais Sítios de Indução de Tolerância Oral Durante o Envelhecimento .....	69
4.5 - Avaliação da Funcionalidade de DCs do Baço e Linfonodo Mesentérico de Animais de 2 e 12 Meses de Idade.....	71
4.6 - Avaliação da Produção de Anticorpos Durante o Envelhecimento .....	73
<b>Resultados Parte II.....</b>	<b>78</b>
4.7 - Avaliação da Manutenção da Tolerância Oral em Animais Imunizados com OVA + Al(OH) <sub>3</sub> em Tempos Distintos Após a Indução da Tolerância Oral .....	79
4.8 - Avaliação da Manutenção da Tolerância Oral em Animais Imunizados com OVA + Al(OH) <sub>3</sub> 7 Dias Após Indução da Tolerância Oral .....	82
4.9 - Avaliação da Persistência da Tolerância Oral em Animais C57BL/6 Imunizados 7 Dias ou em Tempos Diferentes Após o Tratamento Oral com OVA .....	85

4.10 - Avaliação da Importância da Imunização com Antígeno na Presença de Adjuvante na Manutenção da Tolerância Oral .....	87
4.11 - Avaliação da Importância da Imunização com Antígeno e Adjuvante pela Mesma Via na Manutenção da Tolerância Oral .....	90
4.12 - Avaliação da Indução da Resposta Imune Celular Após o Tratamento Oral com OVA Seguido ou não por Imunização com OVA +Al(OH) <sub>3</sub> em Camundongos DO11.10 .....	92
4.13 - Avaliação do Perfil Celular, Proliferação e Produção de Citocinas Após Tratamento Oral com OVA na Presença ou não de Imunização com Antígeno + Adjuvante Al(OH) <sub>3</sub> .....	97
4.14 - Avaliação dos Mecanismos de Ação do Adjuvante Al(OH) <sub>3</sub> na Manutenção da Tolerância Oral .....	102
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>6 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>121</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS .....</b>	<b>124</b>
<b>7 - ANEXOS.....</b>	<b>138</b>
Anexo A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG.....	139
Anexo B – Artigos Científico Publicados .....	140

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das alterações no tecido linfóide associado à mucosa intestinal durante o envelhecimento.....	76
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise de leucócitos do baço por citometria de fluxo. ....	50
Figura 2: Morfometria dos vilos intestinais. ....	1
Figura 3: Avaliação das alterações no sistema imune associado à mucosa na senescência. ....	55
Figura 4: Avaliação da resposta imune de anticorpos basais e antígeno-específicos. ....	55
Figura 5: Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH) <sub>3</sub> em tempos distintos após a indução da tolerância oral. ....	56
Figura 6: Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH) <sub>3</sub> 7 dias após indução da tolerância oral. ....	56
Figura 7: Avaliação da importância da imunização com antígeno na presença de adjuvante na manutenção da tolerância oral. ....	57
Figura 8: Avaliação da importância da imunização com antígeno e adjuvante pela mesma via na manutenção da tolerância oral. ....	57
Figura 9: Avaliação da indução da resposta imune celular após o tratamento oral com OVA seguido ou não por imunização com OVA + Al(OH) <sub>3</sub> em camundongos DO11.10. ....	58
Figura 10: Avaliação do perfil celular, proliferação e produção de citocinas após tratamento oral com OVA na presença ou não de imunização com antígeno + adjuvante Al(OH) <sub>3</sub> . ....	58
Figura 11: Avaliação dos mecanismos de ação do adjuvante Al(OH) <sub>3</sub> na manutenção da tolerância oral. ....	59
Figura 12: Análise histomorfológica do intestino delgado. ....	63
Figura 13: Análise fenotípica de células intraepiteliais do intestino delgado. ....	64
Figura 14: Produção de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. ....	66
Figura 15: Porcentagem de células CD4+CD62L+, CD4+CD44+, CD4+CD25+Foxp3 e CD4+CD5+LAP+ na lâmina própria (LP), placas de Peyer (PP) e linfonodos mesentéricos (MLN). ....	68
Figura 16: Expressão de moléculas de co-estimulação CD80+, CD86+ em DCs da lâmina própria (LP), placas de Peyer (PP) e linfonodos mesentéricos (MLN). ....	70

Figura 17: Porcentagem de células CD4+CD44+, CD4+CD25+Foxp3+, CD4+CD25+LAP+ e Produção de IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ em co-cultura de células dendríticas de animais jovens e idosos com células T de animais DO11.10 jovens. ....	72
Figura 18: Produção de S-IgA total e anti-OVA. ....	74
Figura 19: Produção de IgA, IgE, IgG1 e IgG2a basal. ....	75
Figura 20: Produção de IgA, IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA. ....	75
Figura 21: Produção de anticorpos séricos anti-OVA. ....	80
Figura 22: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ por células do baço. ....	81
Figura 23: Produção de anticorpos séricos anti-OVA. ....	83
Figura 24: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ por células do baço. ....	84
Figura 25: Produção de anticorpos séricos anti-OVA. ....	86
Figura 26: Produção de anticorpos séricos anti-OVA. ....	88
Figura 27: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ por células do baço. ....	89
Figura 28: Produção de anticorpos séricos anti-OVA. ....	91
Figura 29: Porcentagem de células CD4+CD25+Foxp3 nas placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (MLN), baço (Ba), e linfonodo inguinal (LI). ....	94
Figura 30: Ensaio de proliferação por células do baço. ....	95
Figura 31: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ por células do baço. ....	96
Figura 32: Porcentagem de células CD4+62L+ e CD4+CD44+ nas placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (MLN) e baço (Ba). ....	98
Figura 33: Porcentagem de células CD4+CD25+Foxp3 nas placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (MLN) e baço (Ba). ....	99
Figura 34: Ensaio de proliferação por células do baço. ....	100
Figura 35: Produção de INF- $\gamma$ IL-4, IL-10 por células do baço. ....	101
Figura 36: Produção de anticorpos séricos anti-OVA. ....	103

## LISTA DE ABREVIACÕES

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{l}$	Microlitros
$\mu\text{m}$	Micrômetros
ml	mililitros
mg	miligramas
$\text{Al(OH)}_3$	Hidróxido de Alumínio
APCs	Células apresentadora de antígeno
Ba	Baço
BCR	Receptor de células B
CD	Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
CFA	Adjuvante Completo de Freund
Con A	Concanavalina A
DCs	Célula dendrítica
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
FITC	Isocianato de fluoresceína
Foxp3	Fator de transcrição <i>forkhead box p3</i>
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
IEL	Linfócito intraepitelial
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
IFN	Interferon
i.p.	Intraperitoneal
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
LAP	Latency-Associated Peptide
LI	Linfonodo Inguinal
MLN	Linfonodo Mesentérico
NK	Células matadoras naturais ( <i>natural killer</i> )
NKT	Células T matadoras naturais ( <i>T natural killer</i> )
LP	Lâmina própria
MSU	Urato monossódico

nm	Nanômetros
°C	Grau centígrado
OPD	Ortofenileno-diamino
OVA	Ovalbumina
PBS	Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
PP	Placas de Peyer
RPM	Rotações por minuto
s.c.	Subcutâneo
TGF	Fator de transformação e crescimento
TCR	Receptor de células T
Th	Linfócito auxiliar ( <i>T helper</i> )
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T reguladoras específicas



## RESUMO

Está bem descrito que o envelhecimento está associado com o declínio da indução de tolerância oral, a qual é iniciada na superfície da mucosa intestinal. Camundongos se tornam menos susceptíveis com 24 semanas de idade e totalmente refratários à indução de tolerância com 70 semanas. Nesses camundongos idosos, somente um regime ótimo de administração oral como a ingestão voluntária, mas não a gavagem, é capaz de torná-los tolerantes ao antígeno ingerido. Assim, avaliamos o efeito do envelhecimento em células T e citocinas da mucosa intestinal comprovadamente envolvidos na indução de tolerância oral. A frequência de populações de células intraepiteliais (IELs) com fenótipo regulador, como  $TCR\gamma\delta+$  e  $CD4+CD8\alpha\alpha$  mostraram-se reduzidas em animais de 24 meses de idade. A produção de TGF- $\beta$  e IL-10 também se mostraram diminuídas no intestino delgado de camundongos idosos. No entanto, células T reguladoras  $CD4+CD25+Foxp3+$  e  $CD4+LAP+$  assim como células T ativadas  $CD4+CD44+$  estavam aumentadas na mucosa de camundongos a partir do 6 meses de idade. Além disso, a expressão da molécula co-estimuladora CD86 em células dendríticas (DCs) encontrava-se aumentada em camundongos de 12 meses de idade e a capacidade de DCs de camundongos idosos em estimular a secreção de TGF- $\beta$  e a diferenciação de células  $CD4+LAP+$ , em estudos de co-cultura, também estava diminuída. A redução na produção de citocinas e na frequência de células T com fenótipo regulador pode estar envolvida no declínio da susceptibilidade à indução de tolerância oral que acompanha o envelhecimento. Entretanto, nem todos os elementos reguladores estavam reduzidos, células com fenótipo regulador  $CD4+CD25+Foxp3+$  e  $CD4+CD25+LAP+$  apresentaram-se aumentadas, e podem ter um papel importante na manutenção da homeostase da mucosa intestinal durante o envelhecimento. Além do seu efeito sobre a indução de tolerância oral, é possível que o envelhecimento também afete o tempo de duração desse fenômeno. De acordo com alguns autores a tolerância oral é mantida por um período curto de 21 dias a 3 meses após a administração oral do antígeno. Trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram, no entanto, que a tolerância oral pode ser mantida por até um ano e meio após o tratamento oral. Esses relatos contraditórios podem ser explicados pelos diferentes protocolos experimentais que foram utilizados. A principal diferença nos protocolos está relacionada à imunização com antígeno+adjuvante após o tratamento oral. Em geral, a imunização é utilizada para testar a indução da tolerância

oral, mas esse evento inflamatório parece afetar sua manutenção. Neste trabalho, também avaliamos o papel dos eventos inflamatórios desencadeados pela imunização na indução e manutenção da tolerância oral. Para isto, camundongos BALB/c com idade de 8-12 semanas foram tratados por via oral por gavagem com 20mg de OVA e imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> i.p. A imunização primária variou de 7 a 180 dias após o tratamento oral e o desafio com OVA i.p. dado 14 dias. Alternativamente, os animais foram imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> i.p. 7 dias após o tratamento oral e o desafio com OVA i.p. variou de 14 a 360 dias após a imunização primária. Observamos que somente camundongos que receberam imunização primária até 90 dias após o tratamento oral foram capazes de manter a tolerância oral para todos os parâmetros avaliados. Entretanto, camundongos imunizados 7 dias após o tratamento oral mantiveram a tolerância oral por até um ano após a ingestão do antígeno. Esses resultados sugerem que a imunização com antígeno+adjuvante pode fortalecer a manutenção da tolerância oral. A injeção concomitante de antígeno e adjuvante assim como o sítio de imunização também se mostraram fatores importantes na manutenção da tolerância oral. Além disto, observamos um aumento na frequência de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+CD25+LAP+ em camundongos DO11.10 que contam com 85% de linfócitos T expressando TCR transgênico para OVA após o tratamento oral com o antígeno ovalbumina. Um aumento na frequência dessas células também pode ser visto em camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP knockin após o tratamento oral com antígeno seguido por imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub>. Quando avaliamos os possíveis mecanismos pelos quais o Al(OH)<sub>3</sub> reforçou a manutenção da tolerância oral, observamos que nem a formação de depósitos de antígeno nem a liberação de ácido úrico se mostraram necessários. Concluímos que muitas alterações associadas ao envelhecimento ocorrem no tecido linfóide associado à mucosa. Muitas delas podem estar envolvidas na reduzida susceptibilidade à indução de tolerância oral e no declínio da mesma em camundongos idosos. Além disto, o intervalo entre o tratamento oral e a imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub>, a presença concomitante do antígeno e do adjuvante e a via de imunização afetaram o tempo de manutenção da tolerância oral. O mecanismo pelo qual o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> prolonga o estado de tolerância oral não foi determinado e mais estudos são necessários para se obter uma resposta.

## ABSTRACT

Aging is reported to be associated with a decline in oral tolerance induction, an immunological phenomenon initiated at the intestinal mucosal surface. Mice become less susceptible with 24 weeks of age and totally refractory with 70 weeks of age. At this age, they can still be rendered tolerant but only by a regimen of continuous feeding. Herein, we examined the effect of aging in T cells and cytokines at the intestinal mucosa that are described as involved in oral tolerance induction. Frequencies of regulatory-type IEL subsets TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha\alpha$  are lower in 24-month-old-mice. Production of TGF- $\beta$  and IL-10 in the small intestine was also reduced during aging. However, mucosal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells increased in mice from 6 months of age. Activated CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> mucosal T cells also augmented. Moreover, the expression of costimulatory molecule CD86 in DCs was augmented and the ability of mucosal dendritic cells to stimulate TGF- $\beta$  secretion and differentiation of CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> T cells in co-culture studies also declined in 12-month-old-mice. Reduction in these regulatory-type cytokines and T cells may help to explain the decline in susceptibility to oral induction during aging. However, not all mucosal regulatory elements are diminished; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> as well as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells are augmented and they might play a critical role in maintaining mucosal homeostasis during aging. In addition to its effect in oral tolerance induction, it is possible that aging also affects the time length of this phenomenon. According to some authors, oral tolerance is kept for 21 days to 3 months after feeding. Previous studies by our group showed that oral tolerance can be maintained for a period of one and a half year after oral treatment. These contradictory reports can be explained by different experimental protocols that were used. The main difference in the protocols is related to immunization with antigen + adjuvant that is essential to reveal oral tolerance induction. Thus, we also studied the role of inflammatory events triggered by immunization in the oral tolerance induction and maintenance. For that, BALB/c mice at age of 8-12 weeks were treated orally with 20mg of OVA by gavage and immunized with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> i.p. Primary immunization varied from 7 to 180 days after oral treatment in mice immunized with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> and a booster was administered 14 days afterwards. Alternatively, primary immunization with OVA+Al(OH)<sub>3</sub> was performed 7 days after

oral treatment and booster with OVA varied from 14 to 360 days after primary immunization. We observed that only mice primary immunized up to 90 days after oral treatment were able to sustain oral tolerance to all evaluated parameters. However, mice immunized 7 days after oral treatment were able to keep oral tolerance up to one year after oral treatment. These results suggest that immunization with antigen + adjuvant can act strengthening oral tolerance maintenance. The concomitant injection of antigen and adjuvant and the site of immunization were also important for oral tolerance maintenance. In addition, there was an increase in the frequency of Tregs cells CD4+CD25+Foxp3+ and CD4+CD25+LAP+ in DO11.10 OVA transgenic TCR mice after antigen feeding. Moreover, in C57BL/6 and GFP Foxp3+ knockin mice an increase percentage of these could be seen after oral treatment with antigen followed by immunization with OVA+Al(OH)<sub>3</sub>. When we searched for the possible mechanism by which Al(OH)<sub>3</sub> helps in oral tolerance maintenance neither antigen deposits nor uric acid seem to be necessary. We can conclude that many changes in the gut mucosal associated immune system occurs that can be involved in oral tolerance decline in aged mice. In addition, the interval between oral treatment and primary immunization with OVA+Al(OH)<sub>3</sub>, the concomitant presence of antigen and adjuvant and the site of injection all affect oral tolerance maintenance.

## **1- INTRODUÇÃO**

## **1.1 - Tolerância Oral**

A tolerância oral é definida como um estado de baixa reatividade imunológica específica após imunização com um antígeno que foi previamente administrado por via oral (Vaz, Maia, Hanson & Lynch, 1977). A tolerância oral afeta vários aspectos da resposta imune específica como: produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas (Vaz e cols., 1977; Ngan & Kind, 1978; Afuwape, Turner & Stroble, 2004); reação de hipersensibilidade tardia – DTH (Mowat e cols., 1982) e produção de citocinas (Weiner e cols., 1994; Afuwape, Turner & Strobel, 2004). Alguns trabalhos mostram que a injeção parenteral do antígeno tolerado no animal tolerante é capaz de inibir também a produção de anticorpos para antígenos não relacionados injetados concomitantemente. Esse fenômeno foi denominado “efeitos indiretos da tolerância oral” (Carvalho e cols., 1994, Carvalho & Vaz, 1996). Assim, a tolerância oral é um fenômeno que se inicia na mucosa intestinal como resultado do contato antigênico iniciado por via oral que possui efeitos locais e sistêmicos (Faria e Weiner, 2005).

A mucosa intestinal é um dos maiores sítios de exposição antigênica do corpo humano. Um grande número de bactérias coloniza o intestino grosso sendo que, em humanos, esse número pode chegar a  $10^{12}$  microorganismos/g de fezes. Além disto, uma enorme quantidade de proteínas derivadas dos alimentos passa pelo intestino diariamente. As proteínas ingeridas são degradadas por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado, mas algumas proteínas escapam dessa digestão ou são parcialmente degradadas e podem ser absorvidas intactas (Wakabayashi e cols., 2006). Essa exposição antigênica na mucosa intestinal é importante para a maturação do sistema imune uma vez que camundongos mantidos com dieta livre de macromoléculas apresentam seu sistema imune com características de um sistema imune de neonatos (Menezes e cols., 2003).

A mucosa intestinal possui um tecido linfóide associado formado por placas de Peyer, folículos linfóides isolados e linfonodos locais drenantes, onde antígenos captados do lúmen intestinal estimulam células T e B naíves, assim como linfócitos intraepiteliais (IEL) e células da lâmina própria intestinal, que contribuem para formação de imunoglobulina A secretória (S-IgA) (Brandtzaeg e Pabst, 2004). Essa produção local de IgA ocorre fisiologicamente e a S-IgA é capaz de neutralizar toxinas,

bloqueiar a aderência de bactérias ao epitélio e reduzir a penetração de antígenos através da mucosa (Schmucker e cols., 2003).

Como os linfonodos mesentéricos (LnM) drenam o intestino delgado, acredita-se que esses linfonodos em particular tenham um papel importante na indução da tolerância oral. Por exemplo, foi demonstrado em camundongos a necessidade de migração, dependente de CCR7, de DCs da lâmina própria para os LnM para indução de tolerância oral e que a excisão dos LnM aboliu parcialmente a indução de tolerância oral nestes animais (Worbs e cols., 2006). Por outro lado, estudos do nosso grupo e de Spahn e cols. mostraram que a tolerância pode ser induzida na ausência dos LnM (Barsante, 2001; Spahn e cols., 2001). Outros órgãos linfóides considerados importantes para a indução da tolerância oral são as placas de Peyer, onde, células T secretoras de IL-10 e TGF- $\beta$  são induzidas (Fujihashi e cols., 2001, Tsuji e cols., 2003). Entretanto, estudos demonstraram que a tolerância oral também pode ser induzida em camundongos na ausência de placas de Peyer's (Spahn e cols., 2001).

## **1.2 – Tolerância oral e Imuno-senescência**

Vários fatores influenciam a indução da tolerância oral. Alguns desses fatores estão relacionados ao antígeno, como dose e natureza, forma de administração e a frequência e intervalo entre as administrações (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996, Faria e cols., 2003). Outros fatores estão relacionados ao animal como microbiota intestinal, fundo genético, estado imunológico e idade do animal no primeiro contato com o antígeno (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996, Vaz e cols., 1987, Chechade e Mayer., 2005, Lahmann e cols., 1992, Faria e cols., 1993). Strobel e Ferguson mostraram que camundongos B6D2F1 considerados susceptíveis à indução de tolerância oral, quando tratados com OVA nas primeiras 48 horas de vida, não desenvolvem a supressão da resposta imune a esse antígeno e apresentam altos níveis de anticorpos específicos anti-OVA. Somente após a segunda semana de vida, o estado de tolerância é alcançado (Strobel & Ferguson, 1984).

Por outro lado, estudos prévios do nosso laboratório mostraram que animais susceptíveis à indução da tolerância oral com 8 semanas de idade se tornam menos susceptíveis com 24 semanas e totalmente refratários com 70 semanas quando tratados por via oral com uma gavagem do antígeno (Faria e cols., 1993, Faria e cols., 1998b). A

transferência de células do baço de animais B6D2F1 jovens, tanto para animais neonatos como idosos, aumenta a susceptibilidade à indução da tolerância oral nesses animais. Em contraste, a transferência de células de animais idosos para camundongos jovens os torna menos susceptíveis (Lahmann, Menezes, Verdolin e Vaz, 1992). Curiosamente, essa refratariedade é observada em animais tratados por gavagens, sendo que camundongos entre 24 e 32 semanas mostram-se imunizados ao invés de tolerizados (Faria e cols., 1993). Já os camundongos de mesma idade que recebem quantidade equivalente de OVA por ingestão voluntária (20mg) mostram-se tolerantes. O mesmo ocorreu em animais de 70 semanas de idade, o que mostra que uma administração contínua do antígeno pode reverter a refratariedade à indução da tolerância oral em animais idosos ou em fase de maturação (Faria e cols., 1998b; Faria e cols., 2003).

Estudos de Wakabayashi e cols. utilizando hemácias de carneiro (SRBC) como antígeno, também mostraram um decréscimo na susceptibilidade à indução da tolerância oral em camundongos maduros e idosos. Camundongos com 12 meses de idade que foram tratados por gavagens por 3 dias consecutivos mostraram um aumento significativo no nível de anticorpos IgM e IgG mesmo 6 meses após o tratamento oral (Wakabayashi e cols., 1999). Kato e cols. também mostraram uma refratariedade à indução da tolerância oral em camundongos de 6-8 meses, 12-14 meses e 24 meses tratados oralmente com OVA. Segundo esses autores, tal refratariedade se deve a um defeito na interação de células T nas placas de Peyer. Esse trabalho mostrou que ocorre uma diminuição no tamanho das placas de Peyer com o envelhecimento assim como uma redução no número de DCs e sugere que ocorra uma alteração nas atividades de células T e B em animais idosos. Tal alteração pode estar relacionada em parte com o declínio na função de DCs nas placas de Peyer (Kato e cols., 2003). Esses trabalhos contradizem Moreau e Gaboriau-Routhiau que relataram que a senescência não afeta a indução da tolerância oral, mas somente a sua persistência. Utilizando camundongos com 20 meses de idade tratados oralmente com gavagem única de 20mg de OVA, os autores observaram a indução de um estado de tolerância nesses animais, porém essa tolerância foi menos duradoura do que aquela observada em animais jovens (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996).

Um dos possíveis mecanismos que explicariam a diminuição da susceptibilidade à indução de tolerância oral no idoso seria uma menor captação de antígenos pelas placas de Peyer. No entanto, estudos avaliaram essa possibilidade quantificando as



partículas captadas pelas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos depois da administração de microesferas em camundongos adultos e idosos ou ratos e mostraram que a captação através do epitélio estava aumentada ou não afetada em camundongos ou ratos idosos, indicando que a captação de antígenos não está diminuída com o envelhecimento (Simon, Shine e Dayan, 1994). Como a tolerância oral é um evento iniciado nas mucosas e tem efeitos sistêmicos, provavelmente tanto alterações de fatores locais como relacionados à operação global do sistema imune durante o processo de envelhecimento podem estar relacionados ao seu declínio.

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

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

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

Estudos em nosso laboratório mostram que camundongos tratados oralmente quando jovens são capazes de manter o estado de tolerância por até um ano após o tratamento oral. Assim como no trabalho de Melamed & Friedman, os animais foram tratados oralmente e imunizados com OVA em adjuvante 7 dias depois. No entanto, foi

utilizado, como adjuvante, hidróxido de alumínio no lugar de CFA. Esse trabalho confirma dados anteriores de que o envelhecimento afeta também a magnitude da resposta imune mostrando que ocorre um decréscimo significativo nos níveis de anticorpos anti-OVA em animais idosos do grupo controle apenas imunizado (Faria e cols., 1998a).

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

Então, tanto eventos imunológicos desencadeados pelos adjuvantes como modificações que ocorrem naturalmente no sistema imune no decorrer da vida dos animais (imuno-senescência) podem estar relacionados com o estabelecimento da tolerância oral e sua manutenção.

### **1.2.1 - Imuno-senescência**

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

Embora a disfunção do sistema imune ocorra em ambos os tipos celulares, linfócitos T e B, as células T têm se mostrado mais susceptíveis aos efeitos do envelhecimento (Taub e Longo., 2005, Listi e cols., 2006). Essa maior susceptibilidade faz sentido uma vez que as células T são produzidas no timo. A involução tímica e a redução na produção de timócitos são indiscutivelmente as mudanças mais evidentes na imuno-senescência. Acredita-se que a perda de timócitos e de massa tímica estavam diretamente relacionadas ao declínio da função imune mediada por células T, assim como à resistência reduzida a infecções e à incidência aumentada de câncer e doenças autoimunes no idoso. Estudos recentes mostram que, apesar da atrofia, o timo do idoso ainda tem capacidade de promover diferenciação de células T e produzir “de novo” células T virgens, mas essa atividade está significativamente reduzida (Taub e Longo, 2005). O número total de células T e a razão de células T CD4/CD8 estão relativamente

preservados durante o envelhecimento. No entanto, a resposta imune mediada por essas células a novos antígenos está muito reduzida nos idosos (Linton & Dorshkind, 2004).

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

Concomitantemente com a produção tímica reduzida de células T efetoras, é concebível que também haja uma redução na produção de células T reguladoras naturais (nTregs) durante o envelhecimento. Por outro lado, em idosos saudáveis, mecanismos alternativos, como a geração periférica de Tregs, podem compensar esse déficit de forma a manter a tolerância e prevenir o aparecimento de doenças autoimunes. Estudos em camundongos C57/B6 mostram que há um aumento no número absoluto e porcentagem de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no baço de animais senescentes. Esse trabalho relata ainda que há um aumento na atividade de Tregs e que esse aumento se deve à expansão desproporcional de Tregs de memória/efetora (CD103<sup>+</sup>) e não à geração de nTregs pelo timo. Segundo os autores, as Tregs parecem ser responsáveis pela redução na expressão de moléculas de co-estimulação em DCs na senescência (Chiu e cols., 2007). Entretanto, trabalhos de Zhao e colaboradores mostraram que, apesar do aumento na porcentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no baço, sangue e linfonodos, a atividade supressora dessas células está reduzida em camundongos BALB/c idosos (Zhao e cols., 2007). Um estímulo antigênico recorrente poderia reduzir também a diversidade dessas células (Dejaco e cols., 2006).

Outra alteração comum na imuno-senescência é a expansão oligoclonal de células T CD8<sup>+</sup>, quando um único clone que possui um único TCR ocupa uma proporção significativa do total no conjunto de células T CD8<sup>+</sup>. Embora também possa ocorrer expansão oligoclonal de células T CD4<sup>+</sup>, a expansão de células T CD8<sup>+</sup> parece ser mais proeminente (Clambey, Kappler, Murrack, 2007).

Com relação à produção de citocinas, os padrões secretados por células T ativadas também se alteram na senescência. Há uma redução na produção de citocinas como IL-2, IL-3, e GM-CSF e um aumento na produção de citocinas efetoras como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Dados sobre a produção de IFN- $\gamma$  na senescência são muito conflitantes. Enquanto alguns trabalhos mostram um aumento, outros mostram uma redução ou não alteração nos níveis de IFN- $\gamma$  em idosos (Faria e cols., 1998b, Kang e cols., 2004).

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

Alterações em DCs associadas à imunosenescência foram investigadas por alguns grupos, mas há controvérsias com relação aos resultados. De acordo com Steger e colaboradores, DCs derivadas do sangue periférico de humanos não apresentam modificações significantes em seu fenótipo ou função no envelhecimento (Steger e cols., 1996). Estudos de outro grupo também não relataram alterações na porcentagem de DCs derivadas do baço expressando moléculas de co-estimulação como CD80 e CD86 em camundongos senescentes (Hanura e cols., 1995). No entanto, Simioni e colaboradores observaram uma redução na expressão de CD86 em DCs. A frequência de DCs expressando essa molécula do baço se mantinha inalterada (Simioni e cols., 2010).

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

Apesar do progresso considerável na caracterização do sistema imune associado à mucosa, não há muitos relatos claros sobre as alterações durante a imunosenescência. Poucos trabalhos avaliaram parâmetros imunológicos locais como perfil celular na mucosa intestinal durante o envelhecimento. Alguns autores mostram redução em células T CD45+ e aumento da população de células T NK1.1 no intestino assim como aumento da porcentagem de células intraepiteliais CD4+CD8+ em animais idosos (Ishimoto e cols., 2004; Hayashi e cols., 2009).

Assim, podemos observar que, na senescência, ocorre uma alteração de vários mecanismos e células do sistema imune, dos quais grande parte está envolvida na indução da tolerância oral. Sendo assim, é importante compreender como as alterações do sistema imune decorrentes do envelhecimento afetam a tolerância oral.

### **1.3 - Tolerância Oral e Adjuvante**

O protocolo padrão utilizado para demonstrar o desenvolvimento ou não de tolerância oral a um determinado antígeno utilizado para o tratamento oral envolve a imunização com esse antígeno juntamente com um adjuvante. No entanto, a contribuição desse estímulo inflamatório para a indução mesma da tolerância foi, até hoje, muito pouco estudada.

Por mais de 70 anos, substâncias com atividade co-estimuladora têm sido misturadas com antígenos proteicos com a finalidade de aumentar a sua imunogenicidade. Tais substâncias são conhecidas como adjuvantes (Storni e cols., 2004). Adjuvantes são usualmente definidos como compostos que podem aumentar e/ou modular a imunogenicidade intrínseca de um antígeno. A palavra adjuvante se origina

do latim *adjuvare*, ou seja, que “aquele que tem como função ajudar”. Esses compostos têm a habilidade não só de aumentar, mas de seletivamente direcionar a resposta imune de diferentes antígenos e essas propriedades têm sido consideradas em várias estratégias de vacinação para alcançar uma resposta imune celular ou humoral efetiva (Guy, 2007, Faquim-Mauro, 1999, Faquim-Mauro, 2000).

Um mecanismo clássico de ação de adjuvantes é a formação de “depósitos”, no qual o adjuvante protege o antígeno de diluição e rápida degradação, assim como da eliminação pelo organismo onde foi injetado. Através da liberação prolongada e intacta do antígeno, o adjuvante permite uma exposição lenta e prolongada de um baixo nível de antígenos às células do sistema imune. Essa exposição prolongada resulta em uma estimulação contínua de células produtoras de anticorpos, resultando na produção de altos níveis de anticorpos pelo indivíduo imunizado (Stills Jr, 2005). Um segundo mecanismo de ação dos adjuvantes seria sua ação como veículo de ajuda para levar antígenos aos órgãos linfóides, como baço e linfonodos, onde o antígeno é captado por DCs foliculares. A retenção do antígeno nesses órgãos é essencial para a produção de anticorpos e a formação das células T de memória (Stills Jr., 2005).

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

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

Estudos recentes identificaram o ácido úrico, produto da degradação de nucleotídeos, como um adjuvante endógeno que é liberado do citosol de células danificadas (Shi, Evans & Rock, 2003). Desde então o estudo de sua capacidade adjuvante tem recebido grande atenção. Um estudo recente de Kool e colaboradores mostrou que a liberação de ácido úrico pode ser um dos mecanismos de ação do adjuvante hidróxido de alumínio, promovendo a imunidade adaptativa pela liberação do ácido úrico, “sinal de perigo endógeno”, induzindo assim a diferenciação de monócitos recrutados em DCs inflamatórias (Kool e cols., 2007). A injeção intraperitoneal de ácido úrico purificado aumenta a resposta T citolítica pelo aumento da expressão de moléculas costimuladoras CD86 e CD80 em células apresentadoras isoladas de camundongos sensibilizados com antígenos particulados. Além disso, quando tratados com alopurinol e uricase (depletors de ácido úrico), uma inibição dessa ativação é observada (Hu e cols., 2004). Shi e colaboradores mostraram ainda que cristais de urato monossódico (MSU) pré-formados são mais potentes estimuladores do que o ácido úrico solúvel (Shi, Evans & Rock, 2003). Os cristais de ácido úrico estimulam monócitos a produzirem mediadores inflamatórios e é provável que as células dendríticas sejam estimuladas da mesma maneira. No entanto, sabe-se apenas que o ácido úrico é capaz de aumentar a imunidade a antígenos particulados. É de grande importância investigar se não haveria uma função mais ampla para esse possível adjuvante, como aumento da imunidade a infecções virais e bacterianas. Além disto, é relevante esclarecer se tal sinal de perigo opera em outros tipos de resposta imune que não envolvam infecções microbianas como em algumas respostas autoimunes ou na rejeição de transplantes (Heath e Carbone, 2003).

A imunogenicidade do antígeno na presença de  $\text{Al(OH)}_3$  pode ser dependente do grau de adsorção do antígeno e da dose do adjuvante (Gupta, 1998). Segundo Vaz e colaboradores, a dose do adjuvante  $\text{Al(OH)}_3$  é mais importante que a dose do antígeno para a indução da resposta imune existindo uma linearidade entre a dose de  $\text{Al(OH)}_3$  e a magnitude da formação de anticorpos. Esse estudo ainda sugere que o efeito do  $\text{Al(OH)}_3$  depende do desenvolvimento de células B (Vaz e cols., 1981). O  $\text{Al(OH)}_3$  pode induzir eosinofilia e ativação de complemento assim como uma intensa degranulação de mastócitos no local da injeção (quase não há mastócitos intactos na cavidade peritoneal de camundongos alguns minutos após a injeção de  $\text{Al(OH)}_3$ ). A inflamação no local “estimula” a drenagem linfática da região e facilita o transporte do antígeno para os

linfonodos. As células B podem, assim, ser o principal alvo do efeito do  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Gupta, 1998, Vaz e cols., 1981).

Estudos focados na indução de resposta humoral a antígenos solúveis mostraram que diferenças no padrão de isotipos de anticorpos produzidos dependem das características bioquímicas do adjuvante. Mais especificamente, os adjuvantes hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) e adjuvante incompleto de Freund (IFA) promovem produção de anticorpos IgE e IgG1, pela ativação de células Th2 e sua produção de altos níveis de IL-4, enquanto que o adjuvante completo de Freund (CFA) promove a síntese de IgG1 e IgG2a, pela ativação de células Th1 com produção de IFN- $\gamma$  e IL-12. Embora ambos os adjuvantes sejam capazes de induzir a produção de IgG1, vale destacar que a IgG1 produzida pela ação da IL-4 é do tipo anafilática e tem a capacidade de induzir degranulação de mastócitos, enquanto que a IgG1 induzida por células Th1 não tem atividade anafilática (Faquim-Mauro, 2000). Assim, a IL-4 quando induzida por  $\text{Al}(\text{OH})_3$  é produzida em altos níveis e tem um perfil pró-inflamatório devido à promoção da produção de IgG1 anafilática e IgE. Em outras palavras, as propriedades imunomoduladoras dos adjuvantes podem depender da sua habilidade de estimular uma resposta Th1, Th2 ou de outros padrões. Uma das vantagens da utilização de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  como adjuvante é um desenvolvimento rápido de altos títulos de anticorpos em resposta de longa duração depois da imunização primária e uma desvantagem é que esse adjuvante não é eficiente na indução de resposta imune mediada por células (Gupta, 1998).

Estudos de Tobagus e colaboradores avaliaram o papel modulador dos adjuvantes  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e CFA no processo de tolerância oral. Segundo os autores, aspectos qualitativos do processo de tolerância oral são fortemente influenciados pelo tipo de adjuvante usado na imunização (Tobagus, Thomas e Holt, 2004). Os resultados desse estudo mostraram que imunização com um antígeno, no caso OVA, em CFA após o tratamento oral com o mesmo antígeno, leva a uma inibição da produção de IgG1 e de IgG2a, assim como de IL-2 e de IFN- $\gamma$  que são características da resposta Th1. Enquanto isto, o uso de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  induz uma inibição da produção de IgG1 e de IL-5, que caracterizam a resposta Th2. Assim, quando se imuniza os animais com antígenos em adjuvante do tipo Th1, como o CFA, uma supressão seletiva da resposta do tipo Th1 é observada. Por outro lado, quando um adjuvante tipo Th2, como  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , é utilizado, observa-se uma supressão seletiva da resposta Th2 (Tobagus, Thomas e Holt, 2004).



Como já citado anteriormente, o envolvimento dos adjuvantes na tolerância oral pode ser muito maior do que se acredita. Uma possibilidade é que a inflamação gerada pelo adjuvante seja importante na indução e manutenção da tolerância oral. A formação de células T CD4<sup>+</sup> efectoras resultantes da imunização leva à expansão de células reguladoras (Tregs) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que limitam a expansão dos clones estimulados de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de linfócitos B (Almeida e cols., 2006). Essa “indexação” das células Tregs à dinâmica de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> pode explicar porque a imunização utilizando adjuvantes pode ser um reforço de mecanismos tolerogênicos induzidos pela administração oral de antígenos tais como os gerados na tolerância oral.

#### **1.4 - Mecanismos Explicativos da Tolerância Oral**

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

Além disto, algumas evidências mostram que os mecanismos envolvidos na indução de tolerância oral não são mutuamente excludentes e podem se sobrepor. Entre alguns dados que podem ligar esses mecanismos aparentemente distintos está a secreção de TGF- $\beta$ , uma citocina reguladora, que pode ser induzida pelo tratamento de células T com anticorpo anti-CTLA-4, embora esta molécula tenha sido primeiramente descrita

como envolvida na indução de anergia *in vivo*. Além disso, alguns estudos sobre propriedades de células reguladoras as descrevem como anérgicas e os eventos de deleção que ocorrem na mucosa intestinal parecem criar condições para a secreção local de TGF- $\beta$ . Tanto as células T em processo de morte como os macrófagos que ingerem restos de células apoptóticas secretam TGF- $\beta$ . Assim, anergia ou deleção e regulação ativa talvez sejam diferentes aspectos do mesmo processo tolerogênico que é estimulado pelo contato antigênico na mucosa intestinal (Faria e Weiner, 2006).

Inicialmente, a atividade reguladora de células T CD4<sup>+</sup> era ligada à produção de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10, associada à supressão da produção de citocinas Th1, como IL-2 e IFN- $\gamma$ . No entanto, vários estudos mostraram que a supressão decorrente da tolerância oral também é efetiva em respostas mediadas por células Th2, ou seja, tanto respostas Th1 como Th2 podem ser suprimidas na tolerância oral (Melamed e cols., 1996, Faria e Weiner, 2006). Utilizando camundongos DO.11.10 com TCR transgênico específico para OVA, Maron e colaboradores mostraram que há um aumento na expressão de IL-4 e IL-10 nas placas de Peyer e de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  na lâmina própria 6 horas após administração oral de OVA (Weiner, Slavin e Maron, 1998). Segundo Rizzo e colaboradores, IL-10 e IL-4 são essenciais para a indução da tolerância oral e ocorre um sinergismo na ação das duas citocinas durante o processo tolerogênico. Nesse processo, cada citocina atua em um estágio diferente, a IL-4 atua no estágio indutor, estimulando o crescimento das células reguladoras induzidas durante a tolerância, enquanto a IL-10 atua no estágio efetor, suprimindo os efeitos inflamatórios (Rizzo e cols., 1999). No entanto, o papel da IL-4 na tolerância oral é questionado uma vez que a mesma pode ser induzida, tanto com altas como com baixas doses de antígeno, em camundongos deficientes de IL-4 ou tratados com anticorpos anti-IL-4 (Faria e Weiner, 2006). A participação de IL-10 na supressão induzida pela tolerância oral também é polêmica. Aroeira e cols. mostraram claramente que a ausência de IL-10, induzida pelo tratamento *in vivo* de camundongos com anticorpos anti-IL-10 durante o tratamento oral, não interfere na indução de tolerância oral (Aroeira e cols., 1995). Embora o papel direto da IL-10 no desenvolvimento da tolerância oral não esteja claro, camundongos deficientes nessa citocina apresentaram como único fenótipo uma colite espontânea (Kuhn e cols, 1993). Além disto, em outros modelos experimentais de colite induzida pela administração de TNBS, foi demonstrado que a tolerância à microbiota residente está abolida e que a administração de IL-10 é capaz de restaurar essa tolerância (Duchmann e cols, 1996). Assim, o papel da IL-10 na manutenção da

homeostase da mucosa intestinal está bem documentado. De acordo com Kiyono e cols., IFN- $\gamma$  tem um papel essencial na indução e/ou manutenção da tolerância oral. Segundo os autores, é possível que a produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 leve a uma redução de IL-4 por células Th2 em camundongos tratados por via oral, o que contribuiria para uma menor produção de anticorpos, em especial de IgG1 (Kiyono e cols., 2010). Estudos de transferência materna de tolerância oral também sugerem que IFN- $\gamma$  está crucialmente envolvido na manutenção de tolerância oral, devido ao fato de que a inibição dessa citocina, em filhotes de mães tolerantes, reverte o efeito da transferência materno-fetal da tolerância (Polte, Henning e Hansen, 2008). Outra citocina citada por possuir um papel central na tolerância oral é TGF- $\beta$  que foi identificada como uma molécula imunoreguladora com propriedades imunogênicas e imunossupressivas dependendo do microambiente celular (Christ e cols, 1994). Várias evidências mostram que tanto IL-10 como TGF- $\beta$  têm importante papel na regulação de respostas inflamatórias contra bactérias no intestino grosso e os níveis de ambas as citocinas e de células T que as produzem estão aumentadas no GALT depois da indução de tolerância oral em camundongos (Chung e cols., 2005). A família TGF- $\beta$  é composta por três membros, TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3, sendo que apenas TGF- $\beta$ 1 tem ação imuno-moduladora em células do sistema imune (Letterio e Roberts, 1997). TGF- $\beta$ 1 é produzida tanto por células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> do GALT. Além disso, essa citocina é considerada o fator inicial na indução da troca de isotipo para IgA na mucosa intestinal (Kim e Kagnoff, 1990). Atualmente o papel dessa citocina na geração de células T reguladoras e sua importância na tolerância oral tem sido foco de grande atenção.

As células T CD4<sup>+</sup> reguladoras naturais (nTregs) são geradas no timo, constituem aproximadamente 10% das células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos normais e expressam caracteristicamente CD25, a cadeia  $\alpha$  do receptor de interleucina 2 (IL-2), e Foxp3 (fator de transcrição *forkhead box p3*) o qual é crucial para sua função reguladora, além de outros marcadores como CTLA-4 e GITR (*glucocorticoid inducible tumor necrosis factor receptor family molecule*) (Sakaguchi e Powrie, 2007). Essas células são anérgicas e, portanto, não proliferam bem e não secretam IL-2. Seu mecanismo de ação envolve o contato celular mais que a secreção de citocinas embora elas sejam dependentes, para sua sobrevivência e expansão, de IL-2 produzida por outros linfócitos T (Sakaguchi, 2004). Essa dependência de IL-2 exógena parece não ser somente um requisito importante para sua manutenção e funcionamento,

mas também para o controle da frequência dessas células no corpo. Recentemente, Almeida e colaboradores descreveram que a expressão do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) por essas células confere a elas uma vantagem na utilização da IL-2 secretada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados durante uma resposta imune clássica. Assim, se as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs) regulam a atividade de linfócitos ativados, esses últimos são capazes de regular o “pool” de células Tregs pela secreção de IL-2. Desta maneira, o equilíbrio das subpopulações de linfócitos T pode ser mantido independentemente do número absoluto desses linfócitos (Almeida e cols., 2006). Outros mecanismos são atribuídos à atividade das Tregs além de inibição contato-dependente da ativação e proliferação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T, tais como a destruição de APCs, de células T ou de ambas, e a supressão via secreção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (Vieira e cols., 2004; Sakaguchi e Powrie, 2007). Utilizando microscopia intravital de dois fótons, Tadokoro e cols. mostraram que o contato entre células T e DCs carregadas com antígeno tem duração mais curta na presença de Tregs do que em sua ausência (Tadokoro e cols., 2006). Em adição às nTregs, em torno de 10-15% de células T virgens 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 a proliferação homeostática (Curotto de Lafaille, 2004). O desenvolvimento periférico de Tregs Foxp3<sup>+</sup> pode representar um mecanismo de ajuda para aumentar o repertório de Tregs em locais anatomicamente especializados, como a mucosa intestinal, por exemplo.

Várias subpopulações de linfócitos T com fenótipo regulador induzido na periferia já foram descritos como importantes na indução de imunossupressão via mucosa oral, tais como: Th3, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Faria e Weiner, 2005). Algumas subpopulações de células reguladoras como, por exemplo, Th3 e Tr1 podem ser induzidas pela administração oral ou nasal de antígenos. Essas células exercem seu papel supressivo pela secreção de citocinas antiinflamatórias como TGF- $\beta$  e IL-10, respectivamente (Faria e Weiner, 2006). Utilizando modelo experimental de asma, Mucida e cols. mostraram que camundongos deficientes em Tregs naturais (nTregs) são altamente suscetíveis à indução de tolerância oral. A exposição oral ao antígeno nesses animais leva à geração de Tregs periféricas antígeno-específicas que expressam Foxp3 e CTLA-4. Esse trabalho mostra que a indução da tolerância oral não requer nTregs derivadas do timo já que Tregs com características similares são induzidas pela administração oral de antígeno. Entretanto, a tolerância é reduzida quando TGF- $\beta$  é bloqueado. Esse trabalho é consistente com a idéia de que a administração oral de

antígeno induz Tregs antígeno-específicas num processo que requer TGF- $\beta$  para indução de Foxp3 e, portanto, de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> periféricas (Mucida e cols., 2005).

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

Outras células que podem ser importantes na tolerância oral são as células dendríticas (DCs). Devido à sua capacidade de capturar e apresentar antígenos, as DCs estão intimamente envolvidas na ativação de linfócitos que podem participar tanto de atividades imunogênicas ou tolerogênicas (Steinman e Nussenzweig, 2002). A mucosa intestinal parece favorecer a diferenciação ou acúmulo de DCs tolerogênicas devido a um “ambiente imunológico” único baseado principalmente em duas citocinas envolvidas na indução de tolerância oral – IL-10 e TGF- $\beta$ . Esse “ambiente imunológico” atua, em parte, via DCs para induzir diferentes tipos de células T reguladoras. No entanto, existem vários questionamentos sobre o mecanismo pelo qual o ambiente da mucosa intestinal condiciona essas DCs (Weiner, 2001). Várias subpopulações de DCs com propriedades reguladoras (DCs CD103<sup>+</sup>) foram descritas com a capacidade de induzir secreção de IL-10 (uma citocina antiinflamatória) por células T ou induzir tolerância oral em condições fisiológicas. Essas DCs CD103<sup>+</sup> participam ativamente na geração *de novo* de células reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> por um mecanismo dependente de TGF- $\beta$  e ácido retinóico (Coombes, e cols., 2007, Sun cols., 2007). Estudos de Rescigno e cols. mostraram que células endoteliais do intestino condicionam o perfil tolerogênico de DCs induzindo expressão de CD103 via TGF- $\beta$  e ácido retinóico (Rescigno e cols., 2008).

O papel das células T CD8<sup>+</sup> na tolerância oral tem sido objeto de discussões desde sua primeira descrição cerca de trinta anos atrás. Trabalhos clássicos sugeriam que as células T CD8<sup>+</sup> eram células supressoras envolvidas na indução da tolerância oral (Richman e cols., 1978, Miller e Hanson, 1979). Apesar de vários estudos mostrarem

evidências de que essa subpopulação de células T possa ter um papel importante na tolerância oral, alguns aspectos da sua participação não são muito claros. Como tais células poderiam reconhecer antígenos exógenos oralmente administrados e como sua atividade supressiva é mediada são alguns destes aspectos incertos. Uma possibilidade seria que pelo menos algumas dessas células TCD8<sup>+</sup> possam pertencer à subpopulação de células T que expressam TCR  $\gamma\delta$  (Faria e Weiner, 2006).

O envolvimento de linfócitos T $\gamma\delta$  na indução e manutenção da tolerância oral foi demonstrado por estudos de Mengel e cols.. Esses autores relataram que o tratamento de camundongos com anticorpos monoclonais anti-TCR $\gamma\delta$  bloqueou a indução da tolerância oral *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o tratamento de animais já tolerantes com o mesmo anticorpo reverteu o fenômeno da tolerância (Mengel e cols., 1995). Esses dados foram confirmados por Ke e colaboradores que, utilizando camundongos geneticamente deficientes para a cadeia  $\delta$  do TCR, mostraram que nesses animais não foi possível induzir tolerância oral (Ke e cols., 1997). Além disso, clone de células intraepiteliais T $\gamma\delta$  inibem o desenvolvimento de células T citotóxicas (Kapp e cols, 2004) sugerindo que IELs  $\gamma\delta$  possuem propriedades imunoreguladoras.

Nesse trabalho, pretendemos estudar dois aspectos importantes das relações entre o envelhecimento e a tolerância oral. Em primeiro lugar, estudaremos se os elementos imuno-reguladores presentes na mucosa intestinal e descritos como importantes para a indução de tolerância oral estão afetados pelo envelhecimento. Além disto, estudaremos o papel do adjuvante hidróxido de alumínio utilizado na imunização após o tratamento oral na manutenção da tolerância oral durante o processo de envelhecimento.

## **2- OBJETIVOS**

## 2.1 – Objetivo Geral

Analisar as alterações decorrentes do processo de envelhecimento no tecido linfóide associado à mucosa e estudar a influência da imunização parenteral com o antígeno na presença de adjuvante na manutenção da tolerância oral a esse antígeno em camundongos.

## 2.2 – Objetivos Específicos

Avaliar alterações decorrentes do envelhecimento nos sítios de indução da tolerância oral;

Comparar a resposta imune de anticorpos secretados e séricos basais e antígeno-específicos em animais jovens e idosos;

Avaliar se há co-relação entre a frequência de linfócitos T reguladores presentes no baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer com a indução e manutenção de tolerância oral;

Avaliar por quanto tempo a tolerância oral, desencadeada por gavagem, é mantida na ausência de imunização parenteral com a mesma proteína dada por via oral;

Verificar se imunizações parenterais com adjuvante alteram o tempo de manutenção da tolerância oral;

Avaliar os mecanismos de ação do adjuvante  $Al(OH)_3$  possivelmente envolvidos na manutenção da tolerância oral.



### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, C57BL/6, C57BL/6 Foxp3-GFP (green fluorescence protein) *knockin* e DO11.10 (transgênico para o TCR reativo com o peptídeo 323-339 da ovalbumina) (Haskins e cols., 1983; Kearney e cols., 1994) fêmeas com idade entre 8 a 24 semanas no início do experimento. Os camundongos DO.11.10 possuem o fundo genético BALB/c e, na nossa colônia, contam com 60-85% dos linfócitos T circulantes positivos para o anticorpos KJ.17 (reativo com o TCR transgênico). Os camundongos Foxp3-GFP possuem um cDNA de proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) provenientes da *Aequorea Victoria* (água viva) (Okabe et al, 1997), sob o controle do gene FoxP3. Esse procedimento torna as células FoxP3+ constitutivamente fluorescentes. Os camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP knockin foram gentilmente cedidos pelo Dr. Howard Weiner, Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA e os camundongos DO.11.10 foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Imunobiologia, ICB-UFMG.

### 3.2- Antígenos

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

### 3.3 – Adjuvantes

Utilizou-se como adjuvante Hidróxido de Alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Alternativamente Ácido úrico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). ou OVA coagulada foram utilizados como adjuvante.

### **3.4 - Tratamento Oral para Indução de Tolerância Oral**

Doses de 20mg de OVA por camundongo foram administradas por gavagem (intubação gástrica). Para a gavagem utilizou-se uma agulha com ponta em esfera e comprimento necessário para chegar ao estômago, que foi introduzida pela cavidade oral.

### **3.5 - Preparo da OVA Coagulada e Inoculação**

Para obtenção da OVA coagulada foi utilizada uma solução de OVA 3 vezes cristalizada- Grade III (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 20%. Foram pipetados 30 µl da solução e colocados em lâminas de microscopia de fluorescência (12 wells) que em seguida foram levadas ao microondas por 2 minutos, potência máxima. Após a solidificação da OVA as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto overnight e em seguida re-hidratadas com PBS por 2 horas antes da implantação no dorso dos camundongos. Para inoculação os animais foram anestesiados utilizando 60µl de solução de Cloridrato de Ketamina (1,7mg/kg) e Xilazina (0,33mg/kg) e um pequeno orifício foi feito no dorso (subcutâneo) para a implantação da OVA.

### **3.6 – Obtenção do Soro**

Para obtenção do soro, os animais foram anestesiados utilizando 100 µl de solução de Cloridrato de Ketamina (1,7mg/kg) e Xilazina (0,33mg/kg). Em seguida, o sangue foi coletado através de uma incisão na veia axilar e coletado em tubos de centrifugação de 500µl. Após a coagulação do sangue, o soro foi separado através de centrifugação durante dez minutos, a 300g. O soro foi então armazenado a -20°C para posteriores análises.

### 3.7 - Obtenção das Fezes e Preparo para Dosagem de S-IgA

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

### 3.8 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de Anticorpos Anti-OVA

A avaliação dos anticorpos específicos anti-OVA presentes no soro e nas fezes dos camundongos foi realizada através do método *ELISA* (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4 °C com 100 µl de uma solução de OVA (20 µg/ml para anticorpos séricos ou 40 µg/ml para IgA secretória) em tampão de cobertura (tampão carbonato pH 9,6). No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200 µl PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente duas vezes em salina-Tween e incubadas com soro dos camundongos em diluição seriada de 1:100 a 1:12800 em PBS-caseína ou 200 µl de muco sem diluir durante uma hora a 37 °C. Como controle positivo e negativo, foram utilizados um soro imune e um soro normal, respectivamente. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas com 100 µl de uma solução de anticorpo de cabra anti-IgG1, IgG2a ou IgA de camundongo conjugado à peroxidase (Southern Biotechnology Ass, Inc.) na diluição de 1:15000 por uma hora à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com 100 µl de uma solução contendo 0,2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido

sulfúrico 2N. A absorbância ( $\lambda = 490$  nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

### **3.9 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de Anticorpos Totais**

As placas de ELISA foram incubadas com solução (100 $\mu$ l/poço) contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1mg/ml (*Southern Biotechnology*) 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  $\mu$ l/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05% Tween por duas vezes. Para a dosagem de IgG1, IgG2a sérica o soro foi diluído 1:2000 e 1:100 para IgA sérica. O sobrenadante das fezes foi diluído 1:20 para medida de S-IgA. 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. Anticorpos de cabra anti-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  $\mu$ l/poço). As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37°C. A seguir, foram lavadas e adicionou-se uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma) em um diluição 1:15000 (100 $\mu$ l/poço) em PBS- 0,25% caseína durante uma hora a 37°C. . A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2  $\mu$ l/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20  $\mu$ l/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ( $\lambda = 490$  nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

### **3.10 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de IgE Anti-OVA**

As placas foram incubadas com solução (50 $\mu$ l/poço) contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongos 0,5mg/ml (*Southern Biotechnology*) e diluídos (1:250) em tampão carbonato pH=9,6 por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200

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/50µL 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), 50µL/poço na concentração de 1:15000, por 1 hora; A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico 2N. A absorbância ( $\lambda = 490$  nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

### **3.11 - Ensaio Imunoenzimático para Medida de IgE Total**

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

### 3.12 – Preparação de Suspensão Celular

Baço e linfonodos mesentéricos de cada animal foram retirados e mantidos em meio de cultura incompleto (baços) e completo (linfonodos) em tubos FALCON de 15ml e mantidos em gelo e ambiente estéril até o plaqueamento das células. Os baços foram macerados em um macerador de vidro estéril em 3ml de meio RPMI incompleto e os linfonodos foram macerados com lâminas estéreis friccionando-as uma contra a outra em 2ml de meio RPMI completo em uma placa de Petri. As suspensões foram então transferidas para os tubos FALCON de 15ml e centrifugadas durante dez minutos a 300g, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspensionado em 500 µl de meio RPMI completo para os linfonodos mesentéricos. Para o baço as hemáceas presentes no *pellet* foram lisadas acrescentando-se 9 ml de água estéril seguida de PBS concentrado 10x. As suspensões celulares foram centrifugadas durante 10 minutos a 300g, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 ml de meio RPMI completo.

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 fragmentos de 0,5-1,0 cm. Os pequenos fragmentos foram colocados em tubos Falcon de 50 ml com 20 ml de HBSS gelado. Os intestinos foram lavados por três vezes com HBSS gelado. A seguir foram incubados com 25 ml de meio IEL por 30 minutos em *shaker* (150rpm/min) a 37°C. Os tubos foram submetidos a agitação mecânica por cerca de 30 segundos para que toda a camada de linfócitos intra-epiteliais fossem liberadas e separadas. 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 *shaker* (150rpm/min). Os intestinos foram macerados e novamente filtrados em redes de 70µm e 30 ml de meio IEL foram acrescentados para obtenção dos linfócitos da lâmina própria. Os tubos contendo células intra-epiteliais como da lâmina própria foram centrifugados a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 4,5ml de percol a 44% em um tubo de centrífuga 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. A fração de linfócitos foi vista 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 de meio completo.

### 3.13 – Contagem de Células Viáveis

O número de células viáveis nessa suspensão foi obtido contando-se alíquotas misturadas com uma solução de eritrocina em câmara de Neubauer. As concentrações das suspensões foram então todas padronizadas pela adição do volume necessário de meio RPMI completo para se obter  $1 \times 10^6$  células/well/100µl para cultura de células.

### 3.14 – Cultura de Células

As células foram plaqueadas (100 µl/poço) em placas de 96 poços (Falcon, Lincon Park) e incubadas por 72 horas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> com mais 100 µl de RPMI completo (controle negativo), 100µl OVA (1mg/well) ou 100 µl de solução do mitógeno Concanalina A (2µg/ml) (controle positivo). O sobrenadante foi coletado para análise de citocinas e as células remanescente utilizadas para ensaio de proliferação celular.

### 3.15 – Ensaio de Proliferação Celular

Após 72 horas de cultura celular o sobrenadante foi coletado e adicionado às células remanescente na placa 50µl de uma solução de timidina [metil-3H] a 40µCi/ml (sp ativ. 5 Ci/mmol). Após 12 horas, as células marcadas foram coletadas por Cell Harvester automático em um papel de filtro de fibra de vidro. Os discos do filtro foram colocados em tubos contendo líquido de cintilação não-aquoso e medida a radioatividade no contador beta. Os resultados foram expressos como a média aritmética da contagem em c.p.m.



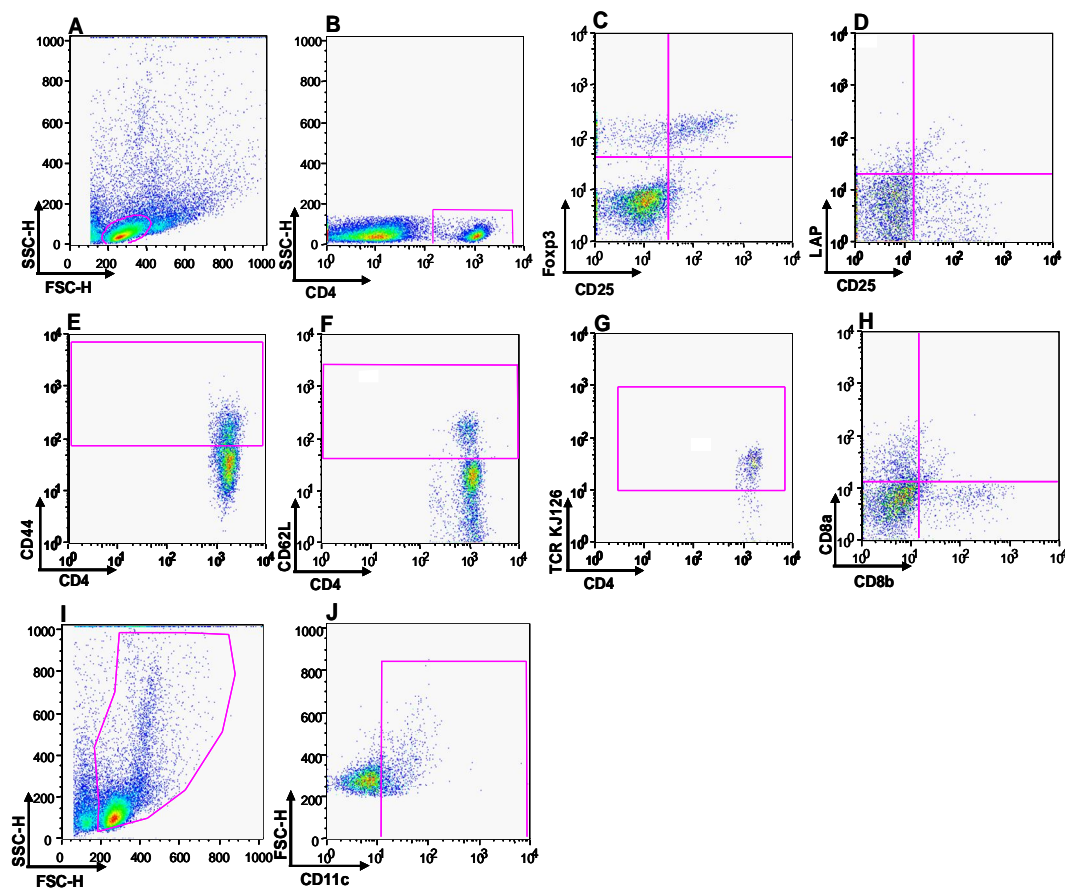
### 3.16 - Ensaio Imunoenzimático para Medida da Concentração de Citocinas

As placas foram sensibilizadas com 50 µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ , 1 µg/ml (R&D SYSTEMS), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina tween e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-caseína, por, no mínimo, 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram novamente lavadas e foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente 50 µl/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, IL-4 (BD Pharmingen) e TGF- $\beta$  (R&D SYSTEMS) marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/ml. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (50 µl/poço) (Southern Biotechnology Associate Inc.) em uma diluição de 1:15000 foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,4 mg/ml de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância ( $\lambda = 490$  nm) de cada poço foi obtida pelo leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

### 3.17 - 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 (250.000 – 500.000 células/well) e 10 µl de anticorpos (na diluição padronizada) conjugados com fluorocromos – PE(ficoeritrina), FITC(fluoresceína) ou CyChrome (Cy) – que se ligam às moléculas de interesse, tais como CD4, CD8, TCR $\gamma\delta/\alpha\beta$ , CD25, Foxp3, CD44, CD80/86, CD11c, F4/80 e LAP, expressas nas células de camundongos. As placas foram então encubadas a 4°C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foi então acrescentados 200 µl de PBS azida/poço para lavagem da placa que foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 300g. Essa lavagem foi realizada por três vezes. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuscitado em 200 µl de paraformaldeído 1% e as suspensões armazenadas a 4 °C e protegidas de luz

até aquisição em FACScan. No caso de anticorpos que não estavam marcados diretamente com fluorocromo (ex: conjugados a biotina), após a primeira lavagem as células foram incubadas com 10µl de solução contendo estreptavidina conjugada ao fluorocromo durante mais 30 minutos e posteriormente foram realizadas mais duas lavagens e as células foram então fixadas em paraformaldeído 1% para aquisição. Para marcação intracelular de Foxp3 as amostras foram permeabilizadas com PBS-saponina após fixação e então incubadas com o anticorpo anti-Foxp3 PE por 30 minutos a 4 °C. Em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com PBS-saponina e uma vez com PBS azida. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuspensionado em 200 µl de paraformaldeído 1% e as suspensões armazenadas a 4 °C e protegidas de luz até aquisição em FACScan. Em todos os órgãos foram utilizados os anticorpos IgG1 ou IgG2 FITC, PE ou CyChrome para controle negativo. A aquisição dos dados foi realizada utilizando um FACScan de três cores (Becton Dickison, Mountain View, Califórnia). A percentagem de células positivas foram analisadas através do software FlowJo (Tree Stars).



**Figura 1: Análise de leucócitos do baço por citometria de fluxo.**

A figura 1A representa um perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de linfócitos. A figura 1B representa HSC versus a população CD4+ (CY ou PE). As figuras 1C-G representam as poluções FL1 vs FL2 CD25+(FITC)Fcxp3+(PE), FL1 vs FL3 CD25+(FITC)LAP+(CY), FL3 vs FL2 CD44+(PE), FL3 vs FL1 CD62L+(FITC), FL3 vs FL1 TCRκ/λ/26+ (FITC) dentro de gate de CD4+. A figura 1H representa a população FL2 vs FL1 CD8a+(FITC)CD8b+(PE) dentro do gate de linfócitos. A figura 1I representa um perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de células totais. A figura 1J representa a população FSC vs FL2 CD11c+(PE).

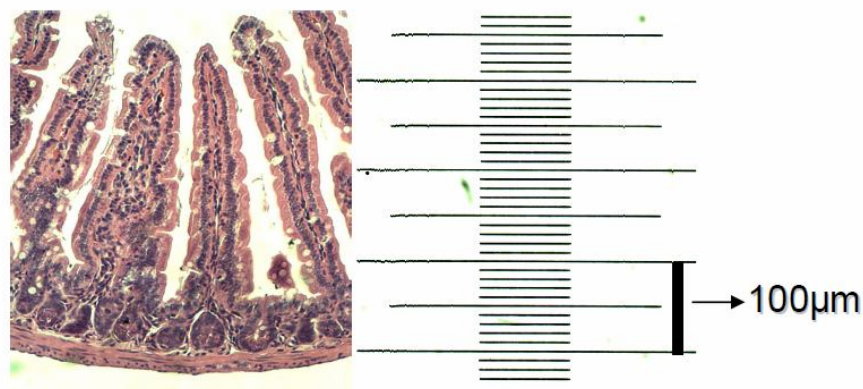
### 3.18 - Histologia do Intestino Delgado

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 jejunó 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

3µm 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.

### 3.19 - Morfometria dos Vilos Intestinais

Imagens do intestino coradas com HE foram capturadas a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB, em aumento de 100x. Os vilos foram medidos, descontando-se as criptas através de lamínula milimetrada como mostra a figura 8. O resultado foi apresentado pelas médias dos vilos de três animais por grupo.



**Figura 2: Morfometria dos vilos intestinais.**

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

### 3.20 - Contagem de Linfócitos Intraepiteliais

O epitélio foi examinado em aumento de 400X em microscópio óptico. Os 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.

### 3.21 - Separação de Células por Microesferas Magnéticas

Para separação de células dendríticas e células T foram utilizados microesferas magnéticas conjugados aos anticorpos anti-CD11c e anti-CD90 (Thy1.2). A separação foi feita por seleção positiva utilizando colunas MACs de acordo com as especificações sugeridas pelo fabricante.

### 3.22 – Soluções Utilizadas

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

Tampão Carbonato pH 9,6

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,015M

NaHCO<sub>3</sub> 0,035M

Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

NaCl 0,0015M

KCl 0,0081M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,1369M

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0027M

PBS-caseína

Tampão fosfato pH 7,2

Caseína 25%

Salina fisiológica

NaCl 0,85%

Salina-Tween

Salina fisiológica 0,85%

Tween 20 0,05%

Tampão Citrato pH 5

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M

Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) 0,1M

Solução de ácido sulfúrico

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N

Solução do substrato (por placa)

OPD: 4 mg

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2μl

Tampão citrato pH 5: 10 ml

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

PBS-azida

Tampão fosfato pH 7,2

Azida sódica 0,01%

PBS-W

Tampão fosfato pH 7,2

BSA (albumina sérica bovina) 5%

Fixador

NaCl: 0,15M

Paraformaldeído 1%

**C. Soluções usadas para obtenção de células da lâmina própria e intra-epitelial**

HBSS - pH 7,3

0.4 g de KCl;

0.06 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

0,35 g de NaHCO<sub>3</sub>;

8.0 g de NaCl;

0.04788 g de NaHPO<sub>4</sub>;

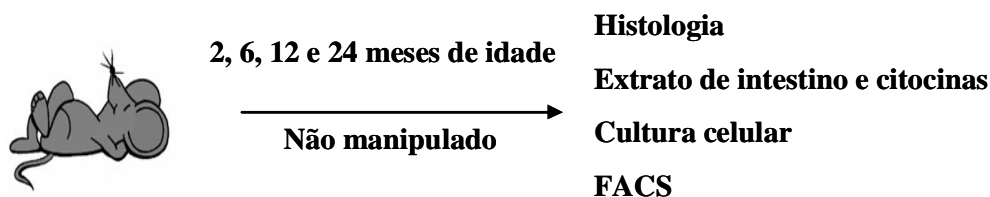
1 g de D-glicose;

0.011 g de vermelho de fenol;  
1000 ml de água bidestilada ou deionizada.

Meio IEL

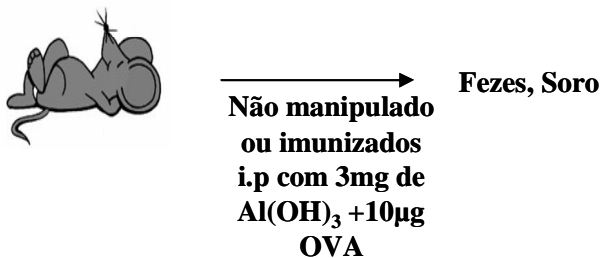
1000 ml RPMI  
20 ml de soro fetal bovino  
20 ml 1M Hepes buffer  
10 ml penicillin/streptomycin 100x  
0.50 ml gentamicina (40 mg/ml)

### 3.23 - Protocolos Experimentais



**Figura 3: Avaliação das alterações no sistema imune associado à mucosa na senescência.**

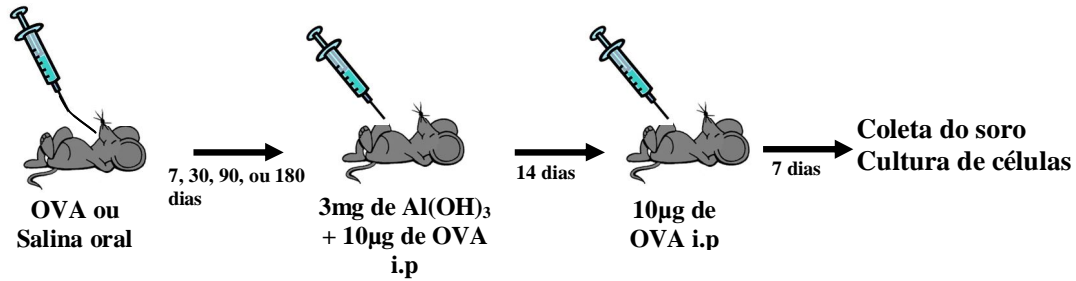
Camundongos BALB/c com idades entre 2 a 24 meses não manipulados foram anestesiados e sacrificados pra obtenção de soro e órgãos para avaliação basal de alterações no sistema imune. Número de animais/grupo : 5.



**Figura 4: Avaliação da resposta imune de anticorpos basais e antígeno-específicos.**

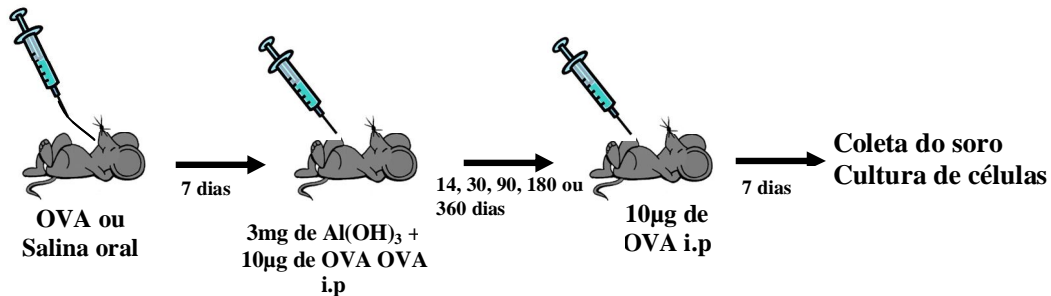
Camundongos BALB/c com idades entre 2 a 24 meses não manipulados ou imunizados com 10 µg de OVA e 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M) na cavidade peritoneal. Um desafio foi realizado 14 dias após a primária e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Sete dias após o desafio os animais foram sacrificados para obtenção de fezes e soro para avaliação dos títulos de anticorpos. Número de animais/grupo : 5.





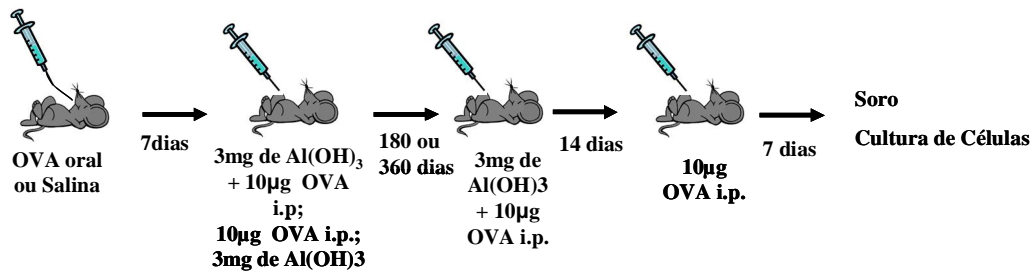
**Figura 5: Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> em tempos distintos após a indução da tolerância oral.**

Camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada em diferentes tempos: 7, 30, 90 ou 180 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção de 10 µg de OVA e 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M) na cavidade peritoneal. Um desafio foi realizado 14 dias após a primária e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Sete dias após o desafio os animais foram sacrificados para obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5.



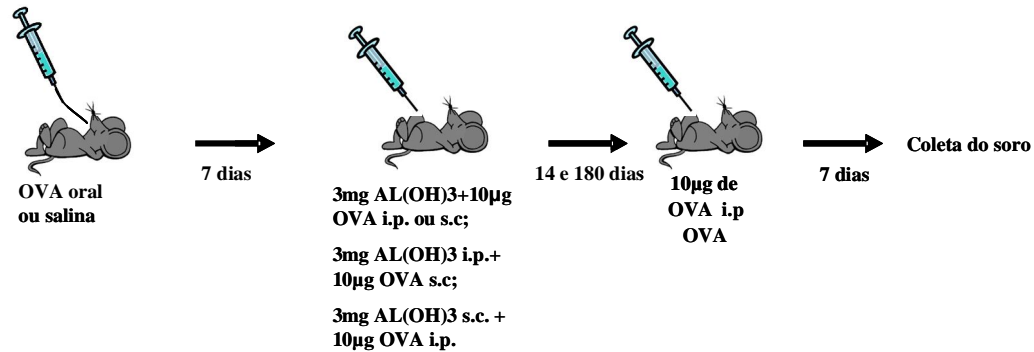
**Figura 6: Avaliação da manutenção da tolerância oral em animais imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após indução da tolerância oral.**

Camundongos BALB/c ou C57/B6 foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção, por via intraperitoneal de 10µg de OVA e 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M). Um desafio foi realizado em diferentes tempos: 14, 30, 90, 180 ou 360 dias após a primeira imunização, e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10 µg de OVA diluído em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Sete dias após o desafio os animais foram sacrificados para obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo: 5.



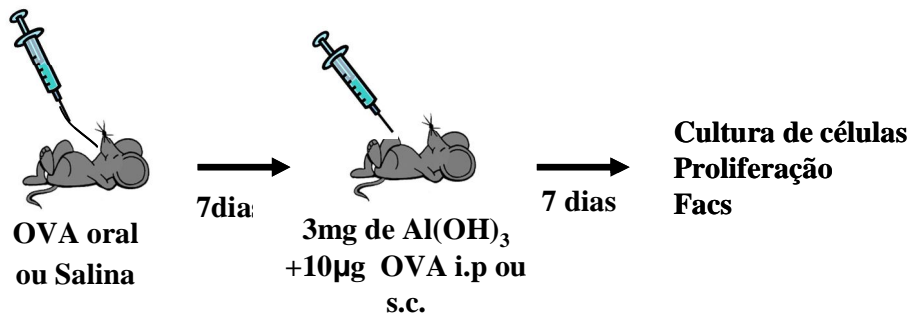
**Figura 7: Avaliação da importância da imunização com antígeno na presença de adjuvante na manutenção da tolerância oral.**

Camundongos BALB/c foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> ou 10µg de OVA solúvel ou 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M). A imunização secundária foi realizada 180 dias após a primeira imunização, e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10 µg de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Um desafio foi realizado por via intraperitoneal com 10 µg de OVA diluído em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Após 7 dias os animais foram sacrificados pra obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5.



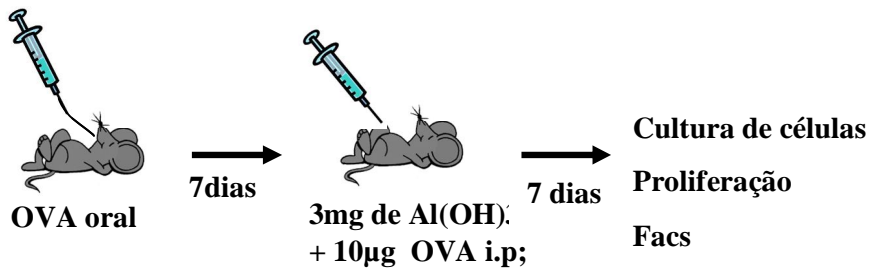
**Figura 8: Avaliação da importância da imunização com antígeno e adjuvante pela mesma via na manutenção da tolerância oral.**

Camundongos BALB/c foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção de 10µg de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> i.p.; 10µg de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> s.c.; 10µg de OVA i.p. + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> s.c.; 10µg de OVA s.c. + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> i.p.; diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M). Após 14 ou 180 dias os animais receberam um desafio por via intraperitoneal de 10 µg de OVA diluído em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Após 7 dias os animais foram sacrificados pra obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5.



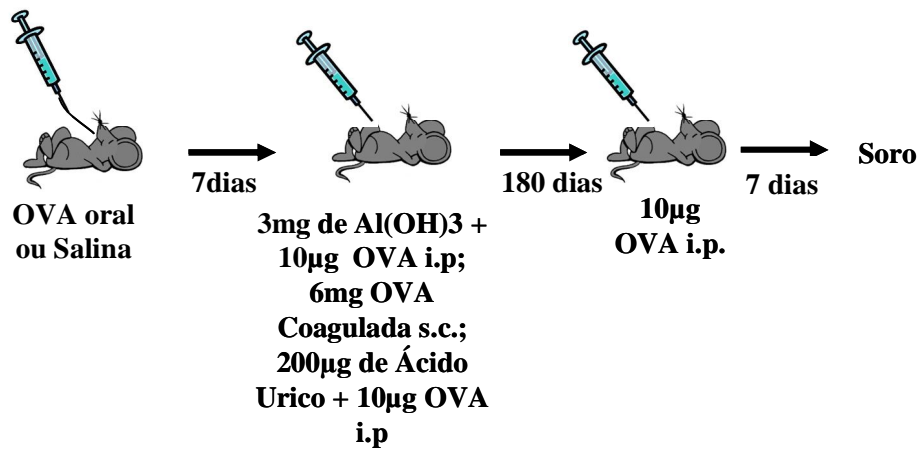
**Figura 9: Avaliação da indução da resposta imune celular após o tratamento oral com OVA seguido ou não por imunização com OVA +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  em camundongos DO11.10.**

Camundongos TCR transgênicos para OVA (DO11.10) foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, ou subcutânea de 10µg de OVA + 3mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M). Após 7 dias os animais foram sacrificados pra obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5.



**Figura 10: Avaliação do perfil celular, proliferação e produção de citocinas após tratamento oral com OVA na presença ou não de imunização com antígeno + adjuvante  $\text{Al}(\text{OH})_3$ .**

Camundongos C57BL/6 foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA + 3mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M). Após 7 dias os animais foram sacrificados pra obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5.



**Figura 11: Avaliação dos mecanismos de ação do adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> na manutenção da tolerância oral.**

Camundongos BALB/c foram tratados oralmente com OVA (grupos gavagem) ou salina (grupo controle imune). A imunização primária foi realizada 7 dias após o tratamento oral e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10µg de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, 200µg de ácido úrico + 10µg de OVA diluídos em 0,2ml de salina (NaCl 0,15M) ou inoculação subcutânea de 6mg de OVA particulada (coagulada). A imunização secundária foi realizada 180 dias após a primeira imunização, e consistiu na injeção, por via intraperitoneal, de 10 µg de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Após 14 dias os animais receberam uma nova injeção por via intraperitoneal de 10 µg de OVA diluído em 0,2ml de solução salina (NaCl 0,15M). Após 7 dias os animais foram sacrificados pra obtenção do soro e órgãos para suspensão de células. Número de animais/grupo : 5.

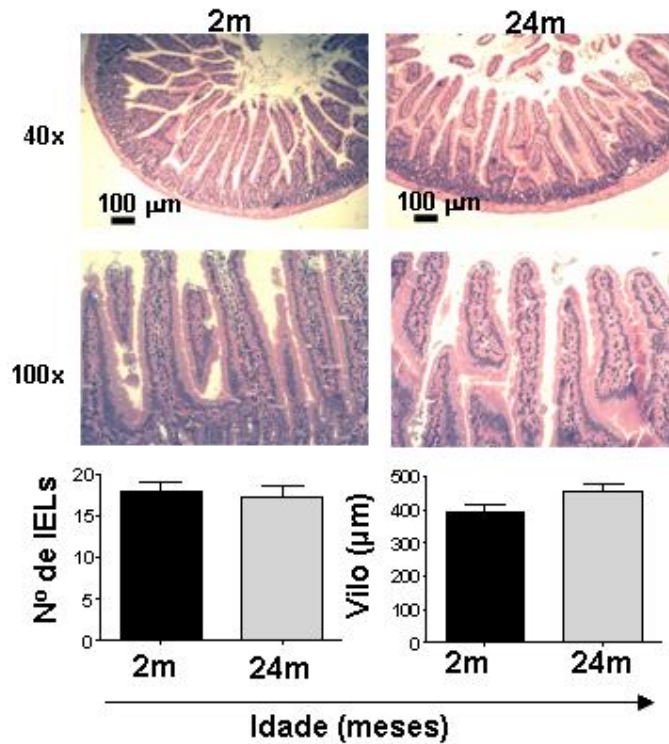
## **4 - RESULTADOS**

## Resultados Parte I:

Estudo Histomorfológico do Tecido Linfóide Associado à  
Mucosa Intestinal Durante o Envelhecimento.

#### **4.1 - Avaliação das Alterações Basais na Morfologia Intestinal e Perfil Celular das Células Intraepiteliais Durante o Envelhecimento**

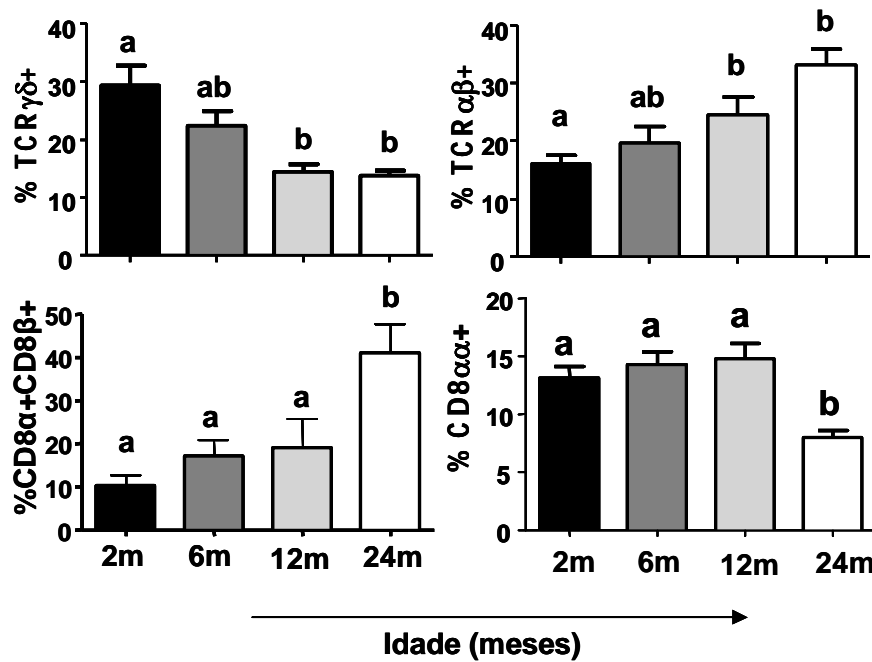
O envelhecimento é acompanhado de várias alterações no sistema imune que podem resultar numa redução na susceptibilidade à indução de tolerância oral (Faria e cols., 1993). Um dos objetivos deste trabalho foi analisar alguns parâmetros imunológicos, em especial na mucosa intestinal, que poderiam estar relacionados com a diminuição na susceptibilidade à indução da tolerância oral, associados ao envelhecimento. Foram utilizados camundongos BALB/c não manipulados de 2, 6, 12 e 24 meses de idade. Inicialmente analisamos a mucosa do intestino delgado (duodeno) com ênfase no número de células intraepiteliais e tamanho das vilosidades. Não foram observadas mudanças significativas no tamanho das vilosidades ou número de células intraepiteliais em animais de 24 meses quando comparados com animais de 2 meses de idade (Fig.12). Analisamos, então, o perfil celular no compartimento intraepitelial do intestino delgado desses animais e observamos uma diminuição na frequência de linfócitos T intraepiteliais  $TCR\gamma\delta^+$  em animais de 12-24 meses e  $CD8\alpha\alpha^+$  nos camundongos com 24 meses de idade, dois tipos celulares que são descritas como imunoreguladoras, e um aumento de  $TCR\alpha+\beta^+$  (Fig. 13). Por outro lado, células T  $CD8\alpha+\beta^+$ , que possuem função citolítica, estavam aumentadas nos animais idosos, com 24 meses de idade (Fig.13).



**Figura 12: Análise histomorfoplógica do intestino delgado.**

Camundongos BALB/c não manipulados com 2 e 24 meses de idades foram utilizados. O intestino delgado foi retirado para histologia. Os vilos intestinais foram medidos utilizando lamínula milimetrada e a média do tamanho de cinco vilos por animal foi determinada. O epitélio foi examinado em aumento de 400x em microscópio óptico e o número final de células intraepiteliais foi expresso em relação a 100 células epiteliais. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da contagem do número de células intraepiteliais e da medida da altura dos vilos. N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.



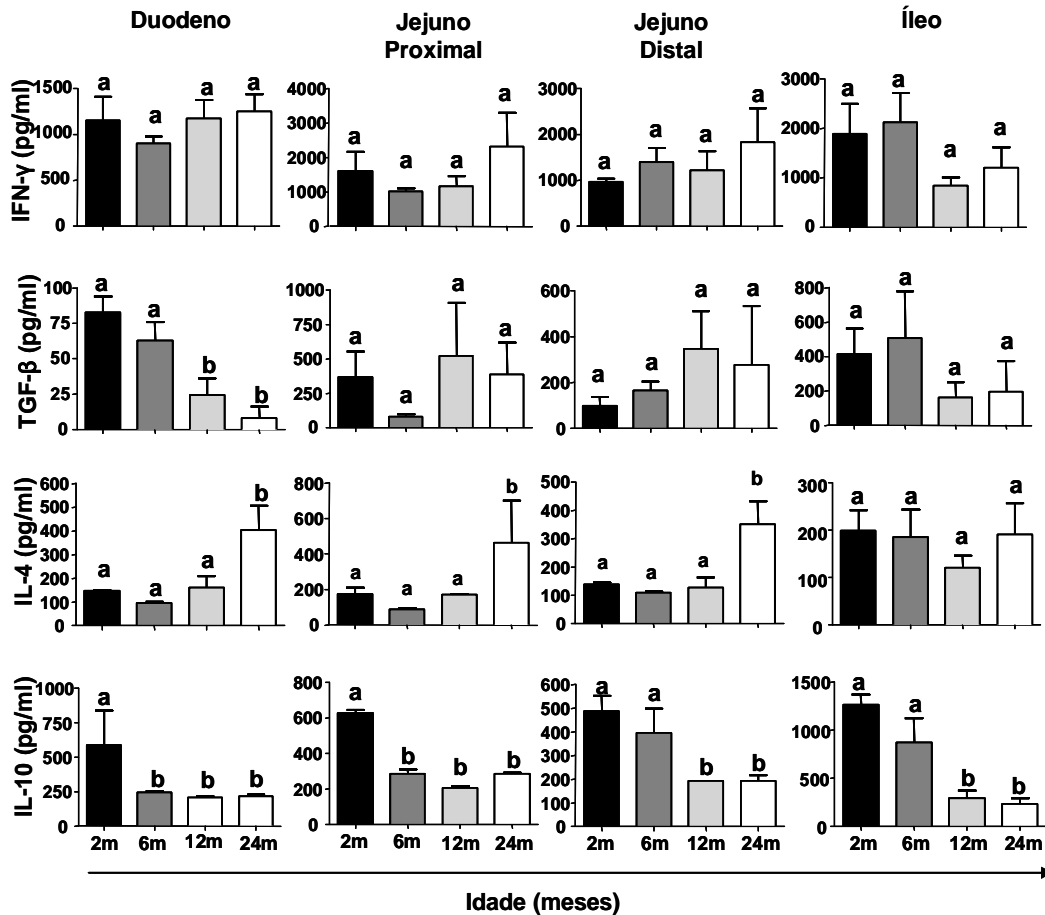


**Figura 13: Análise fenotípica de células intraepiteliais do intestino delgado.**

Camundongos BALB/c não manipulados com idades entre 2 a 24 meses foram utilizados. O intestino delgado foi retirado e uma suspensão de células intraepiteliais foram obtidas como citado em materiais e métodos. Para marcação fenotípica foram utilizados TCR  $\alpha\beta/\gamma\delta$  e CD8 $\alpha/\beta$  marcados com FITC, PE ou Cy. As células foram marcadas e a leitura feita por citometria de fluxo. As análises foram feitas dentro do gate de linfócitos utilizando FlowJo Tree Stars. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células. As letras a, b representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

#### **4.2 - Avaliação da Produção Basal de Citocinas no Duodeno, Jejunum Proximal, Jejunum Distal e Íleo Durante o Envelhecimento**

O intestino é um ambiente rico em citocinas anti-inflamatórias que favorecem a indução de células reguladoras e de tolerância oral (Weiner, 2001; Coombes, e cols., 2007, Sun cols., 2007). Assim, avaliamos a produção de citocinas descritas como envolvidas na indução de tolerância oral nas diferentes porções do intestino delgado (duodeno, jejunum proximal e distal e íleo) durante o processo de envelhecimento. Utilizamos camundongos BALB/c não manipulados de 2, 6, 12 e 24 meses de idade. Observamos um aumento na produção de IL-4 (que, em altas concentrações como na alergia, pode ser considerada inflamatória) nos animais de 24 meses, níveis inalterados de IFN- $\gamma$  (uma citocina pró-inflamatória) e redução nos níveis de TGF- $\beta$  em animais de 12 e 24 meses e de IL-10 (citocinas anti-inflamatórias com função importante na tolerância oral) em animais de 6-24 meses de idade (Figura 14). Essas alterações se localizaram especialmente na porção do duodeno onde ocorre a maior parte da digestão e absorção de alimentos (Fig. 14). Esses resultados sugerem que há uma redução na produção de citocinas reguladoras na mucosa intestinal durante o envelhecimento, o que poderia ser um dos fatores implicados na diminuição da susceptibilidade à indução de tolerância oral em animais idosos.

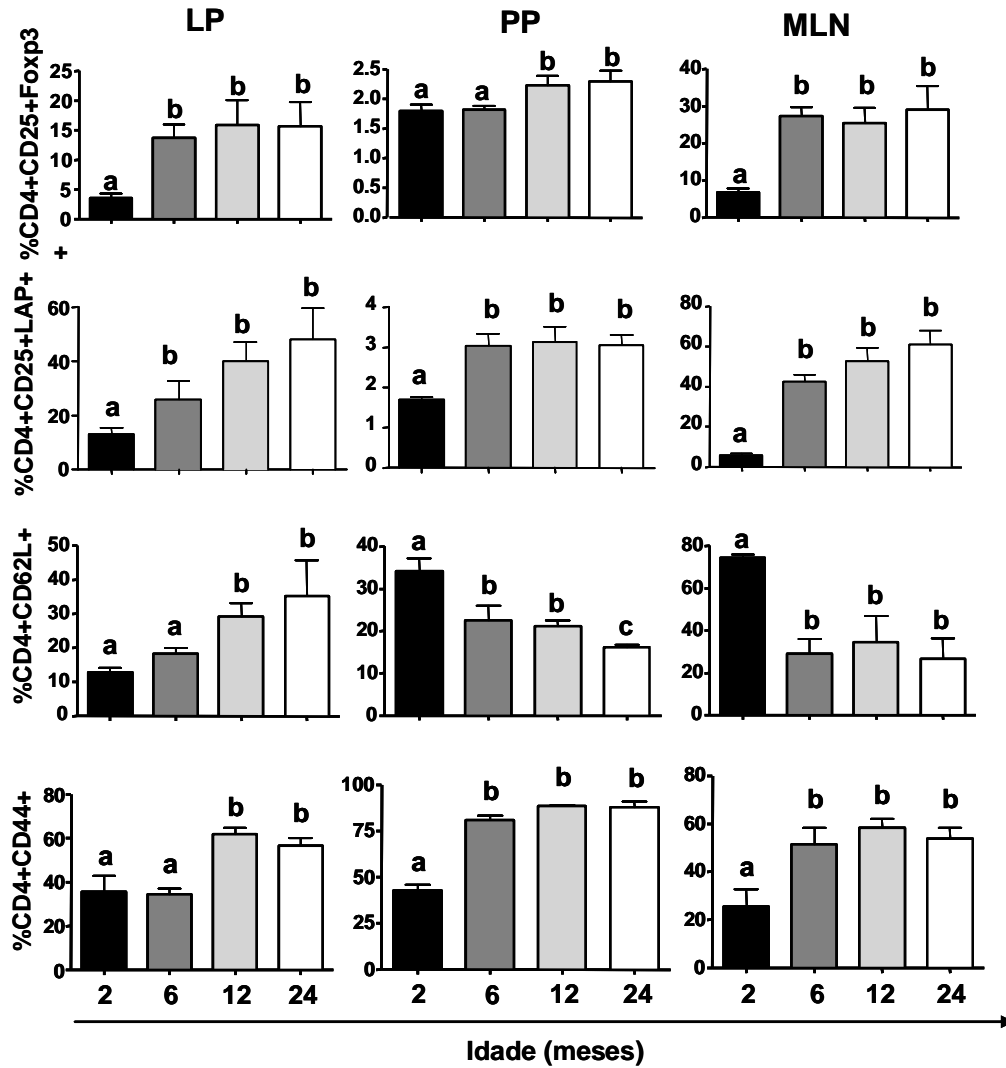


**Figura 14: Produção de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo.**

Camundongos fêmeas não manipulados, BALB/c de 2,6,12 e 24 meses de idade foram utilizados. O intestino delgado foi retirado e separado em porções, macerado e os níveis de citocinas avaliados por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 no sobrenadante. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células. As letras a, b representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

### **4.3 - Avaliação das Populações de Células T Naives, Ativadas e Reguladoras nos Principais Sítios de Indução de Tolerância Oral Durante o Envelhecimento**

Algumas populações de células reguladoras como CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+CD25+LAP+ são descritas como muito importantes para indução de tolerância oral (Faria e Weiner, 2005; Curotto de Lafaille et al, 2008). Nosso próximo passo então foi avaliar o perfil de células reguladoras, virgens e ativadas no tecido linfóide associado à mucosa intestinal durante o envelhecimento. Isolamos células da lâmina própria, das placas de Peyer e dos linfonodos mesentéricos e avaliamos a frequência de células CD4+CD44+, CD4+CD62L+, CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+CD25+LAP+. Como mostra a figura 15, ocorreu um aumento na frequência de células ativadas CD4+CD44+ e diminuição de células virgens CD4+CD62L+ nesses órgãos, exceto na lâmina própria onde houve um aumento de células CD62L+, com o envelhecimento. De uma forma geral, houve um aumento na porcentagem de células reguladoras tanto CD4+CD25+Foxp3+ como CD4+CD25+LAP+ a partir dos 6 meses de idade em todos os órgãos analisados (lâmina própria, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos) (Fig. 15). Esses resultados sugerem um perfil ativado de linfócitos no tecido linfóide associado à mucosa intestinal que se acentua ao longo do envelhecimento.

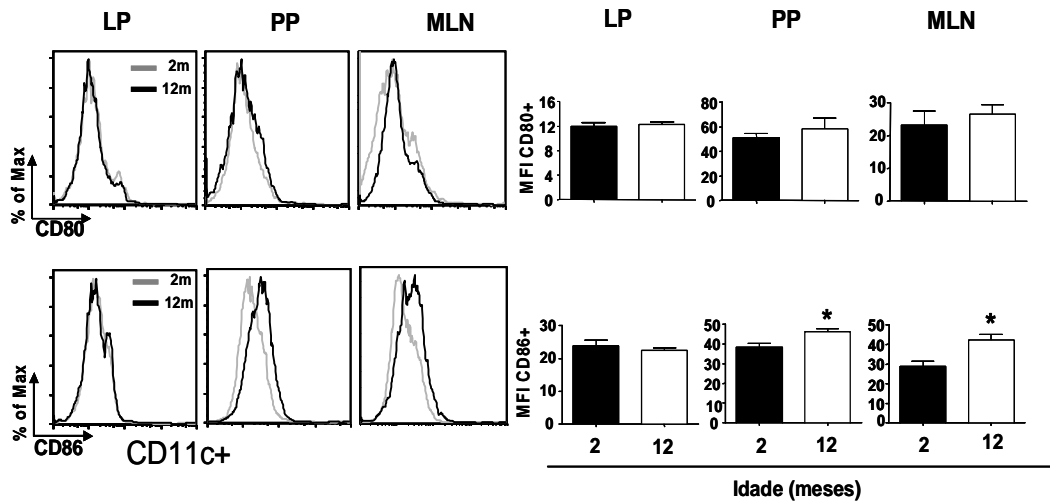


**Figura 15: Porcentagem de células CD4+CD62L+, CD4+CD44+, CD4+CD25+Foxp3 e CD4+CD5+LAP+ na lâmina própria (LP), placas de Peyer (PP) e linfonodos mesentéricos (MLN).**

Camundongos fêmeas não manipulados, BALB/c de 2,6,12 e 24 meses de idade foram utilizados. Os órgãos foram retirados e suspensão de células obtidas como citado em materiais e métodos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e a leitura feita por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4+. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células. As letras a, b representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

#### **4.4 - Avaliação das Populações de Células Apresentadoras de Antígenos nos Principais Sítios de Indução de Tolerância Oral Durante o Envelhecimento**

Devido à importância das células dendríticas (DCs) como células apresentadoras de antígenos e, portanto, na iniciação de atividades imunogênicas ou tolerogênicas (Steinman e Nussenzweig, 2002), nosso próximo passo foi analisar os efeitos do envelhecimento nessas células e a expressão, por elas, de moléculas de co-estimulação. Para esta avaliação, isolamos células da lâmina própria, placas de Peyer e linfonodos mesentérico e avaliamos o valor médio de fluorescência de células CD11c+CD80+ e CD11c+CD86+. Foram utilizados camundongos BALB/c não manipulados de 2 e 12 meses de idade. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão da molécula de co-estimulação CD86+ em DCs das placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de animais de 12 meses, mas não na lâmina própria (Fig.16). Não detectamos alteração com relação ao valor médio de fluorescência para CD80+ em DCs de nenhum dos órgãos analisados (Fig16).



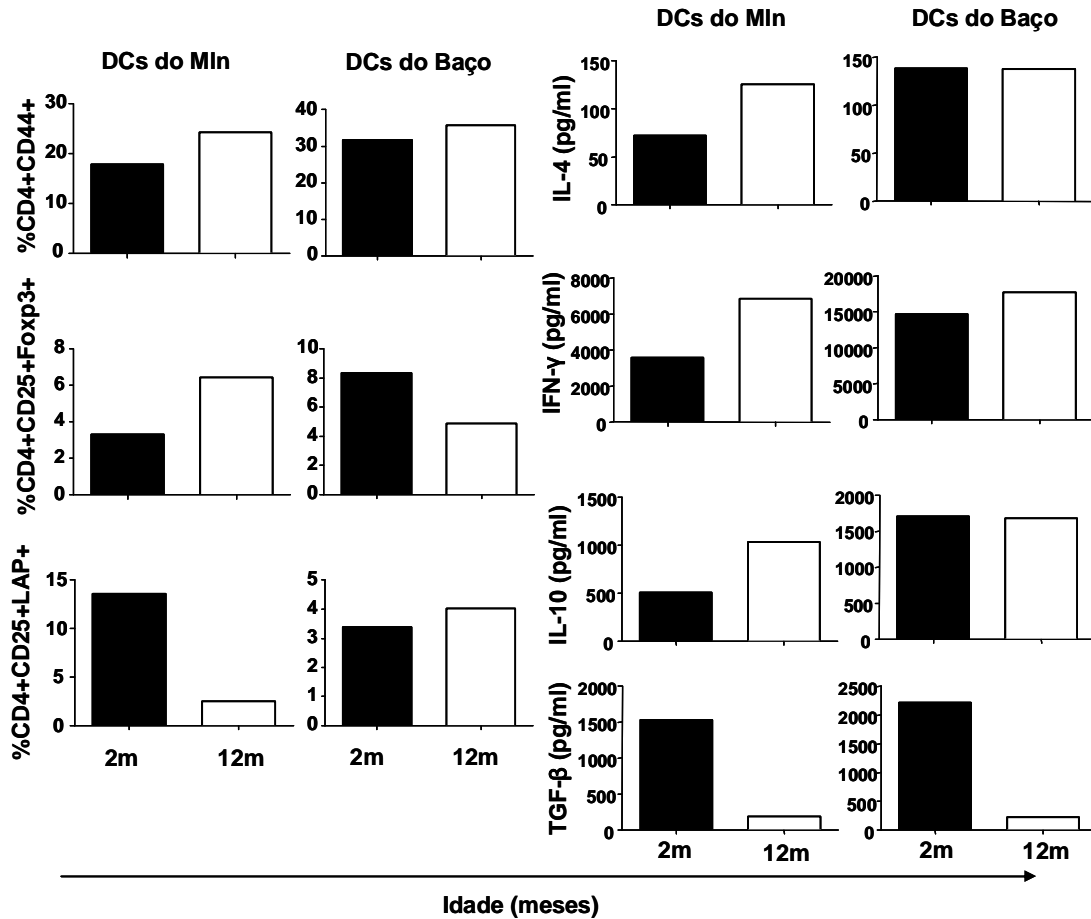
**Figura 16: Expressão de moléculas de co-estimulação CD80+, CD86+ em DCs da lâmina própria (LP), placas de Peyer (PP) e linfonodos mesentéricos (MLN).**

Camundongos fêmeas não manipulados, BALB/c de 2 e 12 meses de idade foram utilizados. Os órgãos foram retirados e suspensão de células obtidas como citado em materiais e métodos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As análises foram feitas utilizando FlowJo Tree Stars avaliando a expressão de CD80/86 pela intensidade média de fluorescência (MFI), dentro do gate de células CD11c+. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio da MFI. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\* $p < 0,05$ ). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

#### 4.5 - Avaliação da Funcionalidade de DCs do Baço e Linfonodo Mesentérico de Animais de 2 e 12 Meses de Idade

Nosso próximo passo foi avaliar se a capacidade de apresentação e ativação celular por DCs do baço ou linfonodos mesentéricos estaria alterada durante o envelhecimento. Para isto, utilizando separação de células por esferas magnéticas, purificamos células dendríticas de linfonodos mesentéricos e baços de camundongos BALB/c com 2 e 12 meses de idade, não manipulados, e células T de camundongos não manipulados DO11.10 jovens (2 meses de idade). Utilizamos células T de camundongos DO11.10 que possuem TCR OVA-específico para que não houvesse necessidade de imunização para ativação antígeno-específica de células T. Fizemos co-culturas de células dendríticas e células T, estimulando por 72h com 100µg/well de OVA. Notamos um aumento das citocinas IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 quando a co-cultura foi realizada com células dendríticas isoladas dos linfonodos mesentéricos de animais de 12 meses de idade. Não houve alterações quando as células dendríticas foram retiradas do baço de animais de 2 ou 12 meses de idade (Fig. 17). Notamos uma redução nos níveis de TGF- $\beta$  em co-cultura com células dendríticas de animais de 12 meses, independentemente da origem destas (linfonodos mesentéricos ou baço) (Fig.17). Em seguida, analisamos a expressão de marcadores de células reguladoras (Foxp3 e LAP) e de células ativadas (CD44) para avaliar o fenótipo das células após a co-cultura. Observamos um aumento na porcentagem de CD4+CD44+ quando utilizamos DCs de linfonodos mesentéricos de camundongos de 12 meses (Fig. 17). Por outro lado, também notamos um aumento na frequência de células CD4+CD25+Foxp3+ após co-cultura com células dendríticas provenientes de linfonodos mesentéricos e redução quando utilizamos DCs do baço de animais de 12 meses (Fig. 17). Contrariamente, observamos uma redução na porcentagem de células CD4+CD25+LAP+ após co-cultura com células dendríticas provenientes de linfonodos mesentéricos de animais de 12 meses, mas não de baço (Fig. 17).



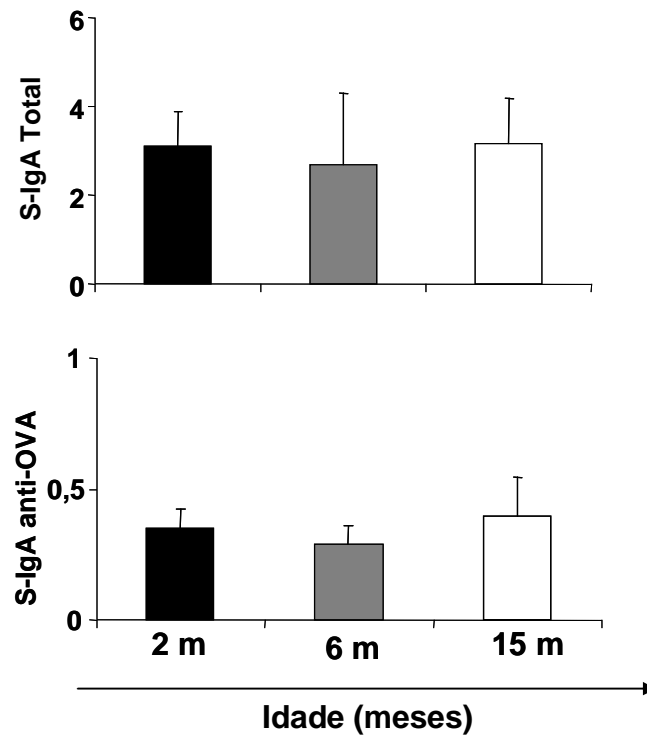


**Figura 17: Porcentagem de células CD4+CD44+, CD4+CD25+Foxp3+, CD4+CD25+LAP+ e Produção de IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  em co-cultura de células dendríticas de animais jovens e idosos com células T de animais DO11.10 jovens.**

Camundongos fêmeas não manipulados, BALB/c de 2 e 12 meses de idade e DO11.10 de 2 meses de idade foram utilizados. Células dendríticas dos linfonodos mesentéricos ou do baço de camundongos BALB/c jovens e idosos foram enriquecidas através de marcação microesferas magnéticas conjugadas a CD11c e separados através de colunas MACs. Co-cultura com células dendríticas de animais BALB/c de 2 ou 12 meses com células T de animais DO11.10 de 2 meses de idades foi realizada. Após 72 horas de cultura estimulada por 100 $\mu$ g de OVA/well os níveis de citocinas foram avaliados pelo método de ELISA. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e a leitura feita por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4+. As barras representam "pool" de 5 animais por grupo.

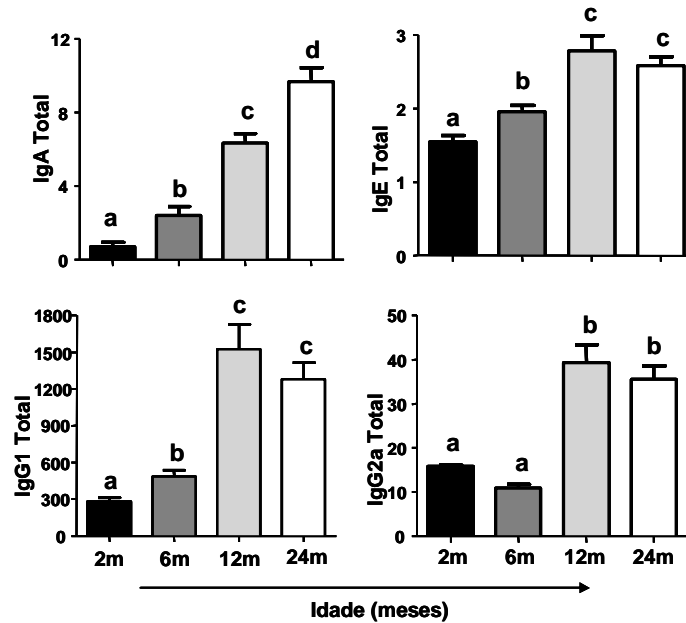
#### **4.6 - Avaliação da Produção de Anticorpos Durante o Envelhecimento**

Nossa próxima pergunta foi se a produção de anticorpos basais e antígeno-específicos estaria afetada durante o envelhecimento. Avaliamos em especial a IgA secretória (S-IgA), pela sua relação com a administração oral de antígenos. Também analisamos níveis séricos de IgA, IgE, IgG1 e IgG2a, imunoglobulinas normalmente utilizados para avaliação de tolerância oral. Para isto, foram utilizados camundongos BALB/c de 2, 6 e 12, 15 e 24 meses não manipulados para avaliação da produção basal de imunoglobulinas ou camundongos imunizados com OVA para avaliação de imunoglobulinas antígeno-específicas. Nossos resultados mostram que o envelhecimento não afeta a produção de S-IgA basal ou antígeno específica (Fig. 18). Por outro lado, os níveis basais séricos de IgA, IgE, IgG1 estavam aumentados em animais de 6, 12 e 24 meses e os de IgG2a estão aumentados a partir de 12 meses quando comparados aos de 2 meses de idade (Fig. 19). Como tais alterações na produção de anticorpos são bem evidentes aos 24 meses de idade, para avaliarmos o efeito do envelhecimento na resposta antígeno-específica, comparamos animais de 2 e 24 meses de idade. Verificamos que após imunização com OVA a resposta imune antígeno específica apresentou-se comprometida de acordo com níveis reduzidos de IgA, IgE, IgG1 e IgG2a em animais de 24 meses de idade (Fig.20). Esses resultados sugerem que, apesar do perfil ativado e de uma produção de S-IgA basal ou antígeno-específica preservada, animais senescentes não conseguem responder bem a novos antígenos, o que poderia justificar a redução na susceptibilidade à indução de tolerância oral em animais idosos.



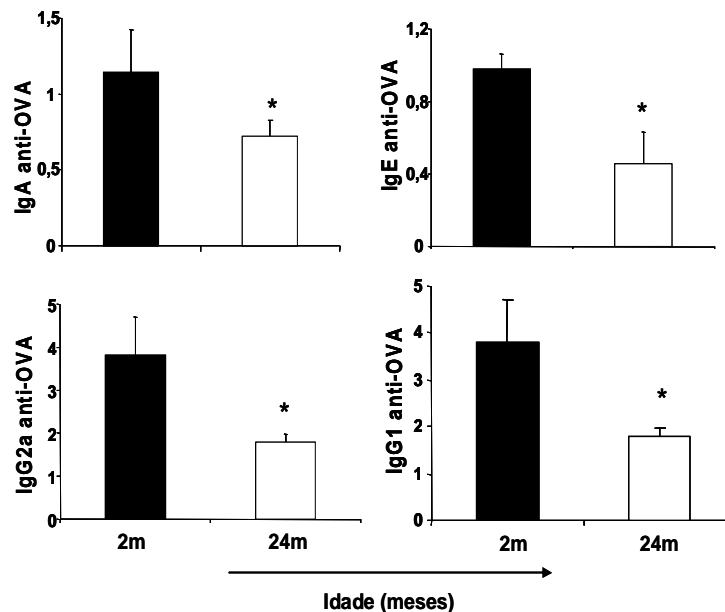
**Figura 18: Produção de S-IgA total e anti-OVA.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 2, 6 e 15 meses não manipulados ou imunizados i.p. com 10 $\mu$ g OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub> e desafiados com 10 $\mu$ g OVA 14 dias após a imunização foram utilizados. O conteúdo fecal foi colhido e S-IgA total e anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio das médias da concentração ( $\mu$ g/ml com os muco total S-IgA total) ou da somatória (O.D.SUM) de cada grupo ou diluídos (S-IgA anti-OVA) a partir de 1:10. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo ANOVA. N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.



**Figura 19: Produção de IgA, IgE, IgG1 e IgG2a basal.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 2, 6, 12 e 24 meses não manipulados foram utilizados. Os anticorpos séricos IgA, IgE, IgG1 e IgG2a foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) com os soros diluídos (IgA, IgE, IgG1 e IgG2a) a partir de 1:10. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo ANOVA. N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.



**Figura 20: Produção de IgA, IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 2 e 24 meses foram imunizados i.p. com  $10\mu\text{g}$  OVA +  $3\text{mg}$   $\text{Al}(\text{OH})_3$  e desafiados com  $10\mu\text{g}$  OVA 14 dias após a imunização foram utilizados. Os anticorpos séricos IgA, IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros totais (IgE) de cada grupo ou diluídos (IgA, IgG1 e IgG2a) a partir de 1:10. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\* $p < 0,05$ ). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

**Tabela 1: Resumo das alterações no tecido linfóide associado à mucosa intestinal durante o envelhecimento**

Parâmetros analisados	Idades analisadas	Alterações no envelhecimento
Tamanho dos vilos	2 e 24 meses	inalterado
Número de IELs totais	2 e 24 meses	inalterado
% de IELs TCR $\gamma\delta$	2, 6, 12 e 24 meses	↓ a partir dos 12 meses
% de IELs TCR $\alpha\beta$	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 12 meses
% de IELs CD8 $\alpha$ +CD8 $\beta$ +	2, 6, 12 e 24 meses	↑ aos 24 meses
% de IELs CD8 $\alpha\alpha$ +	2, 6, 12 e 24 meses	↓ aos 24 meses
IFN- $\gamma$ no intestino	2, 6, 12 e 24 meses	inalterado
TGF- $\beta$ no intestino	2, 6, 12 e 24 meses	↓ a partir dos 12 meses
IL-4 no intestino	2, 6, 12 e 24 meses	↑ aos 24 meses
IL-10 no intestino	2, 6, 12 e 24 meses	↓ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD25+Foxp3+ LP	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD25+Foxp3+ PP	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 12 meses
% de CD4+CD25+Foxp3+ MLN	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD25+LAP+ LP	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD25+LAP+ PP	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD25+LAP+ MLN	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD62L+ LP	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 12 meses
% de CD4+CD62L+ PP	2, 6, 12 e 24 meses	↓ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD62L+ MLN	2, 6, 12 e 24 meses	↓ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD44+ LP	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 12 meses
% de CD4+CD44+ PP	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
% de CD4+CD44+ MLN	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
MFI de CD80 em Dcs LP	2 e 12 meses	inalterado
MFI de CD80 em Dcs PP	2 e 12 meses	inalterado
MFI de CD80 em Dcs MLN	2 e 12 meses	inalterado
MFI de CD86 em Dcs LP	2 e 12 meses	inalterado
MFI de CD86 em Dcs PP	2 e 12 meses	↑ aos 12 meses
MFI de CD86 em Dcs MLN	2 e 12 meses	↑ aos 12 meses
% de CD4+CD44+ após co-cultura DCs MLN	2 e 12 meses	↑ aos 12 meses
% de CD4+CD44+ após co-cultura DCs Baço	2 e 12 meses	inalterado
% de CD4+CD25+Foxp3+ após co-cultura DCs MLN	2 e 12 meses	↓ aos 12 meses
% de CD4+CD25+Foxp3+ após co-cultura DCs Baço	2 e 12 meses	↑ aos 12 meses
% de CD4+CD25+LAP+ após co-cultura DCs MLN	2 e 12 meses	↓ aos 12 meses
% de CD4+CD25+LAP+ após co-cultura DCs Baço	2 e 12 meses	inalterado
IFN- $\gamma$ após co-cultura DCs MLN	2 e 12 meses	↑ aos 12 meses
IFN- $\gamma$ após co-cultura DCs Baço	2 e 12 meses	inalterado

IL-4 após co-cultura DCs MLN	2 e 12 meses	↑ aos 12 meses
IL-4 após co-cultura DCs Baço	2 e 12 meses	inalterado
TGF- $\beta$ após co-cultura DCs MLN	2 e 12 meses	↓ aos 12 meses
TGF- $\beta$ após co-cultura DCs Baço	2 e 12 meses	↓ aos 12 meses
IL- 10 após co-cultura DCs MLN	2 e 12 meses	↑ aos 12 meses
IL- 10 após co-cultura DCs Baço	2 e 12 meses	inalterado
IgA Secretória basal	2, 6 e 15 meses	inalterado
IgA Secretória antígeno-específica	2, 6 e 15 meses	inalterado
IgA Sérica basal	2, 6, 12 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
IgA Sérica antígeno-específica	2, 6, 12 e 24 meses	↓ aos 12 meses
IgE Sérica basal	2 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
IgE Sérica antígeno-específica	2 e 24 meses	↓ aos 24 meses
IgG1 Sérica basal	2 e 24 meses	↑ a partir dos 6 meses
IgG1 Sérica antígeno-específica	2 e 24 meses	↓ aos 24 meses
IgG2a Sérica basal	2 e 24 meses	↑ a partir dos 12 meses
IgG2a Sérica antígeno-específica	2 e 24 meses	↓ aos 24 meses

## Resultados Parte II

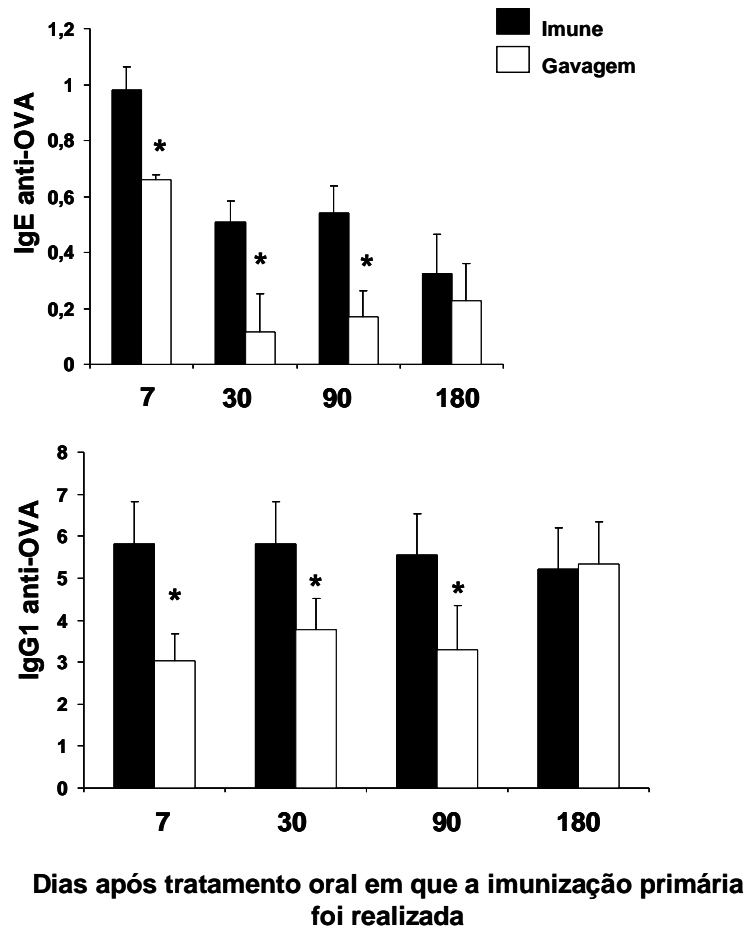
Papel dos eventos  
inflamatórios induzidos pela imunização na manutenção da  
tolerância oral durante o envelhecimento

#### **4.7 - Avaliação da Manutenção da Tolerância Oral em Animais Imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> em Tempos Distintos Após a Indução da Tolerância Oral**

Segundo Moreau e Gaboriau-Routhiau, a tolerância oral é mantida até 42 dias após tratamento oral com o antígeno (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996). No entanto, estudos prévios do nosso laboratório mostram que a tolerância oral pode ser mantida por um ano quando os animais são imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> (Faria et al, 1998). Assim, nosso objetivo foi avaliar a manutenção da tolerância oral em camundongos tratados oralmente com OVA e imunizados com o mesmo antígeno na presença do adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>, em diferentes tempos após o tratamento oral. Camundongos BALB/c fêmeas de 8 semanas de idade foram tratados por gavagem com 20mg de OVA (tolerante) ou salina (imune). Após 7, 30, 90 ou 180 dias, esses animais foram imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub>, desafiados com 10µg de OVA 14 dias após essa imunização primária e sangrados 7 dias após o desafio para análise dos títulos de anticorpos. De acordo com a figura 21, os animais pré-tratados com OVA por gavagem mantiveram a tolerância, tanto analisando os níveis de IgE como IgG1, por até 90 dias após o tratamento oral por gavagem ( $p < 0,05$ ). Após 180 dias do tratamento oral, a tolerância não pôde mais ser vista (Fig. 21).

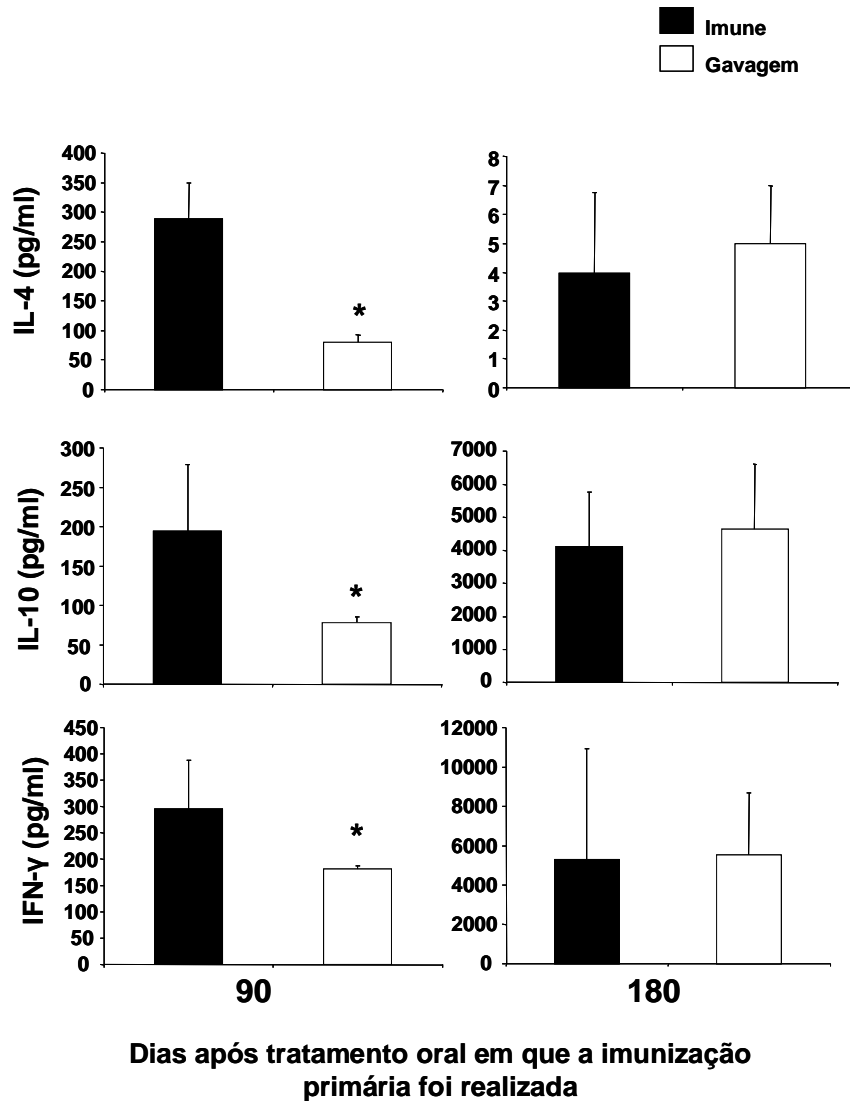
Nosso próximo passo foi medir a produção de IL-4, uma citocina pro-inflamatória Th2 induzida por Al(OH)<sub>3</sub>, IFN- $\gamma$ , uma citocina pro-inflamatória que não é induzida por Al(OH)<sub>3</sub> e que poderia teoricamente até estar aumentado nos animais tolerantes como mecanismo de controle da resposta Th2, e IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Nós avaliamos os níveis de citocinas nos grupos imunizados 90 e 180 dias após o tratamento oral para analisar se a tolerância oral poderia se manifestar pela alteração da produção dessas citocinas mesmo não se manifestando pela inibição da produção de anticorpos. Podemos observar na figura 22 que, nos animais pré-tratados com OVA por gavagem e imunizados 90 dias depois, ocorreu uma menor produção de todas as três citocinas avaliadas. No entanto, nos animais imunizados 180 dias após o pré-tratamento a produção dessas citocinas não foi diferente daqueles que não receberam o pré-tratamento com OVA (Fig. 22). Esses resultados mostram que a variação no tempo entre o pré-tratamento e a imunização afetou de forma equivalente a formação de IgE, IgG1 e a produção das citocinas IL-4, IFN-  $\gamma$  e IL-10. Podemos dizer que a manutenção ou não da tolerância oral nesses grupos não foi devida a um aumento de IL-10, já que a produção dessa citocina é menor no grupo tolerante do que no grupo controle imune.





### Figura 21: Produção de anticorpos séricos anti-OVA.

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



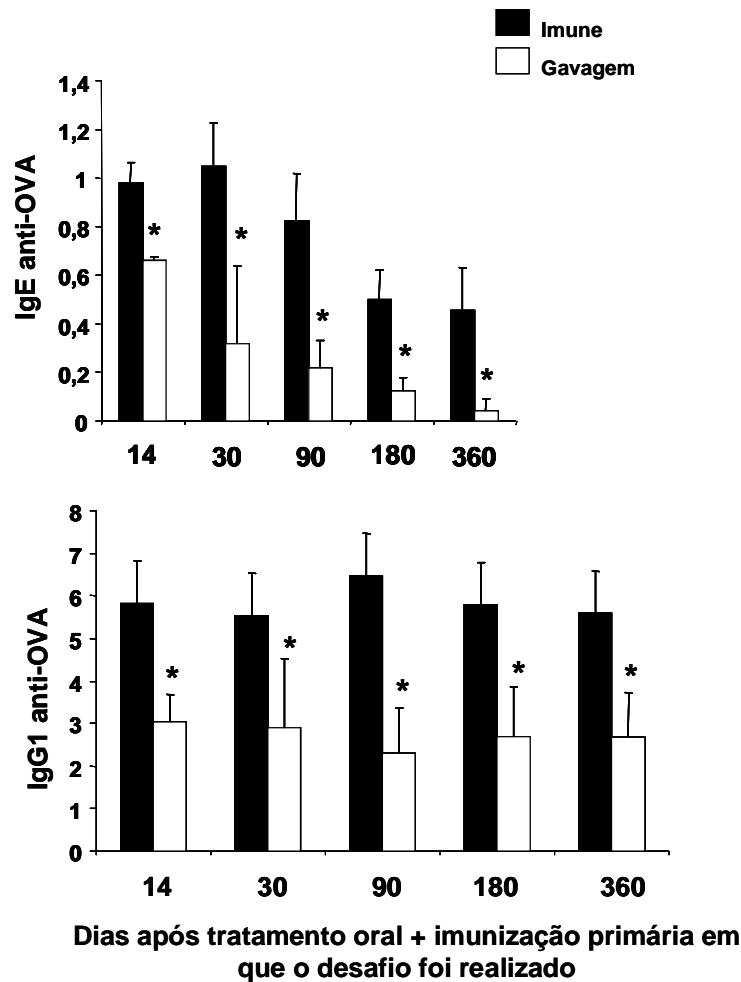
**Figura 22: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  por células do baço.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA (tolerante) ou salina por gavagem (imune) e imunizados i.p. 90 ou 180 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub>. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10 $\mu$  de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida das citocinas por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraído o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\*p<0,05). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

#### **4.8 - Avaliação da Manutenção da Tolerância Oral em Animais Imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 7 Dias Após Indução da Tolerância Oral**

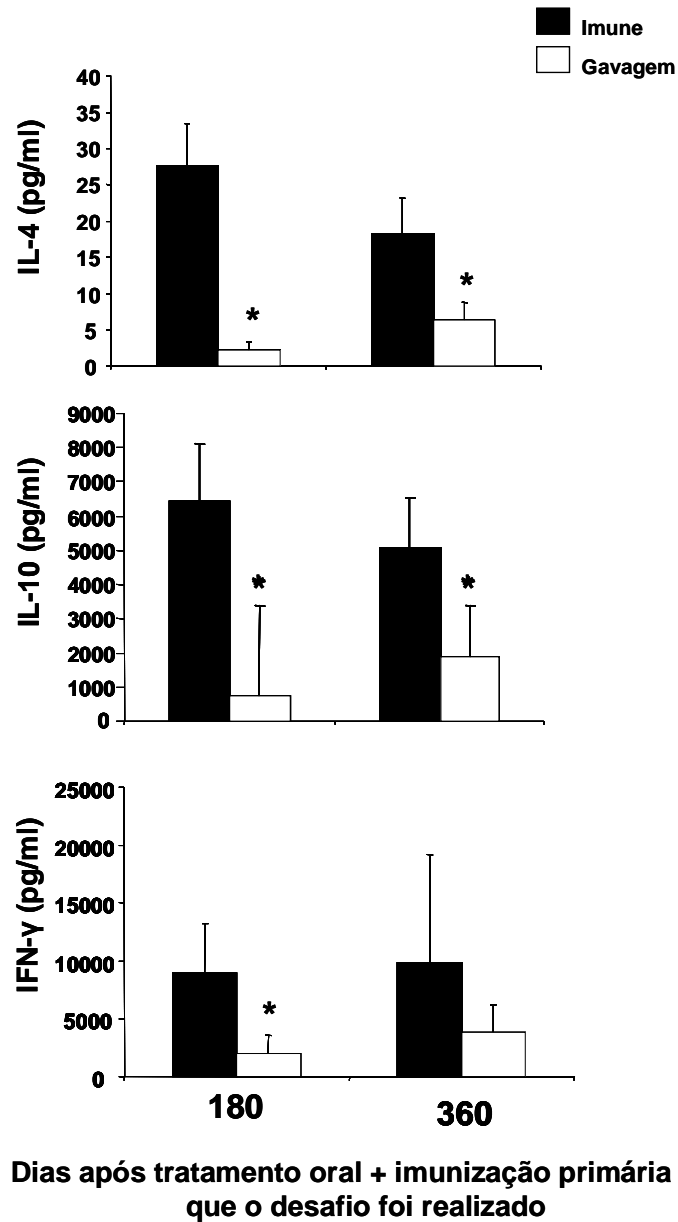
Trabalhos realizados pelo nosso grupo mostraram que a tolerância oral é mantida por até um ano em animais imunizados 7 dias após o tratamento oral com o antígeno OVA e adjuvante [Al(OH)<sub>3</sub>] (Speziali, 1999; Faria et al, 1998). Desta forma, nosso próximo objetivo foi avaliar a manutenção da tolerância oral em camundongos tratados oralmente com OVA e imunizados com o mesmo antígeno na presença do adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após o tratamento oral mas desafiados em tempos diferentes. Camundongos fêmeas BALB/c de 8 semanas foram tratados oralmente, por gavagem com 20 mg de OVA (tolerante) ou salina (imune) e imunizados i.p. com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após. Para a avaliação da manutenção da tolerância oral, os animais receberam um desafio i.p. com 10µg de OVA solúvel 14, 30, 90, 180 ou 360 dias após a imunização primária e foram sacrificados 7 dias após o desafio para obtenção do soro. A análise dos níveis de anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA mostram que, em animais tratados por gavagem e imunizados 7 dias depois na presença do adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>, a tolerância foi mantida por pelo menos um ano após o tratamento oral (Fig.23).

Ao avaliarmos a produção de IL-4 e IL-10, observamos a manutenção da supressão na produção dessas citocinas paralela à supressão da produção de anticorpos também por até um ano após o tratamento oral (Fig.24). No entanto, quando avaliamos a produção de IFN- $\gamma$ , observamos que a tolerância pôde ser vista até 180 dias após o tratamento oral, enquanto que, após um ano, o nível desta citocina é igual ao do grupo imune. Esses resultados mostram que a inibição da produção de IL-4 e IL-10 se mantiveram por mais tempo que a inibição da produção de IFN- $\gamma$ .



**Figura 23: Produção de anticorpos séricos anti-OVA.**

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



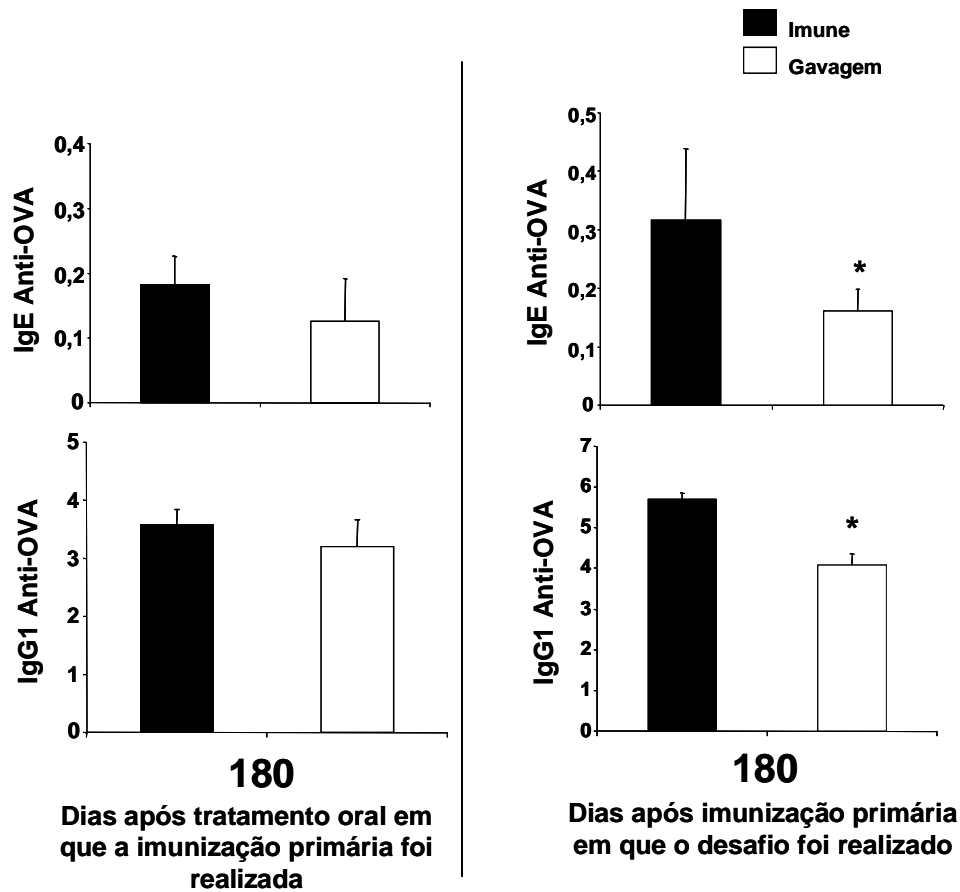
**Figura 24: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  por células do baço.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA (tolerante) ou salina por gavagem (imune) e imunizados i.p. 7 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Após 180 e 360 dias, os animais foram desafiados com 10 $\mu$  de OVA e sacrificados 7 dias depois para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida das citocinas por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraída o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\*p<0,05). N° de animais/grupo = 5.

#### **4.9 - Avaliação da Persistência da Tolerância Oral em Animais C57BL/6 Imunizados 7 Dias ou em Tempos Diferentes Após o Tratamento Oral com OVA**

Nosso próximo objetivo foi analisar se haveria alguma diferença no que diz respeito à manutenção da tolerância oral entre camundongos BALB/c e C57BL/6. Os mesmos protocolos citados anteriormente para camundongos BALB/c foram utilizados para camundongos C57BL/6.

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 semanas de idade foram tratados por gavagem com 20mg de OVA (tolerante) ou salina (imune). Após 180 dias, esses animais foram imunizados com OVA + Al(OH)<sub>3</sub>, desafiados com 10µg de OVA 14 dias após essa imunização primária e sangrados 7 após o desafio para análise dos títulos de anticorpos. Alternativamente, camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 semanas foram tratados por gavagem com 20 mg de OVA e imunizados i.p. com OVA + Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após. Os animais imunes receberam apenas salina por gavagem e foram imunizados após 7 dias. Para a avaliação da manutenção da tolerância oral, os animais receberam um desafio i.p. com 10µg de OVA 180 dias após a imunização primária e foram sacrificados 7 dias após o desafio para obtenção do soro. De acordo com nossos resultados, não houve diferença no tempo de manutenção da tolerância oral entre camundongos BALB/c e C57BL/6. Tanto para os níveis de IgE como de IgG1 anti-OVA, observamos que, em animais não imunizados sete dias após o tratamento oral, a tolerância não é mantida por 180 dias. Por outro lado, animais que são imunizados logo após o tratamento oral são capazes de se manterem tolerantes 180 dias após o tratamento oral (Fig.25).



**Figura 25: Produção de anticorpos séricos anti-OVA.**

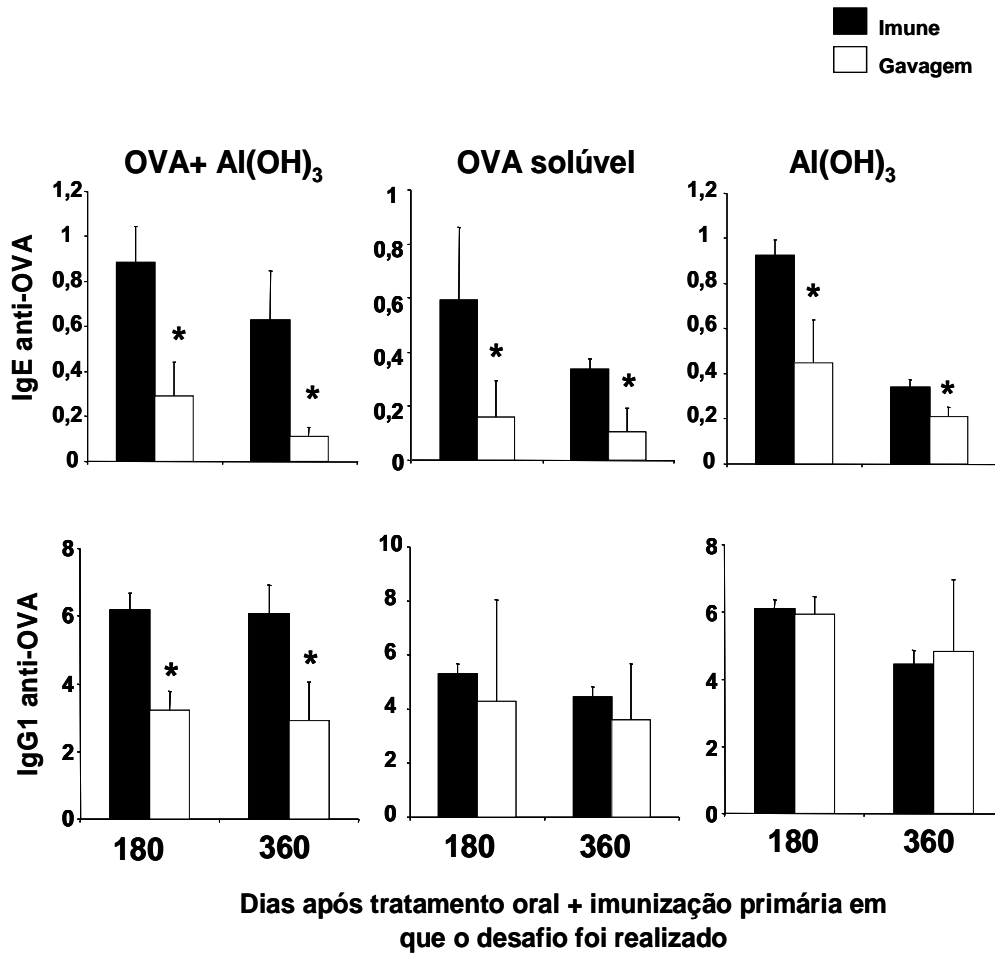
Camundongos fêmeas, C57BL/6 de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA (tolerante) a ou salina por gavagem (imune) e ) e imunizados i.p. 180 dias após com 10 $\mu$ g OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina. Os animais receberam um desafio com 10 $\mu$ g OVA 14 dias após a imunização primária e foram sangrados 7 dias após o desafio para verificação da manutenção da tolerância. Alternativamente os animais foram imunizados i.p. 7 dias após com após com 10 $\mu$ g OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina. Os animais receberam um desafio com 10 $\mu$ g OVA 180 dias após a imunização primária e foram sangrados 7 dias após o desafio para verificação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos IgE e IgG1 anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros totais (IgE) de cada grupo ou diluídos (IgG1) a partir de 1:10 A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\* $p < 0,05$ ). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

#### 4.10 - Avaliação da Importância da Imunização com Antígeno na Presença de Adjuvante na Manutenção da Tolerância Oral

Nosso próximo passo foi avaliar se a influência da imunização na manutenção da tolerância oral é devida somente ao adjuvante, somente ao antígeno ou se ambos devem estar presentes para que haja uma maior duração da tolerância oral.

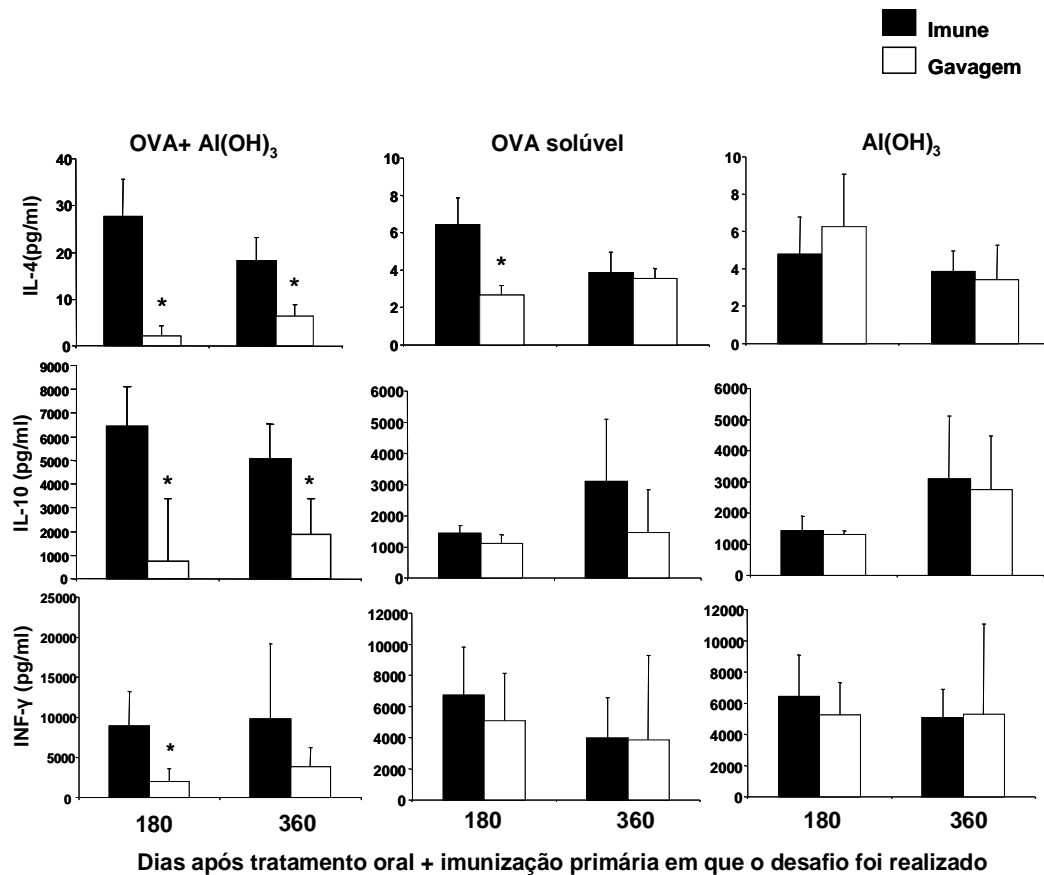
Camundongos fêmeas BALB/c de 8 semanas foram tratados por gavagem com 20 mg de OVA (tolerante) ou salina (imune) e imunizados i.p. com 10 $\mu$ g de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, 10 $\mu$ g de OVA solúvel ou 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> 7 dias após. Para a avaliação da manutenção da tolerância oral, os animais receberam uma segunda imunização com 10 $\mu$ g de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> 180 ou 360 dias após imunização primária. Decorridos 14 dias dessa imunização, os animais receberam um desafio i.p. com 10 $\mu$ g de OVA solúvel e foram sacrificados 7 dias depois para obtenção do soro. A imunização com antígeno na presença de adjuvante foi realizada para que os grupos controle que não foram pré-tratados com OVA por gavagem, mas receberam injeções i.p somente com Al(OH)<sub>3</sub> ou OVA solúvel pudessem se tornar imunes ao antígeno. Observamos, na figura 26, que a produção de IgE anti-OVA manteve-se menor até um ano após a gavagem com OVA em todos os grupos que receberam OVA por gavagem (Fig.26). Por outro lado, quando avaliamos os níveis de IgG1 anti-OVA o mesmo não pôde ser visto; somente o grupo que foi imunizado com antígeno+adjuvante se manteve tolerante. Um ano após o pré-tratamento com OVA oral, a produção de citocinas IL-4 e IL-10 também estava reduzida apenas no grupo que imunizado com OVA+adjuvante logo após o tratamento oral. No entanto, notamos níveis reduzidos de IL-4 por até 180 dias após o tratamento oral quando os animais receberam uma injeção i.p de OVA solúvel logo após o tratamento oral (Fig.27).





**Figura 26: Produção de anticorpos séricos anti-OVA.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA (tolerante) a ou salina por gavagem (imune) e imunizados i.p. 7 dias após com 10µg OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub>, 10µg OVA ou 3mg Al(OH)<sub>3</sub> diluídos em 0,2 ml de salina. Os animais receberam uma imunização com 10µg OVA + 3mg Al(OH)<sub>3</sub> 180 ou 360 dias após a imunização primária e desafio com 10µg OVA 14 dias após a imunização. Sete dias após foram sangrados para verificação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos IgE e IgG1 anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética ± desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros totais (IgE) de cada grupo ou diluídos (IgG1) a partir de 1:10 A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\*p<0,05). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.



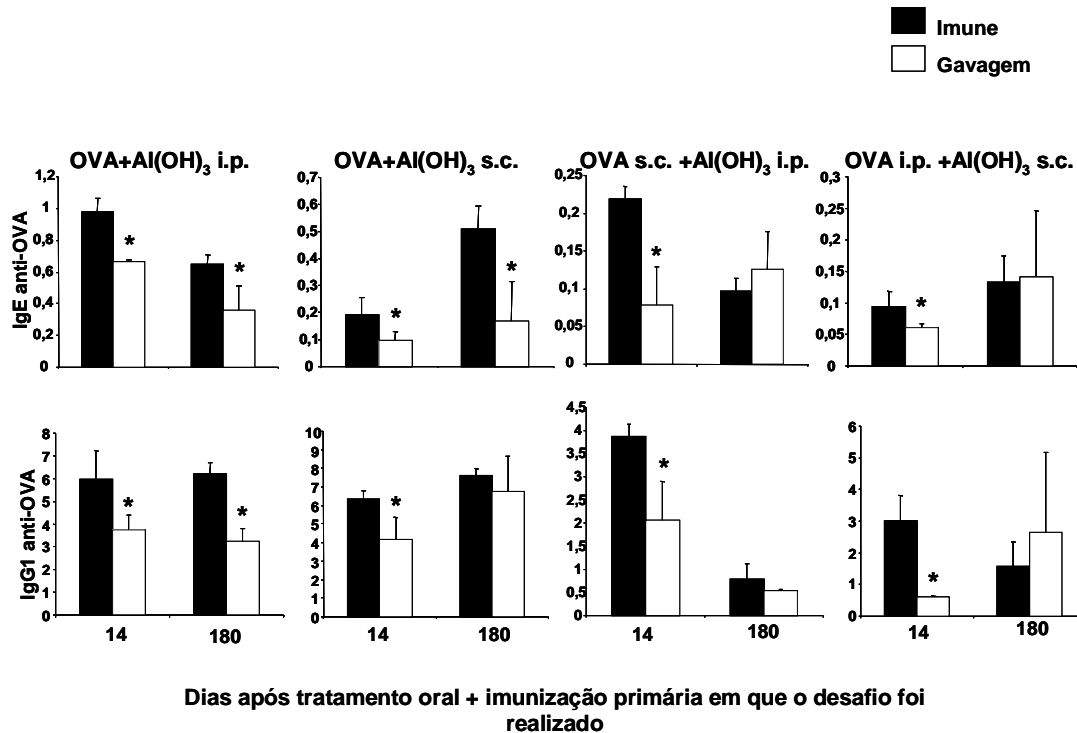
**Figura 27: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  por células do baço.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA (tolerante) ou salina por gavagem (imune) e imunizados i.p. 7 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, 10 $\mu$ g de OVA ou 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Os animais receberam uma imunização com 10 $\mu$ g OVA + 3mg Al(OH)<sub>3</sub> 180 ou 360 dias após a imunização primária e desafio com 10 $\mu$ g OVA 14 dias após a imunização. Sete dias após foram sacrificados para retirada dos órgãos. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida das citocinas por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraída o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\* $p < 0,05$ ). N° de animais/grupo = 5.

#### **4.11 - Avaliação da Importância da Imunização com Antígeno e Adjuvante pela Mesma Via na Manutenção da Tolerância Oral**

Como mostrado anteriormente o tempo de manutenção da tolerância oral é maior em animais que são imunizados 7 dias após o tratamento oral com antígeno e adjuvante administrados juntos. Desta forma, resolvemos avaliar se a via de imunização, intraperitoneal (i.p.) ou subcutânea (s.c.), afetaria ou não o tempo de manutenção da tolerância oral. Também avaliamos a necessidade de antígeno e adjuvante serem administrados pela mesma via para que haja manutenção de tolerância oral.

Camundongos fêmeas BALB/c de 8 semanas foram tratados por gavagem com 20 mg de OVA (tolerante) ou salina (imune) e imunizados com 10 $\mu$ g de OVA+3mg de Al(OH)<sub>3</sub> i.p.; 10 $\mu$ g de OVA+3mg de Al(OH)<sub>3</sub> s.c.; 10 $\mu$ g de OVA i.p. + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> s.c. ou 10 $\mu$ g de OVA s.c. + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> i.p. Para a avaliação da manutenção da tolerância oral, os animais receberam um desafio com 10 $\mu$ g de OVA solúvel i.p. 14 ou 180 dias após imunização primária e foram sacrificados 7 dias após o desafio para obtenção do soro. Como mostra a figura 28, para que a tolerância fosse mantida de acordo com os níveis de IgE não houve diferença na via de imunização i.p. ou s.c., porém ambos antígeno e adjuvante tiveram que ser administrados pela mesma via (Fig. 28). No entanto, para que a tolerância fosse mantida pela avaliação dos níveis de IgG1, foi necessário que antígeno e adjuvante fossem administrados juntos pela via intraperitoneal (Fig. 28). Uma possível explicação seria que as células apresentadoras em diferentes linfonodos drenantes podem ter características diferentes interferindo na apresentação do antígeno. Vale notar que, quando antígeno e adjuvante não foram administrados pela mesma via, não houve manutenção da reatividade inflamatória do animal, ou seja, o animal não se manteve imune. Desta forma, seria mais correto dizer que a imunidade não foi mantida, mas não se pode afirmar que a tolerância tenha sido perdida.



**Figura 28: Produção de anticorpos séricos anti-OVA.**

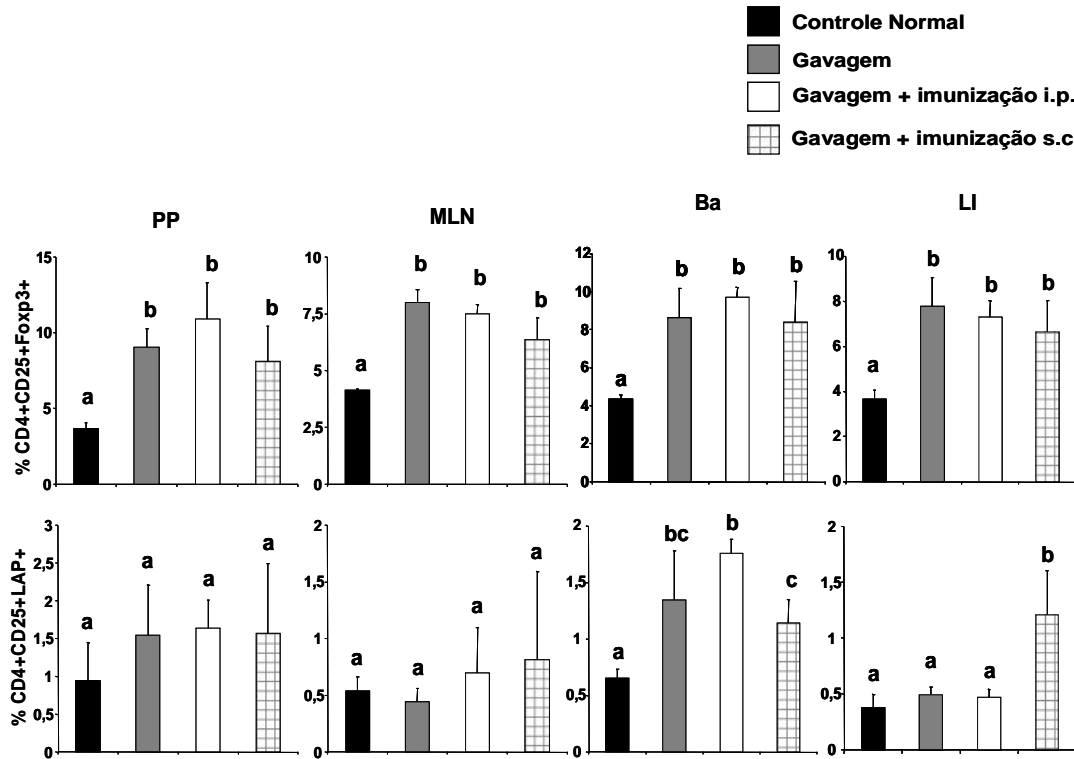
Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA (tolerante) a ou salina por gavagem (imune) e imunizados i.p. 7 dias após com após com 10 $\mu$ g OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub> i.p., 10 $\mu$ g OVA +3mg Al(OH)<sub>3</sub> s.c.; 10 $\mu$ g OVA s.c.+3mg Al(OH)<sub>3</sub> i.p.; 10 $\mu$ g OVA i.p.+3mg Al(OH)<sub>3</sub> s.c diluídos em 0,2 ml de salina. Os animais receberam desafio com 10 $\mu$ g OVA 14 ou 180 dias após a imunização. Sete dias após foram sangrados para verificação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos IgE e IgG1 anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros totais (IgE) de cada grupo ou diluídos (IgG1) a partir de 1:10 A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\* $p < 0,05$ ). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.

#### 4.12 - Avaliação da Indução da Resposta Imune Celular Após o Tratamento Oral com OVA Seguido ou não por Imunização com OVA +Al(OH)<sub>3</sub> em Camundongos DO11.10

Como as células reguladoras assim como algumas citocinas são descritas como importantes para a indução de tolerância oral, nosso próximo passo foi avaliar se o tratamento oral com OVA seguido ou não por imunização levaria a alguma alteração na frequência de células Foxp3<sup>+</sup> e LAP<sup>+</sup> e na produção de citocinas como IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Para isto, utilizamos camundongos transgênicos com TCR específico para OVA, o que tornaria mais fácil a visualização de pequenas alterações na resposta imune após a administração do antígeno ovalbumina. A frequência de linfócitos T portadores de TCR OVA-específico variou entre 60-80% nos animais utilizados. Camundongos DO11.10 fêmeas e machos com idade de 8 semanas foram tratados por gavagem com 20 mg de OVA (gavagem) ou salina (controle normal); tratados por gavagem com 20 mg de OVA e imunizados 7 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+3mg de Al(OH)<sub>3</sub> i.p. ou 10 $\mu$ g de OVA+3mg de Al(OH)<sub>3</sub> s.c. Foram utilizadas as duas vias de imunização devido ao fato de que a redução nos níveis de IgG1 só é mantida em animais imunizados por via intraperitoneal, mas não subcutânea, logo após o tratamento oral, como mostrado na figura 28. Em todos os animais que receberam o tratamento oral com OVA, independentemente de terem recebido uma imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> por via i.p. ou s.c. houve um aumento na frequência de células CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup> em todos os órgãos avaliados. Quando avaliamos linfócitos CD4+CD25+LAP<sup>+</sup>, observamos um aumento dessa população no baço em animais que foram tratados por via oral com OVA independentemente de terem sido imunizados. No entanto, a frequência de células LAP<sup>+</sup> estava reduzida no baço de animais imunizados por via s.c. quando comparados aos imunizados por via i.p. (Fig.29). Interessantemente, somente os animais tratados por via oral e imunizados por via s.c. apresentaram maior frequência de células CD4+CD25+LAP<sup>+</sup> no linfonodo inguinal (Fig.29). De uma maneira geral, esses resultados mostram que houve um aumento de células reguladoras Foxp3 em todos os órgãos avaliados e de células LAP<sup>+</sup> somente no baço logo após o tratamento oral com OVA e que a subsequente imunização seja por via i.p. ou s.c. não aumentou ainda mais essas populações celulares em animais DO11.10. Quando esses camundongos foram imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> por via s.c., houve uma redução de células Foxp3<sup>+</sup> no baço quando comparado ao imunizados i.p. embora o aumento de células LAP<sup>+</sup> no

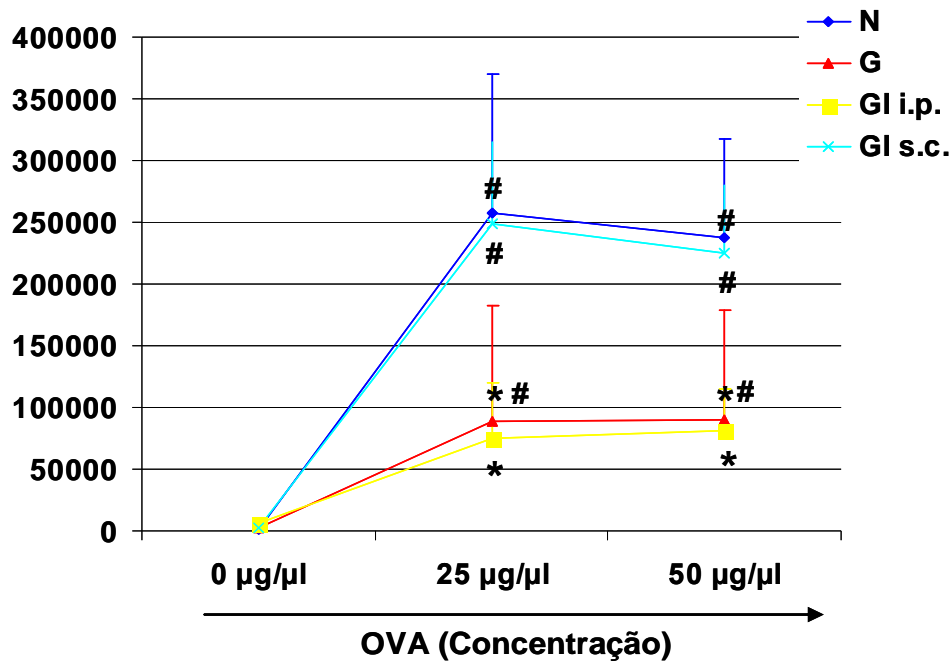
linfonodo inguinal só pôde ser observados nesses animais.

No ensaio de proliferação, notamos que linfócitos do grupo controle normal e tratado por via oral e imunizados por via s.c. proliferaram mais do que os grupos tratados com OVA e imunizados ou não por via i.p. (Fig. 30). Esse resultado sugere que a via intraperitoneal tem maior eficiência para indução de tolerância a OVA. Ao analisarmos os níveis de citocinas OVA-específica, observamos um aumento nos níveis de IL-4 e nenhuma alteração de IL-10 nos grupo tratados com OVA quando comparado ao grupo controle normal (Fig. 31). Curiosamente, notamos que os níveis de IFN- $\gamma$  estavam aumentados em animais que foram oralmente tratados com OVA somente no grupo tratado com OVA oral e imunizado com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> por via i.p., mas reduzidos em níveis comparáveis aos do grupo normal nos animais imunizados por via s.c. (Fig. 31). De uma maneira geral, nossos resultados mostram que houve um aumento de células reguladoras Foxp3 em todos os órgãos avaliados e de células LAP+ somente no baço logo após o tratamento oral com OVA e que a subsequente imunização seja por via i.p. ou s.c. não aumenta ainda mais a frequência dessas populações celulares em animais DO11.10.



**Figura 29: Porcentagem de células CD4+CD25+Foxp3 nas placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (MLN), baço (Ba), e linfonodo inguinal (LI).**

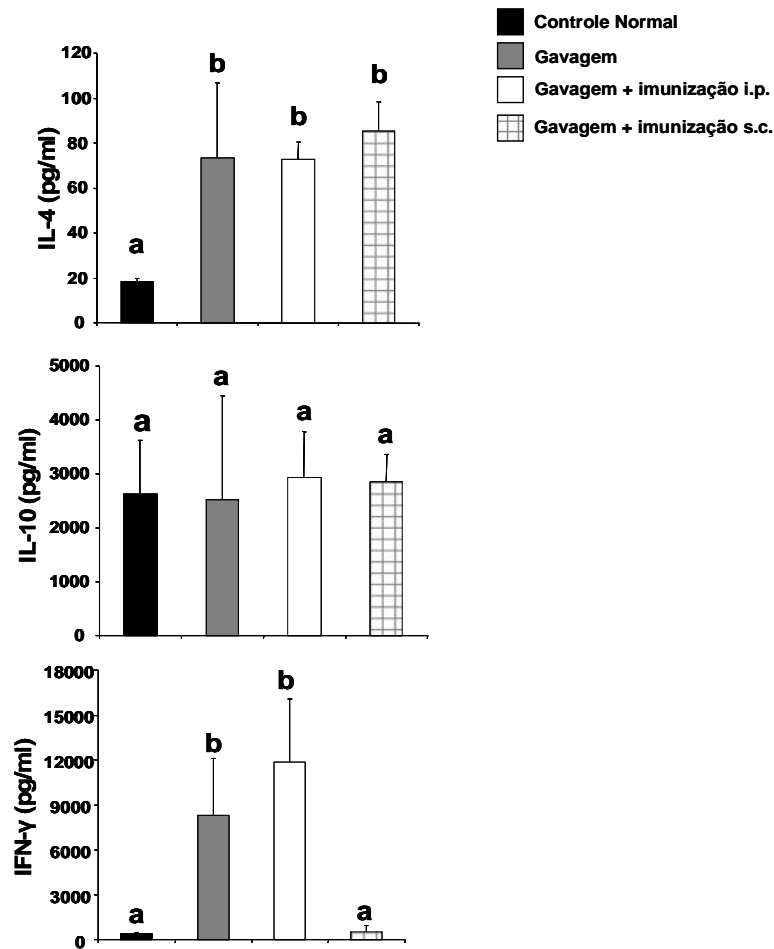
Camundongos fêmeas e machos, DO11.10 de 8 semanas foram tratados oralmente com 20mg de OVA (gavagem) ou salina (controle normal); tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p. ou s.c. 7 dias após com 10µg de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Sete dias após foram sacrificados para retirada dos órgãos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4+. As barras representam a média aritmética ± desvio padrão da porcentagem de células. As letras a, b e c representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N° de animais/grupo = 5.



**Figura 30: Ensaio de proliferação por células do baço.**

Camundongos fêmeas e machos, DO11.10 de 8 semanas foram tratados oralmente com 20mg de OVA (gavagem) ou salina (controle normal); tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p. ou s.c. 7 dias após com 10µg de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Sete dias após foram sacrificados para retirada do baço. As suspensões celulares obtidas foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado e foram então adicionados 50µl de timidina e após 12 horas a leitura foi realizada. Os resultados são expressos como média aritmética da contagem de células em c.p.m. Os símbolos \* e # representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N° de animais/grupo = 5.





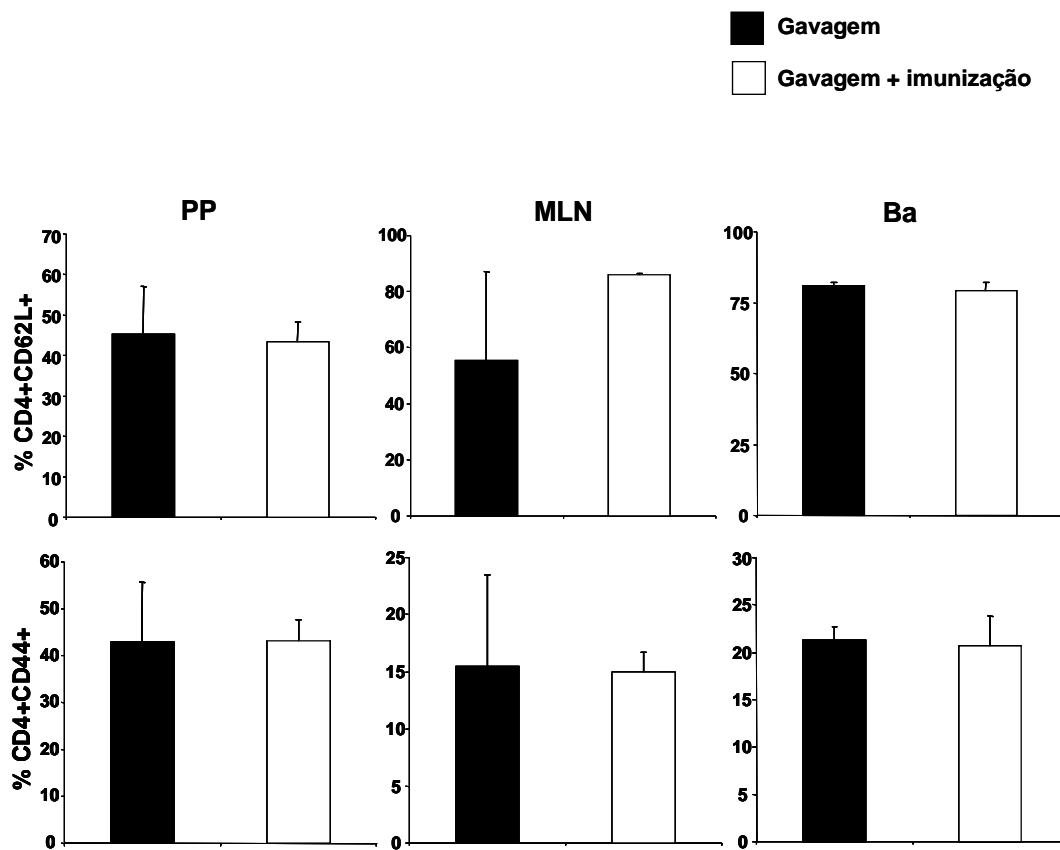
**Figura 31: Produção de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  por células do baço.**

Camundongos fêmeas e machos, DO11.10 de 8 semanas foram tratados oralmente com 20mg de OVA (gavagem) ou salina (controle normal); tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p. ou s.c. 7 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Sete dias após foram sacrificados para retirada do baço. As suspensões celulares obtidas foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida das citocinas por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4, IL-10 IFN- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraída o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células. As letras a, b representam a diferença estatística entre os grupos (ANOVA). N° de animais/grupo = 5.

#### **4.13 - Avaliação do Perfil Celular, Proliferação e Produção de Citocinas Após Tratamento Oral com OVA na Presença ou não de Imunização com Antígeno + Adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>**

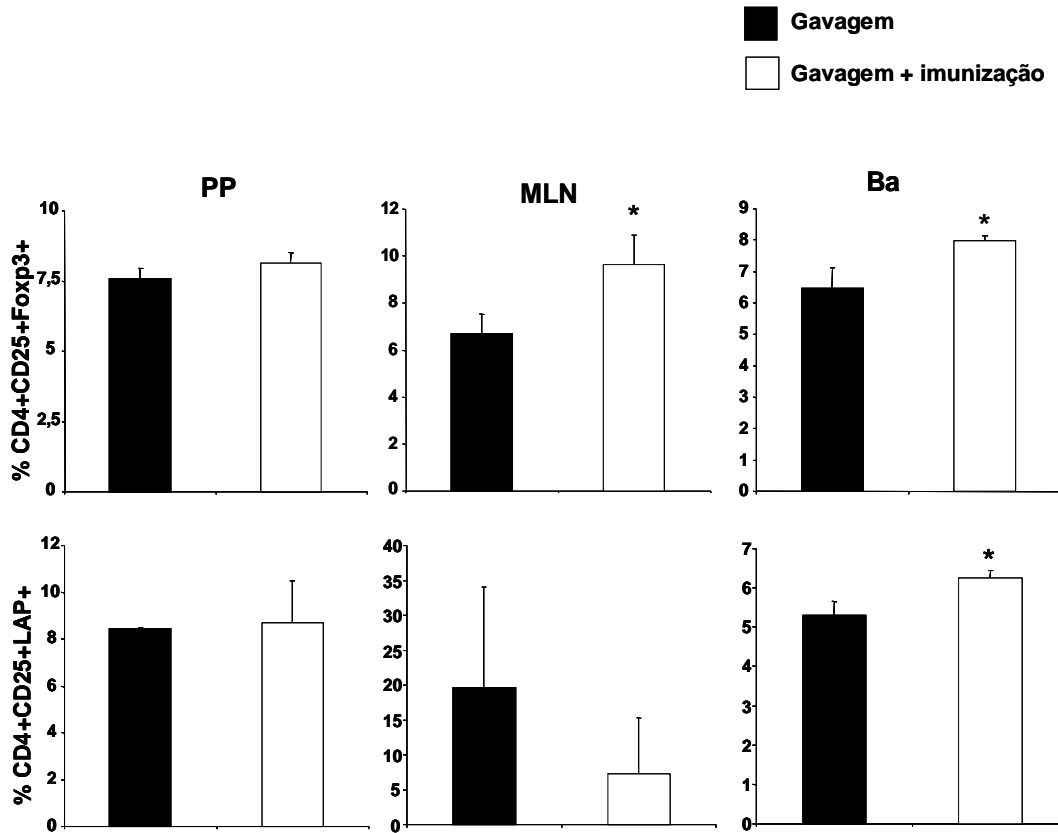
Como mostrado anteriormente, em camundongos DO11.10 transgênicos para o TCR reativo com OVA não foi possível visualizar uma diferença na resposta imune celular entre animais que somente receberam OVA oral e aqueles que foram subsequentemente imunizados. Devido ao fato de que a imunização com antígeno na presença de adjuvante logo após o tratamento oral aumenta o tempo de manutenção da tolerância oral, nosso próximo passo foi avaliar, em camundongos não transgênicos (com repertório normal de linfócitos T) que recebem OVA oral e foram imunizados ou não após 7 dias com OVA+Al(OH)<sub>3</sub>, se a inflamação desencadeada pela imunização com Al(OH)<sub>3</sub> induz um aumento de células reguladoras que poderiam estar envolvidas na manutenção da tolerância oral. Para avaliar essa hipótese, camundongos fêmeas C57BL/6 de 8 semanas foram tratados por gavagem com 20 mg de OVA e 7 dias após imunizados ou não i.p. com 10µg de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Sete dias após a imunização, foram retirados o baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer para análise celular por citometria de fluxo. Para avaliação de células reguladoras Foxp3+, utilizamos camundongos fêmeas e machos Foxp3 GFP knockin e camundongos C57BL/6 selvagens. Como mostra a figura 32, não houve alterações nas frequências de células T virgens CD4+D62L+ ou ativadas CD4+CD44+ após imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> logo após o tratamento oral com OVA. No entanto, quando avaliamos a população de células T reguladoras Foxp3+ notamos que a imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> foi capaz de induzir um aumento dessa população tanto no baço como nos linfonodos mesentéricos, mas não nas placas de Peyer em animais que são imunizados logo após o tratamento oral (Fig.32). Quando avaliamos a população de células CD4+CD25+LAP+, notamos um aumento da mesma somente no baço de animais imunizados após o tratamento oral (Fig.33). Esses resultados mostram, então, que, em camundongos não transgênicos, houve um aumento de células reguladoras 7 dias após imunização, em especial no baço. Em seguida, fizemos um ensaio de proliferação celular em animais tratados por via oral com OVA e imunizados ou não com OVA+ Al(OH)<sub>3</sub>. Observamos que houve um aumento da proliferação celular em animais que são imunizados após o tratamento oral com antígeno (Fig. 34). Quando avaliamos a produção de citocinas anti-OVA nesses animais, notamos uma redução nos

níveis de IL-4, aumento de IFN- $\gamma$  e nenhuma alteração de IL-10 em animais imunizados após tratamento oral quando comparamos aos que não receberam imunização (Fig.35). Esses resultados sugerem que a imunização com antígeno na presença de adjuvante gera uma resposta imunológica complexa envolvendo regulação e ativação e que tal imunoreatividade amplificada pelo efeito inflamatório do adjuvante pode então fortalecer a memória para o antígeno. Essa memória se traduz, nos camundongos que receberam o tratamento oral previamente, em aumento do tempo de manutenção da tolerância oral.



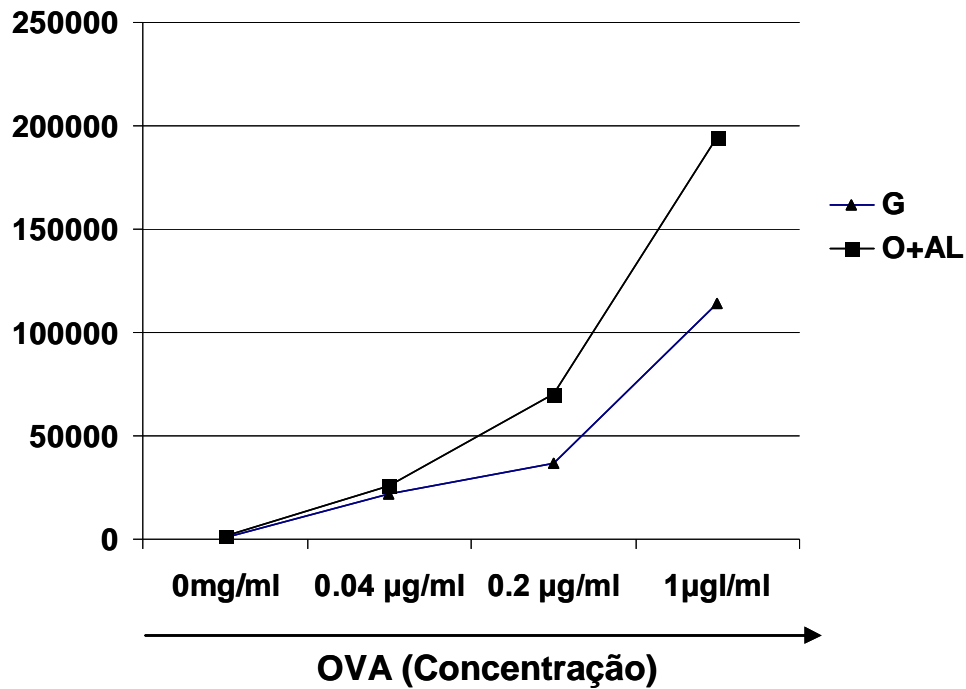
**Figura 32: Porcentagem de células CD4+62L+ e CD4+CD44+ nas placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (MLN) e baço (Ba).**

Camundongos fêmeas, C57BL/6 de 8 semanas foram tratados oralmente com 20mg de OVA (gavagem); tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p. 7 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> (gavagem + imunização). Sete dias após foram sacrificados para retirada dos órgãos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4+. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student*. N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.



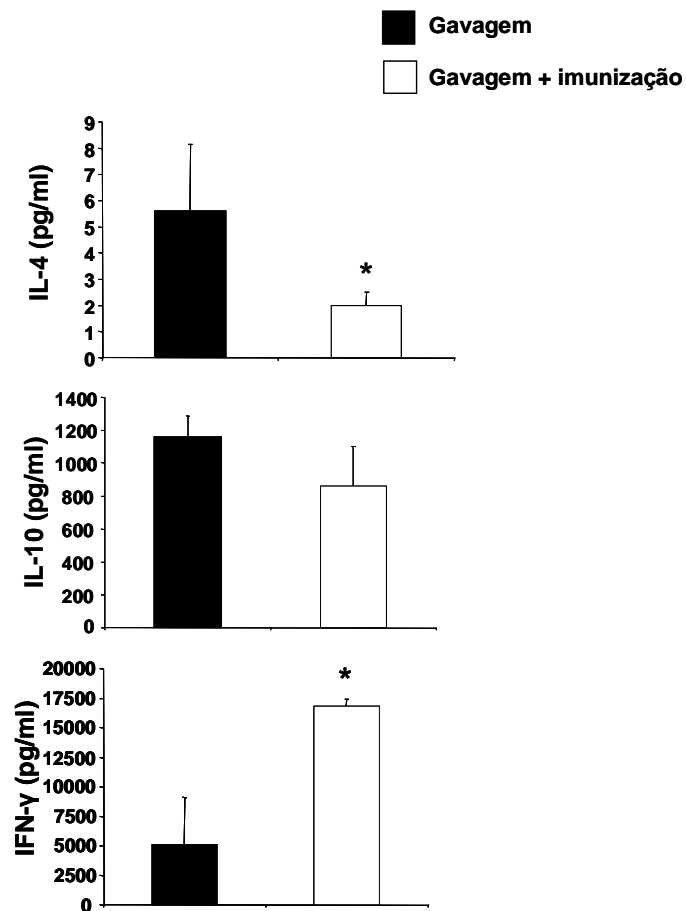
**Figura 33: Porcentagem de células CD4+CD25+Foxp3 nas placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (MLN) e baço (Ba).**

Camundongos fêmeas, C57BL/6 e fêmeas e machos Foxp3 GFP de 8 semanas foram tratados oralmente com 20mg de OVA (gavagem); tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p. 7 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> (gavagem + imunização). Sete dias após foram sacrificados para retirada dos órgãos. As células foram marcadas com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos Cy, FITC ou PE e analisados por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando FlowJo Tree Stars, dentro do gate de células CD4+. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\* $p < 0,05$ ). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 9.



**Figura 34: Ensaio de proliferação por células do baço.**

Camundongos fêmeas, C57BL/6 de 8 semanas foram tratados oralmente com 20mg de OVA (gavagem); tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p. 7 dias após com 10µg de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> (gavagem + imunização). Sete dias após foram sacrificados para retirada do baço. As suspensões celulares obtidas foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado e foram então adicionados 50µl de timidina e após 12 horas a leitura foi realizada. Os resultados são expressos como contagem de células em c.p.m. Para avaliação de proliferação celular foram feitos "pools" de 5 animais por grupo.



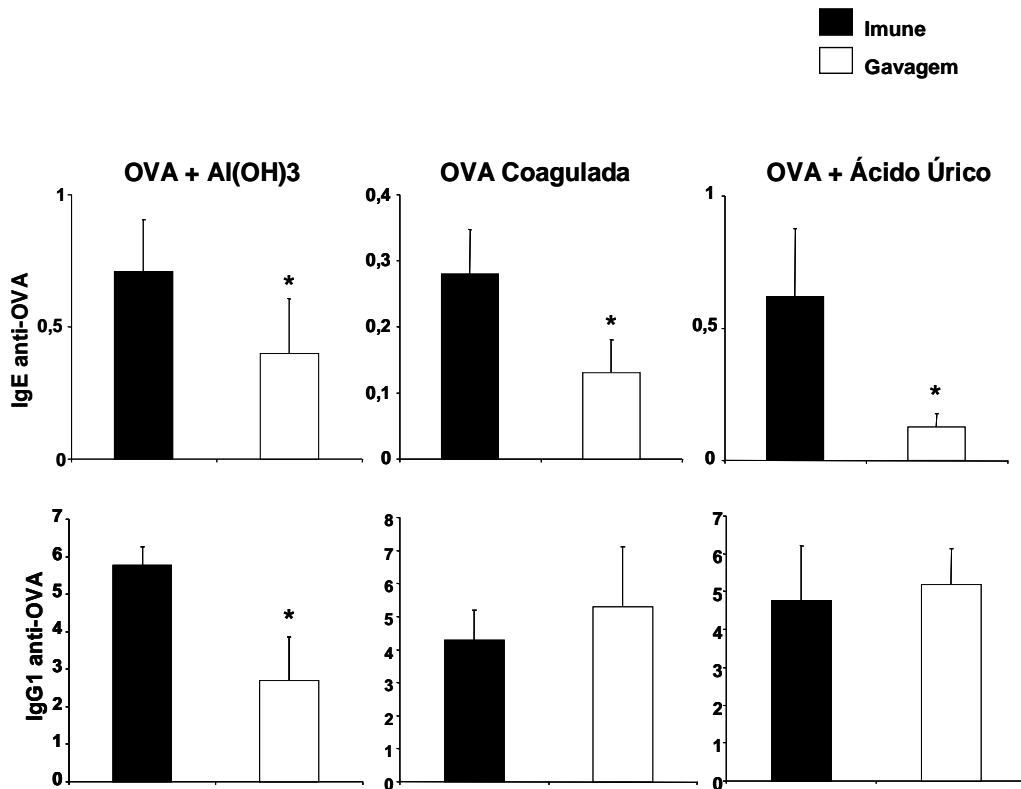
**Figura 35: Produção de INF- $\gamma$  IL-4, IL-10 por células do baço.**

Camundongos fêmeas, C57BL/6 de 8 semanas foram tratados oralmente com 20mg de OVA (gavagem); tratados oralmente com 20mg de OVA e imunizados i.p. 7 dias após com 10 $\mu$ g de OVA+ 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> (gavagem + imunização). Sete dias após foram sacrificados para retirada do baço. As suspensões celulares obtidas desses órgãos foram estimuladas com OVA e incubadas a 37° C. Após 72 horas, o sobrenadante foi coletado para medida das citocinas por ELISA. Os resultados representam o valor da concentração de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  no sobrenadante de células estimuladas com OVA subtraída o valor basal de células cultivadas somente em meio de cultura. As barras representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\*p<0,05). N° de animais/grupo = 5.

#### **4.14 - Avaliação dos Mecanismos de Ação do Adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> na Manutenção da Tolerância Oral**

Dois dos mecanismos de ação do adjuvante hidróxido de alumínio são bastante discutidos: formação de depósito com particulação do antígeno e produção de ácido úrico (Stills Jr, 2005; Kool e cols., 2007). À luz dessas informações, decidimos avaliar se algum dos dois mecanismos citados poderia estar envolvido na manutenção da tolerância oral. Para simular os efeitos de formação de depósito do alumínio sem seus efeitos associados ao ácido úrico, utilizamos o método de coagulação de solução de ovalbumina. Esse método foi descrito anteriormente por Mariano e colaboradores (Fancione e cols., 1997) que demonstraram que a agregação resultante do aquecimento da clara de ovo ou da solução de OVA produz um efeito depósito semelhante ao do alumínio. Quando os fragmentos da OVA coagulada são implantados subcutaneamente em camundongos, os níveis de IgE e IgG1 produzidos por esses animais são comparáveis aos do grupo que recebeu OVA + Al(OH)<sub>3</sub> para a sensibilização alérgica (Fancione e cols., 1997). Camundongos fêmeas BALB/c de 8 semanas foram tratados por gavagem com 20mg de OVA (grupo gavagem) ou salina (grupo imune) e imunizados i.p. com 10µg de OVA + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub>, 10µg de OVA + 200µg de ácido úrico ou s.c. com 6mg de OVA coagulada 7 dias depois. Os animais receberam um desafio com 10µg de OVA 14 dias após a imunização secundária e foram sacrificados 7 dias após o desafio para obtenção do soro. A medida dos níveis de IgE anti-OVA mostrou que todos os grupos se encontravam tolerantes por até seis meses após o tratamento oral (Fig.36). No entanto, quando avaliamos a produção de IgG1 por esses animais, observamos que somente no grupo imunizado com antígeno+adjuvante a tolerância foi mantida por até 6 meses (Fig.36).

Nossos resultados sugerem mais uma vez que qualquer inflamação gerada, independente da presença de Al(OH)<sub>3</sub>, após o tratamento oral é capaz de manter a tolerância para IgE, porém não para IgG1.



**Figura 36: Produção de anticorpos séricos anti-OVA.**

Camundongos fêmeas, BALB/c de 8 semanas, tratados oralmente com 20mg de OVA (tolerante) a ou salina por gavagem (imune) e imunizados i.p. 7 dias após com após com 10 $\mu$ g OVA+ 3mg Al(OH)<sub>3</sub>, 6mg OVA coagulada ou 10 $\mu$ g OVA+ 200 $\mu$ g de ácido úrico diluídos em 0,2 ml de salina. Os animais receberam um desafio com 10 $\mu$ g OVA 14 dias após a imunização. Sete dias após foram sangrados para verificação da manutenção da tolerância. Os anticorpos séricos IgE e IgG1 anti-OVA foram medidos por ELISA e os resultados expressos como média aritmética  $\pm$  desvio da somatória (O.D.SUM) das médias da absorbância obtida com os soros totais (IgE) de cada grupo ou diluídos (IgG1) a partir de 1:10 A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste *t student* (\* $p < 0,05$ ). N<sup>o</sup> de animais/grupo = 5.



## **5 - DISCUSSÃO**

A mucosa intestinal está constantemente exposta a uma grande quantidade de antígenos exógenos e a consequência mais comum desse contato antigênico não é uma resposta inflamatória, mas sim um estado de baixa reatividade ao antígeno denominado tolerância oral (Vaz e cols., 1977; Mowat, 2003; Faria e Weiner, 2005). Sabe-se que alguns fatores como envelhecimento influenciam a indução de tolerância oral. Animais susceptíveis à indução da tolerância oral com 8 semanas de idade se tornam menos susceptíveis com 24 semanas e totalmente refratários com 70 semanas quando se utiliza um protocolo sub-ótimo como a gavagem para a administração oral do antígeno (Faria e cols., 1993, Faria e cols., 1998). Como os eventos iniciais que levam à indução de tolerância oral ocorrem na mucosa intestinal e existem relatos na literatura que mostram que o envelhecimento afeta primeiro o tecido linfóide associado à mucosa do que o compartimento sistêmico (Koga e cols., 2000), avaliamos inicialmente as alterações basais que ocorrem nesse tecido durante o envelhecimento. Para entender as alterações do sistema imune associado à mucosa durante o envelhecimento, analisamos tanto a morfologia da mucosa intestinal como elementos reguladores que são descritos como importantes na indução da tolerância oral. Com relação aos animais, utilizamos camundongos da linhagem BALB/c que são muito susceptíveis à indução de tolerância oral quando jovens (2 meses de idade). Animais em 4 idades (2, 6, 12 e 24 meses) foram analisados para acompanharmos os efeitos do envelhecimento ao longo da vida inteira do animal. Em nosso estudo, não encontramos alterações no tamanho dos vilos ou no número total de células intraepiteliais (IELs) em animais com 24 meses de idade (Figura 12). No entanto, a frequência de IELs TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> assim como CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> estava reduzida nesses animais (Figura 13). Alguns trabalhos mostram que as células TCR $\gamma\delta$  são importantes para indução de tolerância oral. Estudos utilizando tratamento *in vivo* com anticorpos anti- $\gamma\delta$  ou com camundongos geneticamente deficientes no gene  $\delta$  mostram que a falta ou o bloqueio dos linfócitos T  $\gamma\delta$  leva a uma refratariedade à indução de tolerância oral (Mengel e cols., 1995; Ke e cols., 1997). Além disso, camundongos geneticamente deficientes para o gene  $d$  que não linfócitos T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> desenvolvem um quadro muito mais grave de colite induzida pela administração de dextran sulfato de sódio (DSS). Nas lesões intestinais dos camundongos selvagens com colite, foi observado o acúmulo de IELs  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> expressando KGF (*keratinocyte growth factor*), um potente fator de regeneração de células epiteliais. Camundongos KGF<sup>-/-</sup>

apresentam também um quadro mais grave de colite quando tratados com DSS. Esses dados em conjunto sugerem um papel modulador dos IELs  $\gamma\delta+$  na modulação da colite experimental (Chen e cols., 2002). Além disto, clones de células IEL $\gamma\delta$  inibem o desenvolvimento de células T citotóxicas (Kapp e cols., 2004) sugerindo que IELs  $\gamma\delta$  possuem propriedades imuno-reguladoras. Trabalhos de Bol-Schoenmakers e colaboradores mostraram que as células TCR $\gamma\delta$  estão envolvidas na regulação da alergia alimentar e que uma diminuição na atividade dessas células causada pelo bloqueio da sua função usando anticorpos específicos pode levar a uma diminuição do ambiente supressivo no intestino, facilitando o desenvolvimento de alergia (Bol-Schoenmakers e cols., 2010). Outra sub-população de IEL com potencial imuno-regulador são os linfócitos  $\alpha\beta+$  CD8 $\alpha\alpha+$ . Essas células são aparentemente educadas no timo, mas completam seu desenvolvimento no intestino (Lambolez e cols., 2007). Há relatos mostrando que essas células são capazes de prevenir a indução de colite induzida pela transferência de células CD4+CD25+CD45RB<sup>high</sup> para recipientes imunodeficientes (Poussier e cols., 2002). IELs  $\alpha\beta+$  CD8 $\alpha\alpha+$  também expressam constitutivamente níveis elevados das citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 assim como de outras proteínas com propriedades imuno-moduladoras como LAG-3 e fgl2 ambas expressas em células T CD4+CD25+Foxp3+ (Denning et al, 2007). Outras sub-populações de IELs portadoras do receptor CD8 $\alpha\alpha$ , tais como as células duplo positivas CD4+CD8 $\alpha\alpha+$ , também tem sido descritas como células T com atividade imuno-moduladora dependente de IL-10 (Das et al, 2003). Como não marcamos o TCR para o estudo das populações CD8 $\alpha\alpha$  e CD8 $\alpha\beta$ , não podemos distinguir quais dessas células ( $\alpha\beta+$  versus  $\gamma\delta+$ ) seriam responsáveis pela redução na frequência total de IELs CD8 $\alpha\alpha$  com o envelhecimento. No entanto, todas as populações até hoje descritas de linfócitos T intraepiteliais (IEL) expressando o receptor CD8 $\alpha\alpha$  apresentam propriedades reguladoras – tanto as TCR $\alpha\beta+$  como as TCR $\gamma\delta+$  (Mengel e cols, 1995; Ke e cols, 1997; Chen e cols, 2002; Poussier e cols, 2002; Denning e cols, 2007; Das e cols, 2003). Assim, para efeito da nossa pergunta, a diminuição na frequência de IELs com fenótipo imuno-regulador se correlaciona com o declínio da tolerância oral durante do envelhecimento. Também observamos que a frequência de células T CD8 $\alpha\beta+$ , que possuem função citotóxica, estava aumentada nos camundongos com 24 meses de idade (Figura13). É plausível que a redução das sub-populações de IELs com fenótipo

regulador em conjunto com o aumento de células IELs citotóxicas em animais senescentes influenciem na susceptibilidade à indução de tolerância oral.

Entre os fatores importantes envolvidos na indução de tolerância oral e na manutenção da homeostase da mucosa intestinal estão as citocinas TGF- $\beta$ 1 e IL-10 (Sonoda e cols., 1989; Faria e cols., 2006; Kuhn e cols, 1993; Duchmann e cols, 1996). Ambas as citocinas estavam reduzidas no duodeno de animais de 24 meses de idade enquanto que a concentração de IL-4 estava aumentada e de INF- $\gamma$  inalterada (Figura 14). A concentração de IL-10 apresentou-se reduzida não somente no duodeno, mas em todas as porções do intestino delgado. Vale destacar que os linfócitos não são homoganeamente distribuídos na mucosa intestinal, e o duodeno é o local onde a maior parte deles está localizada (Mowat, 2003). Além da sua ação direta na troca de classe de isotipo para IgA (Fayette e cols, 1997; Stavnezer e cols, 2009) e na supressão de eventos inflamatórios, IL-10 e TGF- $\beta$ 1 estão ligados à conversão periférica de células T reguladoras como as CD4+CD25+ e CD4+LAP+ (Wan e Flavell, 2006; Ghandi e cols., 2010). A redução na produção dessas citocinas no intestino delgado em adição à redução na frequência de IELs TCR $\gamma\delta$ + e CD8 $\alpha\alpha$ + em animais idosos pode desempenhar um papel importante na redução da susceptibilidade à indução de tolerância oral.

Quando avaliamos células T reguladoras, notamos um aumento de células CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+CD25+LAP+ na lâmina própria, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de camundongos a partir dos 6 meses de idade (Figura 15). Já foi descrito que a participação de Tregs induzidas na periferia, mas não de Tregs naturais, é essencial para indução de tolerância oral em camundongos (Mucida e cols., 2005; Curotto de Lafaille e cols., 2008). Células T CD4+LAP+ representam uma sub-população de células T reguladoras que expressam TGF- $\beta$  na sua forma precursora ligado à membrana (associated with the latent associated peptide, LAP). Esses linfócitos participam do controle da inflamação intestinal em modelos de colite experimental e foram descritos recentemente como uma sub-população distinta de células T (Nakamura e cols., 2004; Ghandi e cols., 2010). A persistência de alguns mecanismos reguladores, como Tregs, na mucosa poderia explicar porque, apesar da redução na suscetibilidade à indução de tolerância oral, os camundongos idosos não se apresentam com doenças inflamatórias do intestino como alergia alimentar ou colite. Resultados anteriores do nosso laboratório mostram que camundongos com 70 semanas de idade podem se tornar

tolerantes a ovalbumina quando esta é administrada na água das mamadeiras por ingestão voluntária (Faria e cols, 1998). Esse regime de indução de tolerância oral mostrou-se mais eficiente para a supressão da reatividade imune inflamatória tanto em camundongos jovens quanto em animais idosos normalmente refratários a tolerância induzida por regimes sub-ótimos como a gavagem única com o antígeno (protocolo que utilizamos nesse trabalho) (Faria e cols, 2003).

Em paralelo com o aumento da frequência de células T reguladoras, uma frequência aumentada de células ativadas CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> foi detectada na lâmina própria, placas de Peyer e linfonodos mesentéricos em camundongos a partir dos 6 meses de idade (Figura 15). Por outro lado, observamos a redução de células virgens CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos (Figura 15). Curiosamente, na lâmina própria, foi observado também um aumento de células CD62L<sup>+</sup>. Uma possível explicação seria que as células ativadas voltam a expressar CD62L na lâmina própria permitindo a sua re-circulação (Figura15). Nossos resultados estão de acordo com Han e colaboradores que mostram frequências aumentadas de células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> em camundongos SJL/J idosos. De acordo com esse estudo, células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> estão aumentadas no baço e linfonodos mesentéricos, mas não no timo, sugerindo que esse aumento é devido à população de células T reguladoras induzidas na periferia e não provenientes do timo (Han e cols., 2009). O envelhecimento é associado a uma redução substancial na frequência de células T virgens com concomitante aumento de células T de memória (Taub e Longo, 2005). É provável que as células T reguladoras CD25<sup>+</sup> aumentadas no nosso estudo sejam células de memória ativadas normalmente encontradas em animais idosos. Como as células reguladoras necessitam de IL-2 para sobreviverem e expandirem, as células T reguladoras teriam a capacidade de “vincular” a sua expansão ao *pool* de células T efetoras através da secreção de IL-2. Ou seja, com o aumento de células efetoras ocorreria uma maior produção de IL-2 que seria utilizada por células T reguladoras para sua sobrevivência e expansão na periferia. Esse mecanismo de indexação das populações de linfócitos ocorreria porque as células T reguladoras possuem o receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) (Almeida e cols., 2006).

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígeno e estão associadas à deleção ou silenciamento de linfócitos auto-reativos assim como indução de células reguladoras levando à tolerância periférica (Faria e Weiner, 2005; Hawiger e cols., 2004). Essas células são também elementos chave na indução de

tolerância oral (Viney e cols., 1998; Fleeton e cols., 2004). Poucos trabalhos relatam os efeitos do envelhecimento na expressão de moléculas de co-estimulação CD80/86 em DCs e outras células apresentadoras de antígeno no intestino. Neste trabalho, mostramos que a expressão de CD86 em DCs está aumentada nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de camundongos de 12 meses de idade (Figura 16). Nossos resultados contrastam com os de Simioni e colaboradores que mostraram recentemente uma associação entre o envelhecimento e a redução na expressão de CD86 em DCs (Simioni e cols., 2010). No entanto, esses autores não examinaram DCs de sítios da mucosa intestinal. Além disso, nesse trabalho, os camundongos foram tratados por via oral e imunizados com antígeno enquanto que, em nosso estudo, não houve nenhuma manipulação dos animais. Nossos resultados sugerem que, em um dos primeiros locais de encontro com o antígeno quando administrado por via oral - a lâmina própria, não existe um aumento expressão de moléculas co-estimuladoras como CD86 em DCs, o que em associação ao aumento de células reguladoras nesse sítio poderia justificar porque, apesar da diminuição da susceptibilidade à indução de tolerância oral, é possível ainda induzir tolerância oral em animais idosos se o antígeno for administrado de forma contínua. Quando testamos a funcionalidade de DCs utilizando co-cultura de células T e DCs do baço e linfonodos mesentéricos de camundongos de 2 e 12 meses de idade, observamos que DCs provindas dos linfonodos mesentéricos mostram-se mais afetadas pelo envelhecimento do que aquelas originadas do baço. Esse resultado está de acordo com alguns estudos que sugerem que o impacto do envelhecimento no sistema imune pode ser visto mais precocemente no tecido linfóide associado à mucosa do que no compartimento sistêmico (Koga e cols., 2000). É interessante notar que uma redução concomitante na produção de TGF- $\beta$ 1 e na indução de células T CD4+CD25+LAP+ foi observada em camundongos de 12 meses de idade (Figura 17). A frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+CD44+ está aumentada quando utilizamos co-culturas de DCs provindas dos linfonodos mesentéricos de camundongos de 12 meses e células T do baço de camundongo de 2 meses de idade. Nossos resultados referentes à diferenciação de células T CD4+CD25+Foxp3+ a partir de linfócitos do baço de camundongos DO.11.10 (transgênicos para o receptor TCR reativo com OVA) na presença de ovalbumina e de DCs derivadas do MLN versus baço diferem daqueles descritos em outro estudo (Mucida e cols., 2007). No estudo de 2007, Mucida e cols. Mostram que as DCs derivadas de MLN são mais eficientes que DCs derivadas do baço para a conversão de linfócitos T CD4+ virgens em linfócitos T reguladores

CD4+CD25+Foxp3+. Nesse trabalho, no entanto, eles utilizam células T de camundongos RAG-/- transgênicos. Assim, o que eles observam na cultura é, de fato, a conversão de linfócitos T virgens. Como nossos camundongos estão no fundo genético BALB/c expressando a enzima RAG, eles apresentam uma frequência de recombinação endógena dos genes das imunoglobulinas e do TCR capaz de gerar um repertório com um nível mínimo de diversidade (~ 15% dos linfócitos T CD4+ desses animais sofreram recombinação). Isto pode explicar nossos resultados diferentes. Uma parte dos linfócitos T cd4+ utilizados na co-cultura já estariam previamente ativados e poderiam apresentar o fenótipo CD25+Foxp3+.

Além disso, uma aumentada produção de IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 pode ser observada após co-cultura de DCs dos linfonodos mesentéricos de camundongos de 12 meses de idade e células T do baço de animais de 2 meses de idade (Figura 17). Embora seja bem estabelecido que o compartimento de células T é altamente afetado pelo envelhecimento, nossos dados indicam que células apresentadoras de antígenos como DCs podem também exercer um papel no declínio da função imune reguladora na mucosa intestinal.

A função de células B também está alterada na imuno-senescência. A formação de centros germinativos está reduzida, a resposta de anticorpos está diminuída e retardada, e a afinidade dos anticorpos também está reduzida (Nikolich-Zugich, 2005). Os linfócitos B da mucosa produzem altos níveis de IgA secretória (S-IgA) representando uma resposta imune não inflamatória típica de superfície da mucosa. Alguns trabalhos propõem que S-IgA também esteja alterada na imunosenescência, mas os resultados relativos a esse assunto são controversos. Enquanto alguns estudos mostram que a S-IgA total está aumentada (Senda e cols., 1988) no envelhecimento, outros mostram que essa imunoglobulina pode estar tanto aumentada quanto inalterada em animais idosos (Arranz e cols., 1992). Nossos resultados estão de acordo com Arranz e colaboradores, mostrando que não há alteração tanto nos níveis de S-IgA total quanto na S-IgA antígeno específica durante o envelhecimento (Figura 18). Alguns estudos mostraram um declínio nos níveis de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA nos linfonodos. Outros estudos mostram que há um aumento de IgM, IgA e IgG no plasma e soro (Szewczuk, Campbell e Jung, 1981, Arranz e cols., 1992, Listi e cols., 2006, Fujihashi, McGhee, 2004). Um estudo anterior de nosso grupo mostrou que os níveis de imunoglobulinas Ig, IgG e IgA séricas totais estão aumentados enquanto que as mesmas imunoglobulinas porém as imunoglobulinas antígeno-específicas estão reduzidas em

camundongos idosos. Os níveis séricos de IgM tanto total como antígeno-específico estão inalterados (Speziali e cols., 2009). No presente trabalho, também avaliamos os níveis de IgA, IgE, IgG1 e IgG2a séricos totais e antígeno-específicos. Nossos resultados mostram que há um aumento nos níveis de imunoglobulinas séricas totais e uma redução de imunoglobulinas antígeno-específicas confirmando os dados do nosso trabalho anterior (Figura 19). Esses resultados mostram que a resposta imune antígeno-específica, mas não a atividade basal de células B, está diminuída em animais idosos. Em resumo, podemos dizer que, no envelhecimento, o sistema imune encontra-se em sua grande parte ativado com acúmulo de células ativadas e de memória. No entanto, quando desafiado por um antígeno novo, a capacidade imune de um animal idoso em montar uma resposta é muito menos eficaz que um animal jovem. Este entre outros poderia ser um dos motivos pelos quais há uma redução da susceptibilidade à indução de tolerância oral em animais idosos.

De uma forma geral, nossos resultados indicam que vários componentes da mucosa intestinal estavam afetados pelo envelhecimento, tais como a frequência diminuída de IELs com fenótipo regulador, a produção reduzida de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- $\beta$  no intestino delgado. Além disso, a capacidade de DCs providas dos linfonodos mesentéricos de animais de 12 meses de idade de estimular uma reatividade *in vitro* dependente de TGF- $\beta$  estava comprometida. Entretanto, nem todos os elementos reguladores estavam alterados pelo envelhecimento e células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ e CD4+CD25+LAP+ estavam aumentadas e não reduzidas. É possível que as alterações de IELs e citocinas com fenótipo regulador assim como o estado global ativado dos camundongos idosos com reduzida capacidade de responder a novos antígenos estejam relacionados com o declínio da indução de tolerância oral com o envelhecimento. Por outro lado, a persistência de alguns mecanismos reguladores pode explicar porque a tolerância oral pode ser totalmente induzida em animais idosos quando o tratamento oral é feito através de administração contínua do antígeno (Faria e cols., 1998; Faria e cols., 2003).

Outra grande questão envolvendo tolerância oral e envelhecimento é o tempo de manutenção da mesma. Vários trabalhos já discutiram a questão da manutenção da tolerância oral obtendo resultados contraditórios. Esses trabalhos, no entanto, utilizaram diferentes protocolos experimentais (Strobel & Ferguson, 1987, Melamed e Friedman, 1993, Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996, Faria, 1998a). Por essa razão, outro objetivo do nosso trabalho foi estudar a manutenção da tolerância oral comparando os diferentes



protocolos experimentais utilizando a imunização com antígeno e adjuvante não simplesmente como maneira de revelar a tolerância induzida, mas como fator efetivo que influenciaria a tolerância resultante ou sua duração. Para tal, utilizamos camundongos tratados oralmente com OVA por gavagem e imunizados com o adjuvante mais utilizado experimentalmente,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , em diferentes tempos.

Strobel & Ferguson mostraram que a supressão da produção de imunoglobulinas na tolerância é mantida por até 3 meses após o tratamento oral. Nesse trabalho, os animais foram tratados oralmente com OVA por gavagem e imunizados com OVA + CFA em tempos variados chegando até 17 meses após o tratamento oral (Strobel & Ferguson, 1987). Melamed & Friedman, no entanto, mostraram através da medida da resposta proliferativa, que a tolerância é perdida gradualmente quando os animais são imunizados (com OVA + CFA) a partir de 21 dias após o tratamento oral com o antígeno (Melamed & Friedman, 1993). De acordo com Moreau e Gaboriau-Routhiau, camundongos tratados por via oral com OVA e imunizados, 60 dias após esse tratamento, com OVA +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  se mostram tolerantes quando medida a produção de imunoglobulinas IgG séricas anti-OVA. No entanto, 60 dias foi o intervalo de tempo máximo estudado nesse trabalho (Moreau e Gaboriau-Routhiau, 1996). Nossos resultados confirmam e estendem os de Moreau e Gaboriau-Routhiau. Em nosso estudo, as imunizações com OVA +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  foram feitas até 180 dias após o tratamento oral com o antígeno. Nossos dados mostram que a tolerância é mantida por até 90 dias após o tratamento oral em animais tratados por gavagem. Esse resultado pode ser observado pela produção de imunoglobulinas IgE e IgG1 anti-OVA (Fig.21), assim como pela produção das citocinas IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 por células estimuladas *in vitro* com OVA (Fig. 22).

Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostram que a tolerância é mantida por até um ano e meio em camundongos B6D2F1 tratados por via oral com OVA e imunizados com OVA +  $\text{Al}(\text{OH})_3$  7 dias após esse tratamento (Speziali, 1999; Faria e cols., 1998). Um resultado semelhante foi mostrado por Melamed & Friedman pela medida da supressão da resposta proliferativa de células T de linfonodos poplíteos de camundongos tratados por via oral com OVA e imunizados após 7 dias com OVA + CFA, quando os mesmos mantiveram-se tolerantes por todo o período estudado (47 dias) (Melamed & Friedman, 1993). Nossos resultados confirmam os dois estudos anteriormente citados, ou seja, a tolerância foi mantida por até um ano em animais imunizados 7 dias após o tratamento oral tanto para IgE como IgG1 anti-OVA (Figura

23). No entanto, quando avaliamos a citocinas em sobrenadantes de cultura de células de baço desses animais, observamos que IL-4 e IL-10 ainda se encontravam suprimidas, mas para IFN- $\gamma$  não observamos mais inibição (Figura 24). Uma possível explicação para essa diferença seria o fato de que Al(OH)<sub>3</sub> é um adjuvante que leva a uma resposta Th2 e, portanto, favoreceria preferencialmente a manutenção da supressão de citocinas Th2 e não Th1 (Faquim-Mauro e cols., 1999). Novamente, isto nos leva à conclusão de que os eventos da imunização inflamatória estão estreitamente relacionados com os eventos da indução de tolerância oral. Assim, podemos afirmar que o intervalo de tempo entre o tratamento oral e a imunização primária interfere no tempo de manutenção da tolerância oral.

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

De acordo com Melamed & Friedman, um fator importante para a manutenção da tolerância oral é a exposição contínua ao antígeno. No entanto, os adjuvantes não só prolongam o tempo de exposição do antígeno, mas também são agentes com ação inflamatória que potenciam a ativação e proliferação de linfócitos T reativos (Melamed & Friedman, 1993). É provável que os circuitos de células ativadas durante o processo de tolerização sejam expandidos pela ação inflamatória do adjuvante auxiliando na manutenção da memória dessa ativação. Para testar essa hipótese, avaliamos a importância da presença do adjuvante durante a imunização na manutenção da tolerância oral. A inibição da resposta imune típica da tolerância oral pode ser observada por até um ano em camundongos imunizados com antígeno + adjuvante, somente com o antígeno ou somente com o adjuvante de acordo com a avaliação de IgE anti-OVA no soro (Figura 26). Assim, a injeção do próprio antígeno parece ser suficiente, para a indução de IgE específica, para o reforço da tolerância oral. De acordo com alguns estudos, a injeção de antígenos protéicos purificados causa rápida

proliferação seguida por morte de células T antígeno específicas (McCormack e cols., 1993). Mitchell e colaboradores mostraram também que os adjuvantes aumentam o tempo de vida de células T ativadas, pelo menos em parte, pelo aumento da expressão de Bcl-3 (proteína anti-apoptótica) nessas células (Mitchell e cols., 2001). Esses podem ser mecanismos responsáveis pela ação isolada do antígeno, no caso da resposta de IgE. Não podemos afastar a hipótese de que tenha havido contaminação da ovalbumina por LPS, um agente com propriedades claramente adjuvantes. No entanto o mesmo resultado foi obtido quando repetimos o mesmo protocolo utilizando OVA livre de LPS (dados não mostrados).

No entanto, quando avaliamos os níveis de IgG1 específica, somente permaneceram tolerantes os camundongos imunizados com antígeno + adjuvante 7 dias após o tratamento oral (Figura 26). Esses resultados mostram que, para a manutenção da tolerância oral avaliada pela IgE específica, a imunização parenteral é importante mas ela independe da presença concomitante do antígeno e adjuvantes juntos. Diferentemente, a manutenção da inibição da produção de IgG1 específica depende da co-administração parenteral de antígeno e adjuvante. Esses dados também confirmam resultados anteriores do nosso grupo mostrando que existe uma hierarquia de supressão de parâmetros inflamatórios pela indução de tolerância oral. A produção de IgE específica é um dos parâmetros mais facilmente inibidos enquanto que a resposta específica de IgG1 não anafilática é o parâmetro menos sensível à supressão (Keller e cols., 2006). Aparentemente, também para a manutenção da tolerância oral essa hierarquia se impõe. Resta-nos testar se a resposta de IgG1 que é menos duradoura é composta pelo tipo não anafilático de IgG1 já que ambos os tipos (anafilática e não anafilática) podem ser produzidos pela imunização utilizando-se  $Al(OH)_3$  como adjuvante (Faquim-Mauro, 1999).

Quando avaliamos a produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura de células de baço, observamos que somente os grupos que receberam imunização com antígeno + adjuvante mantiveram a inibição da produção de IL-4 e IL-10 por até um ano (Fig. 27).

Alguns trabalhos, comparando modelos de asma experimental na presença ou ausência de adjuvante, mostraram que o adjuvante  $Al(OH)_3$  contribui apenas para a geração de IgG1 anti-OVA e não para a indução de IgE anti-OVA (Conrad e cols., 2009). Como na ausência de imunizações a tolerância não pode mais ser vista após 90 dias do tratamento oral tanto para a resposta de IgE como para a resposta de IgG1, e para que os níveis de IgG1 específica mantenham-se reduzidos é necessário a presença

de antígeno e adjuvante, resolvemos avaliar se havia ou não a necessidade de se administrar antígeno e adjuvante pela mesma via para que a supressão das respostas de IgE e IgG1 se mantivessem por 6 meses após o tratamento oral.

A tolerância oral só se manteve para a resposta de IgE quando antígeno e adjuvante foram administrados pela mesma via, seja esta intraperitoneal ou subcutânea (Figura 28). No entanto, para que a tolerância fosse mantida por até 6 meses para a resposta de IgG1, a administração de antígeno e adjuvante por via intraperitoneal era obrigatória (Figura 28). Esses resultados mais uma vez mostram que há diferenças quanto à produção e supressão das respostas de IgE e IgG1 na tolerância oral. Uma possível explicação para a eficácia diferente entre as vias de administração seria que as DCs presentes nos linfonodos que drenam a região de injeção via intraperitoneal ou subcutânea poderiam ser diferentes e gerar respostas distintas. Aparentemente, para a resposta de IgE, a imunização com antígeno por uma via e com adjuvante por outra bloqueia a supressão dessa resposta já seria necessário o uso de antígeno e adjuvante na imunização para que a tolerância fosse mantida para esse parâmetro inflamatório. Por outro lado, vale notar que, quando antígeno e adjuvante não foram administrados pela mesma via, não ocorreu manutenção da imuno-reatividade do animal tampouco. Os camundongos do grupo controle (que não recebeu tratamento oral e foi somente imunizado) não apresentaram títulos elevados de IgE sérica específica como os camundongos dos demais grupos imunizados com antígeno e adjuvante pela mesma via. Desta forma é mais correto dizer que a imunidade não foi mantida, mas não se pode afirmar que a tolerância tenha sido perdida.

Um dos possíveis mecanismos explicativos para a indução da tolerância oral é a ação de células reguladoras (Tregs) extensivamente estudadas nos últimos anos. Vários subgrupos de linfócitos T com fenótipo regulador já foram descritos como importantes na indução de imunossupressão via mucosa oral, tais como: Th3, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (Faria e Weiner, 2005). Zhang e cols. mostraram que a administração de antígeno através da mucosa oral pode ser um método *in vivo* efetivo para ativação de células T CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> reguladoras (Zhang e cols., 2001). Além disto, Curotto de Lafaille e colaboradores demonstraram que a tolerância oral para OVA não pode ser induzida em camundongos *scurfy* (Foxp3<sup>-/-</sup>) RAG<sup>-/-</sup> transgênicos para o TCR reativo com OVA. Esses animais têm 100% do seu repertório de linfócitos T CD4<sup>+</sup> reativos com o peptídeo 323-339 da OVA e, como são geneticamente deficientes para o fator de transcrição Foxp3, não apresentam células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> naturais ou induzidas

(Curotto de Lafaille e cols., 2008). Como Mucida e colaboradores já haviam demonstrado que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> naturais não são essenciais para a indução de tolerância oral (Mucida e cols, 2005), as células Tregs importantes no caso seriam as células Treg induzidas.

Assim, nosso próximo passo foi analisar o possível papel das células reguladoras e de algumas citocinas induzidas logo após o tratamento oral seguido por imunização com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> na manutenção da tolerância oral. Para esse propósito, utilizamos camundongos com alta frequência de linfócitos T expressando TCR reativo com OVA (DO.11.10) para facilitar a visualização dos eventos que ocorrem após o tratamento oral com esse antígeno seguido ou não por imunização intraperitoneal ou subcutânea. Após o tratamento oral com OVA, houve um aumento na porcentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço e linfonodos inguinais dos camundongos; no entanto, a imunização subsequente não aumentou ainda mais essa população como esperávamos (Figura 29). Esses resultados estão de acordo com os de Chung e colaboradores que mostraram que existe uma expansão de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nas placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e tecidos linfóides periféricos de camundongos tratados com antígenos por via oral (Chung e cols., 2005). Não podemos dizer, entretanto, que esse aumento de células Tregs tenha se devido a uma indução periférica das mesmas já que não utilizamos marcadores específicos para nTregs (naturais) ou iTregs (induzidas) tais como o fator de transcrição Helios recentemente descrito como exclusivamente expresso em células Treg naturais (Thornton e cols., 2010). Porém, quando avaliamos células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> que são induzidas na periferia, notamos que somente no baço foi possível visualizar um aumento dessa população celular em camundongos que foram tratados com OVA por via oral (Figura 29). É interessante notar que somente animais que foram tratados por via oral e imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> por via subcutânea apresentaram elevada porcentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> nos linfonodos inguinais (Figura 29). Uma possível explicação para que a imunização não aumente ainda mais a população de células reguladoras seria que, nesses animais com TCR específico para o antígeno, basta o tratamento oral com antígeno para que a população se expanda até seu máximo.

Uma das maneiras de avaliar a tolerância oral é através do ensaio de proliferação de linfócitos cultivados *in vitro* com o antígeno. Realizamos a avaliação da capacidade de proliferação específica utilizando células do baço de camundongos DO.11.10 tratados ou não pela via oral com OVA. A resposta proliferativa de células de baço de

camundongos DO.11.10 tratados por via oral e imunizados por via intraperitoneal em seguida é menor do que a resposta das células do grupo normal e do grupo tratado por via oral e imunizado por via subcutânea (Figura 30). Esse resultado nos ajuda a explicar porque a tolerância para a resposta de IgG1 sérica é mais duradoura quando os animais são imunizados por via intraperitoneal (Figura 28). Ao avaliarmos a produção de citocinas por esses animais, observamos um aumento de IL-4 nos animais tratados por via oral com OVA assim como nos grupos tratados por via oral com OVA e subsequentemente imunizados por via i.p. ou s.c. quando comparados ao grupo normal que não recebeu nenhum tratamento. No entanto notamos um aumento de IFN- $\gamma$  somente em animais que foram tratados por via oral com OVA e naqueles tratados por via oral com OVA e subsequentemente imunizados por via i.p.. O grupo tratado por via oral e imunizado por via subcutânea apresentou níveis de INF- $\gamma$  comparáveis ao grupo normal. Não houve diferença entre os grupos com relação à produção de IL-4 (Figura 31). Aparentemente os animais tratados por via oral e imunizados com antígeno + adjuvante por via intraperitoneal produziram tanto citocinas do tipo Th1 como Th2 apesar de apresentarem uma resposta proliferativa *in vitro* menor. De uma maneira geral, nossos resultados mostram que houve um aumento de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ em todos os órgãos avaliados e de células CD4+CD25+LAP+ somente no baço logo após o tratamento oral com OVA. A imunização subsequente, seja por via i.p. ou s.c., não potenciou esse aumento nos camundongos DO11.10. Quando os camundongos são imunizados com OVA+Al(OH)<sub>3</sub> por via s.c., os mesmos apresentam uma redução de células T CD4+CD25+Foxp3+ no baço, quando comparados aos camundongos imunizados por via i.p., e um aumento de células T CD4+CD25+LAP+ no linfonodo inguinal.

Como não foi possível visualizar a diferença entre camundongos DO11.10 somente tratados por via oral com OVA e aqueles tratados por via oral com OVA e subsequentemente imunizados com OVA + adjuvante, decidimos, em seguida, utilizar camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP *knockin* para avaliar com maior precisão o efeito do protocolo de tolerização nas células T CD4+CD25+Foxp3+, nas células T efetoras e virgens após o tratamento oral seguido ou não imunização intraperitoneal com antígeno mais adjuvante. Para o controle desse experimento e para testar os mesmos efeitos em uma linhagem diferente de camundongos, avaliamos também camundongos C56BL/6 selvagens. Não houve diferenças quanto à porcentagem de células T virgens ou ativadas em animais tratados por via oral ou tratados por via oral e imunizados em nenhum dos

órgãos analisados (Figura 32). No entanto, quando avaliamos a população de células CD4+CD25+Foxp3+, observamos um aumento de sua frequência nos linfonodos mesentéricos e baço de animais imunizados após o tratamento oral. Um aumento na frequência de células CD4+CD25+LAP+ pode ser visto somente no baço dos animais tratados por via oral e imunizados 7 dias após (Figura 33). Esses resultados sugerem que o aumento de células T reguladoras que se segue à imunização com o antígeno poderia favorecer a manutenção da tolerância oral nesses animais. A vinculação do *pool* de células Tregs CD4+CD25+ à dinâmica de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores, como proposto por Almeida e colaboradores (Almeida e cols., 2006), poderia, assim, explicar porque a imunização utilizando adjuvantes pode ser um reforço para os mecanismos tolerogênicos induzidos pela administração oral de antígenos.

Quando avaliamos a capacidade de proliferação específica *in vitro* das células de baço desses animais observamos que os camundongos imunizados após o tratamento oral possuíam uma maior capacidade de proliferação em resposta ao antígeno (Figura 34). Esse resultado contrasta com o anteriormente mostrado utilizando camundongos DO11.10 onde não houve diferença entre os grupos tratados por via oral somente e tratados por via oral e imunizados. Uma possibilidade para explicar essa discrepância seria que em camundongos com um repertório majoritariamente composto por linfócitos T expressando TCR específico para o antígeno, o tratamento oral seria suficiente para que esses linfócitos sejam ativadas e proliferem. Já em camundongos com repertório diversificados de linfócitos T, a imunização é necessária para incrementar a proliferação e expansão das células T efectoras e, conseqüentemente, das células Tregs. Quando avaliamos a produção de citocinas, observamos redução na produção de IL-4, aumento na produção de IFN- $\gamma$  e nenhuma alteração na produção de IL-10 nos animais do grupo imunizado após o tratamento oral quando comparado àqueles do grupo somente tratado por via oral (Figura 35). Mais uma vez houve diferença entre os experimentos utilizando camundongos DO11.10 e C57BL/6 com relação à produção de IL-4 após a imunização. Uma hipótese explicativa seria a diferença entre as duas linhagens ou até mesmo a magnitude das interações que ocorrem em um animal que com o repertório de linfócitos T tão desviado como os camundongos DO.11.10.

No entanto, em ambos os experimentos, os níveis de IFN- $\gamma$  estavam aumentados (Figuras 31 e 35). Um aumento de IFN- $\gamma$  logo após o tratamento oral com o antígeno seguido por imunização com antígeno + adjuvante também foi mostrado por Keweon e

colaboradores. Nesse estudo, os autores mostram que IFN- $\gamma$  tem um papel central na indução e/ou manutenção de tolerância oral e que células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  são essenciais para a redução da resposta sistêmica de células B induzida pelo tratamento oral com OVA. Os autores sugerem que a produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 leva a uma redução de IL-4 por células Th2 em animais tratados por via oral e subsequentemente a falta de IL-4 pode contribuir para a baixa produção de respostas de IgG antígeno-específica, especialmente IgG1 (Kweon e cols., 1998). Polte e colaboradores também sugerem a importância de IFN- $\gamma$  na manutenção de tolerância oral mostrando que a inibição dessa citocina em filhotes de mães tolerantes reverteu o efeito protetor transferido pela mãe (Polte, Henning e Hansen, 2008). No geral, nossos resultados indicam que a imunização com antígeno na presença de adjuvante gera uma resposta imune complexa envolvendo regulação e ativação, capaz então de fortalecer a memória da reatividade ao antígeno aumentando o tempo de manutenção da tolerância oral ao mesmo.

Como o adjuvante utilizada em nossos experimentos foi o Al(OH)<sub>3</sub>, resolvemos em seguida avaliar se haveriam mecanismos particulares pelos quais esse adjuvante aumentaria o tempo de manutenção da tolerância, em especial para a resposta de IgG1. Um dos mecanismos mais bem descritos sobre a ação do Al(OH)<sub>3</sub> é a particulação dos antígenos adsorvidos com formação de depósitos, processo que prolonga a exposição do corpo ao antígeno e facilita a captação e apresentação do mesmo por células apresentadoras de antígenos - APCs (Stills Jr, 2005). Outro mecanismo de ação extensivamente estudado é a liberação de ácido úrico após imunização com o adjuvante hidróxido de alumínio. Essa liberação de ácido úrico gera um “sinal de perigo endógeno”, induzindo assim a diferenciação de monócitos recrutados em DCs inflamatórias (Kool e cols., 2007). A injeção intraperitoneal de ácido úrico purificado aumenta a resposta T citolítica pelo aumento da expressão de moléculas costimuladoras CD86 e CD80 em células isoladas de camundongos sensibilizados com antígenos particulados. Além disso, quando tratados com allopurinol e uricase (depletors de ácido úrico), ocorre inibição dessa ativação (Hu e cols., 2004).

Desta forma, utilizamos dois protocolos experimentais para mimetizar a particulação do antígeno e também usamos ácido úrico como adjuvante. Para particulação da OVA, utilizamos um método descrito por Facincone e colaboradores que mostraram que o aquecimento de solução de ovalbumina em forno de microondas



promove a coagulação da solução. Os fragmentos desse coágulo, quando introduzidos por via subcutânea, têm efeito imunogênico comparável à imunização com o antígeno na presença de hidróxido de alumínio (Facincone e cols., 1997).

Para a utilização de ácido úrico como adjuvante, o mesmo foi diluído na concentração de 200µg/100µl em salina fisiologia e homogeneizado juntamente com a OVA. Essa concentração foi definida com base nos dados de Shi e colaboradores que mostram que concentrações acima de 70mg/100ml injetadas intraperitonealmente precipitam formando cristais de urato monossódico (MSU), substância com propriedades de potente adjuvante (Shi, Evans e Rock, 2003). A utilização de OVA coagulada ou de ácido úrico como adjuvante mantiveram a tolerância oral por 6 meses após o tratamento oral para a resposta de IgE (Figura 36). No entanto, quando a resposta de IgG1, o mesmo não pode ser observado (Figura 36) Mais uma vez observamos que a supressão da resposta de IgE foi mais facilmente mantida do que a supressão da resposta de IgG1. Foi necessário a imunização, logo após o tratamento oral, com antígeno e o adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> para que a tolerância se mantivesse para a resposta de IgG1. Esses resultados sugerem que os mecanismos pelos quais o Al(OH)<sub>3</sub> potencia a manutenção da tolerância para a resposta de IgG1 não é apenas por formação de depósito ou pela liberação de ácido úrico. Pode ocorrer uma somatória dos dois eventos, ou algo ainda não previsto.

De forma geral, nossos resultados mostram que ocorrem várias alterações no tecido linfóide associado à mucosa durante o envelhecimento e que algumas dessas alterações podem estar envolvidos na redução da susceptibilidade de indução de tolerância oral. Tais alterações incluem a redução na produção de elementos reguladores (IELs TCRγδ e CD8αα+, citocinas como IL-10 e TGF-β), o aumento de elementos efetores (IELs CD8α+β+ e citocinas como IL-4), predomínio de um perfil de células T ativadas, aumento da resposta basal de células B basal com declínio concomitante da resposta antígeno-específica a novos antígenos. Por outro lado, mesmo em animais jovens, a tolerância oral induzida por um protocolo sub-ótimo (gavagem) para a maioria dos parâmetros inflamatórios requer a imunização parenteral com antígeno + adjuvante para sua manutenção por um período duradouro. Os mecanismos pelos quais o adjuvante hidróxido de alumínio promove essa potencialização na duração do fenômeno ainda não estão claros, mas parece envolver, pelo menos em parte, a expansão de células T reguladoras.

## **6 - CONCLUSÕES**

**6.1 - Durante o envelhecimento:**

1. Não ocorreram alterações histomorfológicas visíveis à microscopia de luz em cortes de intestino corados com HE, quanto ao tamanho de vilos intestinal;
2. Não houve alteração no número de células intraepiteliais (IELs), porém a frequência de células intraepiteliais TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> e CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> estava reduzida e a de TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> e CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> estava aumentada;
3. Houve uma redução na produção de IL-10 e TGF- $\beta$  e aumento na produção de IL-4 pela mucosa intestinal;
4. Houve um aumento na frequência de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> na mucosa intestinal;
5. Ocorreu um aumento na frequência de células T ativadas CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> e uma redução na frequência de células T virgens CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> na mucosa intestinal;
6. Ocorreu um aumento na expressão da molécula de co-estimulação CD86 em DCs dos linfonodos mesentéricos;
7. DCs de MLN se mostraram mais afetadas do que aquelas providas do baço.

**6.2 – Quanto ao tempo de manutenção da tolerância oral:**

8. A tolerância oral se manteve por um período maior em camundongos imunizados com adjuvante + antígeno logo após o tratamento oral com antígeno, tanto para a resposta de IgE como para a resposta de IgG1;
9. Foi necessária tanto a presença de antígeno como a do adjuvante durante a imunização para que a tolerância oral se mantivesse por longo tempo para a resposta de IgG1, mas não para a resposta de IgE;
10. Foi necessária a administração concomitante de antígeno e adjuvante por via i.p. para que a tolerância oral se mantivesse por longo tempo para a resposta de IgG1, mas não para a resposta de IgE ;
11. Tanto para manutenção da supressão da resposta de IgE como de IgG1 foi necessária a administração de antígeno e adjuvante pela mesma via, seja ela s.c. ou i.p.;
12. O tratamento oral seguido de imunização com antígeno + adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> levou a um aumento na frequência de células reguladoras;
13. A partícula do antígeno ou a utilização ácido úrico como adjuvante não

aumentaram o tempo de manutenção de tolerância oral em camundongos.

## **7 - REFERÊNCIAS**

1. Afuwape, A.O., Turner, M.W., & Strobel, S. (2004) Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 40+48.
2. Almeida, A.R., Zaragoza, B., and Freitas, A.A. (2006) Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: The number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is indexed to the number of IL-2 producing cells. *J. Immunol.* 177:192-200.
3. Aroeira, L.S., Cardillo, F., De Albuquerque, D.A., Vaz, N.M., Mengel, J. (1995) Anti-IL-10 treatment does not block either the induction or the maintenance of orally induced tolerance to OVA. *Scand. J. Immunol.* 41 (4): 319-323.
4. Arranz, E., O'Mahony, S., Barton, J.R., Ferguson, A. (1992) Immunosenescence and mucosal immunity: significant effects of old age on secretory IgA concentrations and intraepithelial lymphocyte counts. *Gut.* 33: 882-886.
5. Barsante, M.M. (2001) O papel do baço e dos linfonodos mesentéricos na indução de tolerância oral. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.
6. Bol-Schoenmakers, M., Rezende, M.M., Bleumink, R., Man, S., Hassing, I., Fiechter, D., Pieters, R.H.H.H. & Smit, J.J. (2010) Regulation by intestinal gd T cells during establishment of food allergic sensitization in mice. *Allergy* DOI:10.1111/j.1398-9998.2010+02479.x
7. Brandtzaeg, P. and Pabst, R. (2004) Let's go mucosal: communication on slippery ground. *TRENDS in Immunology.* 25:5070-577.
8. Carvalho, C.R., Verdolin, B.A., Souza, A.V., Vaz, N.M. (1994) Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J. Immunol.* 39: 533-538.
9. Carvalho, C.R. & Vaz, N.M. (1996) Indirect effects are independent of the way of tolerance. *Scand. J. Immunol.* 43: 613-618.
10. Chechade, M. and Mayer, L. (2004) Oral Tolerance and its relation to food hypersensitivities. *C. Rev. allergy Clin. Immunol.* 115: 3-12.
11. Chen Y., Chou K., Fuchs E., Havran W.L., Boismenu R. (2002) Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(22):14338-43.

12. Chiu, B-C., Stolberg, V.R., Zhang, H., Chensue, S.W. (2007) Increased Foxp3<sup>+</sup> Treg cell activity reduces dendritic cell co-stimulatory molecule expression in aged mice. *Mech. of aging and development*. 128: 618-627
13. Christ, M.; McCartney-Francis, N.L., Kulkarni, A.B., Ward, J.M., Mizel, D.E., Mackall, C.L., Gress, R.E., Hines, K.L., Tian, H., Karlson, S. e cols. (1994) Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficiente mice. *J. Immunol*. 153: 1936-1946.
14. Chung, Y., Lee, S.-H., Kim, D.-H. and Kang, C.-Y. (2005). Complementary role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and TGF-β in oral tolerance. *Journal of Leukocyte Biology*. 77:906-913.
15. Clambey, E.T.; Kappler, J.W.; Marrack, P. (2007) CD8 T cell clonal expansions & aging: A heterogeneous phenomenon with a common outcome. *Exp. Gerontology*. 42: 407-411
16. Conrad, M.L., Yildirim, A.O., Sonar, S.S., Kiliç, A., Sudowe, S., Lunow, M., Teich, R., Renz, H. and Garn, H. (2009) Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clinical et Experimental Allergy*. 39: 1246-1254.
17. Coombes, J.L., Siddiqui, R.R., Cárcamo, J.H., Sun, C-M., Belkaid, Y. and Powrie, F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-β-and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp .Med*. 204(8): 1757-1764.
18. Curotto de Lafaille, M.A., Lino, A.C., Kutchukhidze, N. and Lafaille, J.J. (2004) CD25<sup>-</sup> T cells generate CD25<sup>+</sup>foxp3<sup>+</sup> regualtory T cells by peripheral expansion. *J. Immunol*. 173: 7259-7268.
19. Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J.J. (2008) Adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell- dependent and – independent control of allergic Inflammation. *Immunity* 29, 114-126.
20. Das, G., Augustine, M.M., Das, J., Bottomly, K., Ray, P., and Ray, A. (2003) An important regulatory role for CD4<sup>+</sup>CD8aa T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of Inflammatory bowel disease. *PNAS* 100, 5324-5329.
21. Dejaco, C.; Duftner, C., Schirmer, M. (2006) Are regulatory T-cells linked with aging? *Exp. Gerontology*. 41: 339-345.
22. Denning TL, Granger SW, Mucida D, Graddy R, Leclercq G, Zhang W, Honey K, Rasmussen JP, Cheroutre H, Rudensky AY, Kronenberg M. 2007. Mouse

- TCR $\alpha$ beta+CD8 $\alpha$  intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J Immunol.* 178 (7):4230-9.
23. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath M. (1996) Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol.* 26(4):934-8.
24. Fancione, S., Pereira de Siqueira, A.L., Russo, M., Marzagão Barbutto, J.A. and Mariano, M. (1997) A novel model of late-phase reaction of immediate hypersensitivity. *Mediators of Inflammation.* 6: 127-133.
25. Faquim-Mauro, E.L., Coffman, R. L., Abrahamsohn, I.A., and Macedo, M.S. (1999) Cutting Edge: Mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J. Immunol.* 163: 3572-3576.
26. Faquim-Mauro, E.L., and Macedo, M.S. (2000) Induction of IL-4 dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. *Internat. Immunol.* 12(12): 1733-1740.
27. Faria, A.M.C., Garcia, G., Rios, M.J.C., Michalaros, & Vaz, N. (1993) Decrease in susceptibility to oral tolerance and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunol.* 78: 147-151.
28. Faria, A.M.C., Ficker, S.M., Speziali, E., Menezes, J.S., Stransky, B., Rodrigues, V.S., Vaz, N.M. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. (1998a) *Mech. of aging and development.* 102: 67-80
29. Faria, A.M.C., Ficker, S.M., Speziali, E., Menezes, J.S., Stransky, B., Verdolin, B.A., Lahmann, W.M., Rodrigues, V.S. and Vaz, N.M. (1998b) Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Brazilian J. Med. Biol. Research.* 31: 35-48.
30. Faria, A.M.C., Maron, R., Ficker, S.M., Slavin, A.J., Spahn, T., Weiner, H.L. (2003) Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-B/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity.* 20: 135-145



31. Faria, A.M.C. and Weiner, H.L. (2005) Oral Tolerance. *Immunol. Reviews.* 206: 232-259.
32. Faria, A.M.C. and Weiner, H.L. (2006). Oral tolerance and TGF- $\beta$ - Producing Cells. *Inflammation & Allergy-Drug Targets.* 5:179-190.
33. Fayette J, Dubois B, Vandenabeele S, Bridon JM, Vanbervliet B, Durand I, Banchereau J, Caux C, Brière F. (1997) Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med.* 185(11):1909-18.
34. Fleeton, M., Contractor, N., Leon, F., He, J., Wetzel, D., Dermody, T., Iwasaki, A., and Kelsall, B. (2004). Involvement of dendritic cell subsets in the induction of oral tolerance and immunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1029: 60-65.
35. Ferguson, A. and Murray, D. (1971) Quantification of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut.* 12: 988-994
36. Fujihashi, K., Kato, H., Van GinKel, F.W., Koga, T., Boyaka, O.N., Jackson, R.J., Kato, R., Hgiwara, Y., Etani, Y., Goma, I., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J.R. (2001) A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. *Acta Odontol. Sascand.* 59(5): 301-308.
37. Fujihashi, K., McGhee J.R. (2004) Mucosal immunity and tolerance in the elderly. *Mech. Ageing devel.* 125: 889-898.
38. Ghandi, R., Farez, M.F., Wang, Y., Kozoriz, D., Quintana, F.J., and Weiner, H.L. (2010) Human latency associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. *J.Immunol.* 184, 4620-4624.
39. Gomez, C.R., Boehmer, E. D., and Kovacs, E.J. (2005) The aging innate immune system. *Current opinion in Immunology.* 17:457-462.
40. Gupta, R.K. (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Ad. Drug Del. Rev.* 32: 155-172.
41. Guy, B. (2007) The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews.* 5: 505-516.
42. Han, G.M., Zhao, B., Jeyaseelan, S., and Feng, J.M. (2009) Age-associated parallel increase of Foxp3(+)CD4(+) regulatory and CD44(+)CD4(+) memory T cells in SJL/J mice. *Cell Immunol.* 258, 188-96.
43. Haruna, H., Inaba, M., Inaba, K., Taketani, S., Sugirura, K., Fukuba, Y., Doi, H., Toki, J., Tokunaga, R., and Ikehara, S. (1995) Abnormalities of B cells and dendritic cells in SAMP1 mice. *Eur. J. Immunol.* 25, 1319-1325.

44. Hasler, P., Zouali, M. (2005) Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cellular Immunol.* 233: 102-108.
45. Haskins, K., Kubo, J., White, M., Pigeon, J. W., Kappler, and P. Marrack. (1983) The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. *J. Exp. Med.* 157:1149.
46. Hawiger, D., Masilamani, R.F., Betteli, E., Kuchroo, V.K., and Nussenzweig, M. (2004) Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20(6), 695-705.
47. Hayashi, O., Katayanagi, Y., Ishii, K., and Kato, T. (2009) Flow cytometric analysis of age-related changes in intestine intraepithelial lymphocyte subsets and their functional preservation after feeding mice on spirulina. *J. Med. Food.* 12, 982-989.
48. Heath, W.R. and Carbone, F.R. (2003) Danger liaisons. *Nature.* 425:460-1.
49. Hu, De-En, Moore, A.M., Thomsen, L.L. and Brindle, K.M. (2004) Uric acid promotes tumor immune rejection. *Cancer Research.* 64: 5059-5062.
50. Iliev, I.D., Miteli, E., Matteoli, G, Chieppa, M and Rescigno, M. (2009) Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunology.* 22: 1-11.
51. Ishimoto, Y., Tomiyama-Miyaji, C., Watanabe, H., Yokoyama, H., Ebe, K., Tsubata, S., Aoyagi, Y., and Abo, T. (2004) Age-dependent variation in the proportion and number of intestinal lymphocyte subsets, especially natural killer T cells, double-positive CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells and B220<sup>+</sup> T cells in mice. *Immunol.* 113, 371-377.
52. Kang, I., Hong, M.S., Nolasco, H., Park, S.H., Dan, J.M., Choi, J-Y., and Craft, J. (2004) Age-associated change in the frequency of memory CD4<sup>+</sup>T cells impairs long term CD4<sup>+</sup>T cell responses to influenza vaccine. *J. Immunol.* 173: 673-681.
53. Kapp, J.A., Kapp, L.M., McKenna, K.C., Lake, J.P. (2004) Gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. *Immunol.* 111: 155-64.
54. Kato, H., Fujihashi, K., Kato, R., Dohi, T., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Kataka, K., Kobayashi, R., and McGhee, J.R. (2003) Lack of oral tolerance in aging is

- due to sequential loss of Peyer's patch cell interactions. *Internat. Immunol.* 15(2):145-158.
55. Ke, Y., Pearce, K., Lake, J.P., Ziegler, H.K., and Kapp, J.A. (1997)  $\gamma\delta$ T lymphocytes regulate the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* 158:3610-3618.
56. Kearney, E. R., K. Pape, D. Y. Loh, and M. K. Jenkins. (1994) Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1:327.
57. Keller, A.C., Mucida, D., Gomes, E., Faquim-Mauro, E., Faria, A.M.C., Rodriguez, D. and Russo, M. (2005) Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 117(2): 283-290.
58. Kensil, C.R., Mo, A.X., and Truneh, A. (2004) Current vaccine adjuvants: an overview of diverse class. *Frontiers in Bioscience.* 9: 2972-2988.
59. Kim P.H., Kagnoff, M.F. (1990) Transforming growth factor beta 1 increases IgA isotype switching at the clonal level. *J Immunol.* 145(11):3773-8.
60. Kool, M., Soullié, T., Van Nimwegen, M., Willart, M.A.M., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H. and Lambrecht, B.N. (2007) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *The J Experimental Medicine.* 205 (4): 869-882.
61. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 75(2):263-74.
62. Kweon, M.; Fujihashi, K.; VanCott, J.L.; Higuchi, K.; Yamamoto, M.; McGhee, J.R. and Kiyono, H. (2010) Lack of orally induced unresponsiveness in IFN- $\{\gamma\}$  knockout mice. *J. Immunol.* 160: 1687-1693.
63. Lahmann, W.M.; Menezes; J.S.; Verdolin, B.A.; and Vaz, N.M. (1992) Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 25: 813-821.
64. Lambolez, F., Kronenberg, M., Cheroute, H. (2007) Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs. *Immunol. Rev.* 215, 178-88.
65. Letterio, J.J. and Roberts, A.B. (1997) TGF- $\beta$ : a critical modulator of immune cell function. *Clinical Immunol. and Immunopathology* 84 (3): 244-250.
66. Linton, P.J. & Dorshkind, K. (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nature Immunol.* 5(2):133-139.

68. Listi, F., Candore, G., Modica, M.A., Russo, M., Lorenzo, G. Di, Esposito-Pelliteri, M., Colonna-Romano, G., Aquino, A., Bulati, M., Lio, D., Franceschi, C. and Caruso, C. (2006) A study of serum immunoglobulin levels in elderly persons that provides new insights into B cell immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1089: 487-495.
69. McCormack, J.E., Callahan, J.E., Kappler, J. & Murrack, P.C. (1993) Profound deletion of mature T cells in vivo by chronic exposure to exogenous superantigen. *J. Immunol.* 150: 3785-3792.
70. Melamed, D. and Friedman, A. (1993) Modification of the immune response by oral tolerance: Antigen requirements and interaction with immunogenic stimuli. *Cellular Immunol.* 146: 421-420. .
71. Melamed, D., Fishman-Lobell, J., Uni, Z., Weiner, H.L. and Friedman, A. (1996) Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. *Internat. Immunol.*, 8(5): 717-724.
72. Menezes, J. da S., Mucida, D. de S., Cara, D.C., Alvarez-Leite, J.I., Russo, M., Vaz, N.M. and Faria, A.M.C. (2003) Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *J. Soc. Immunol.* 15 (3): 447-455.
73. Mengel, J., Cardillo, F., Aroeira, L.S., Williams, O., Russo, M., Vaz, N.M.(1995) Anti- $\gamma\delta$  T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol. letters.* 48: 97-102.
74. Miller, S.D. and Hanson, D.G. (1979) Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *J. Immunol.* 123(5): 2344-2350.
75. Mitchell, T.C., Hildeman, D., Kedl, R.M, Teague, T.K., Schaefer, B.C., White, J., Zhu, Y., Kappler, J. and Murrack, P. (2001) Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nature Immunol.* 2 (5): 397-402.
76. Moreau, A.-C. and Gaboriau-Routhiau, V. (1996) The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res. Immunol.* 147: 49-59.
77. Mowat, A.M., Strobel, S., Drummond, H.E., & Ferguson, A. (1982) Immunological response to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunol.* 45:105-113.

78. Mowat, A. Mcl. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews*. 3: 331-341.
79. Mucida, D., Kutchukidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaile, J.J. and Lafaile, M.A.C. (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring T regs. *Journal of Clinical Investigations*. 115: 1923-1933.
80. Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turouskaya, O., Scott, I., Kronenbrg, M., Cherout, H. (2007) Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 317(5835): 256-260.
81. Nakamura, K., Kitani, A., Fucs, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., and Strober, W. (2004) TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J.Immunol*. 172(2): 834-842.
82. Ngan, J., & Kind, L.S. (1978) Supressor T cells for IgE and IgG in Payer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J. immunol*. 120:861-865.
83. Nikolich-Zugich, J. (2005) T cell aging: naïve but not young. *JEM*. 201(6): 837-840.
84. Polte, T., Hennig, C. and Hansen, G. (2008) Allergy prevention starts before conception: Maternofetal transfer of tolerance protects against the development of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 122: 1022-1030.
85. Poussier P., Ning T., Banerjee D., Julius M. (2002) A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med*. 195(11):1491-7.
86. Richman, L.K., Chiller, J.M, Brown, W.R., Hanson, D.G. and Vaz, N.M. (1978) Enterically induced immunologic Tolerance I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J. Immunol*. 121 (6): 2429-2434.
87. Rizzo, L.V., Morawetz, R.A., Miller-Rivero, N.E., Choi, R., Wiggert, B., Chan, C.C., Morse, H.C., III, Nussenblatt, R.B. & Caspi, R.R. (1999) IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J. Immunol*. 162: 2613-2622.
88. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Ver. Immunol*. 22: 531-562.

89. Sakaguchi, S. and Powrie, F. (2007) Emerging challenges in regulatory T cell function and Biology. *Science*. 317: 627-629.
90. Schmucker, D.L., Owen, R.L., Outenreath, R., Thoreux, K. (2003) Basis for age-related decline in intestinal immunity. *Clin. Dev. Immunol.* 10(2-4): 167-172.
91. Senda, S., Cheng, E., and Kawanishi, H. (1988) Aging-associated changes in murine intestinal immunoglobulin A and M secretions. *Scand J Immunol.* 27, 157-64.
92. Shi, Y., Evans J.E. & Rock, K.L. (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 425:516-21.
93. Simioni, P.U., Fernandes, L.G., Gabriel, D.L., Tamashiro, W.M. 2010. Effect of aging and oral tolerance on dendritic cell function. *Braz J Med Biol Res.* 43, 68-76.
94. Simon, L., Shine, G. and Dayan, A.D. (1994) Effect of animal age on the uptake of large particulates across the epithelium of the rat small intestine. *Int. J. Exp. Pathol.* 75: 369
95. Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y., Ishii, T., Sugimoto, M., Araki, S., Tominaga, A., Yamaguchi, N. and Takatsu, K. (1989) Transforming growth factor B induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp. Med.* 1989, 170: 1415–1420.
96. Spahn T.W., Fontana, A., Faria A.M., Slavin, A.J., Eugster, H.P., Zhang, X., Koni, P.A., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., Rennert, P.D., Weiner, H.L. (2001) Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* 31: 1278-87.
97. Speziali, E. de F. (1999). Manutenção dos padrões de reatividade imunológica durante o processo de senescência. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G.
98. Speziali, E., Santiago, A.F., Fernandes, R.M., Vaz, N.M, Menezes, J.S., Faria, A.M.C. (2009) Specific immune response but not basal functions of B and T cells are impaired in aged mice. *Cell. Immunol.* 256, 1-5.
99. Stavnezer J, Kang J. (2009) The surprising discovery that TGF beta specifically induces the IgA class switch. *J Immunol.* Jan 1;182(1):5-7.

100. Steger, M.M., Maczek, C., Grubeck-Loebenstien, B. (1996) Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. *Clin. Exp. Immunol.* 105, 544-50.
101. Steinman, R.M. and Nussenzweig, M.C. (2002) Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Immunol.* 99: 351-358.
102. Stills Jr., H.F. (2005) Adjuvantes and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's Complete and others adjuvants. *ILAR Journal.* 46(3): 280-295.
103. Storni, T., Kunding, M., Senti, G., Johansen, P. (2005) Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Ad. Drug Del. Rev.* 57: 333-255.
104. Strobel, S. & Ferguson, A. (1984) Immune responses to fed protein antigens in mice. 3. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigen is first encountered. *Pediatr. Res.* 18: 588-594.
105. Strobel, S. & Ferguson, A. (1987) Persistence of oral tolerance in mice fed ovalbumin is different for humoral and cell-mediated immune responses. *Immunol.* 60: 317-318.
106. Strobel, S. and Mowat, A. Mcl. (2006) Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Current Opinion and Clin. Immunol.* 6: 207-213.
107. Sun, C-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204(8): 1775-1785.
108. Szewczuk, M.R.; Campbell, R.J.; and Jung, L.K. (1981) Lack of age-associated immune dysfunction in mucosal-associated lymph nodes. *J. Immunol.* 126(6): 2200-2204.
109. Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaile, J.J. and Dustin, M.L. (2006) Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4<sup>+</sup> T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Medicine.* 203:505-511.
110. Takeoka, Y., Chen, S.Y., Yago, H., Boyd, R.L., Suehiro, S., Shultz, L.D., Ansari, A.A. & Gershwin, ME. (1996). The murine thymic microenvironment: changes with age. *Int Arch Allergy Immunol.* 111: 5-12.

111. Taub, D. D. and Longo, D.L. (2005) Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol. Reviews*. 205: 72-93.
112. Tobagus, I.T., Thomas, W.R. and Holt, P. (2004). Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period. *J. Immunol.* 172: 2274-2285.
113. Thornton A.M., Korty P.E., Tran D.Q., Wohlfert E.A., Murray P.E., Belkaid Y., Shevach E.M. (2010) Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol.* 184(7):3433-41.
114. Tsuji, N.M, Mizumachi, K. and Kurisaki, J.-I. (2003). Antigen-specific, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell clones induced in Peyer's patches. *Internat. Immunol.* 15:525-534.
115. Vaz, N.M., Maia, L.C.S., Hanson, D.G., & Lynch, J.M. (1977). Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult mice by previous feeding with the specific antigen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60: 110-115.
116. Vaz, N.M; Kane, R.E.; Lynch, J.M. (1981) On the adjuvant effect of Aluminium Hydroxide for mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 76(1): 93-98.
117. Vaz, N.M, Rios, M.J.C., Lopes, L.M., Gontijo, C.M., Castanheira, E.B., Jacquemart, F., and Andrade, L.A.B. (1987) Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 20: 785-790.
118. Vieira, P.L., Christensen, J. R., Minaee, S., O'Neill, E.J., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D.C. and O'Garra, A. (2004). IL-10-Secreting regulatory T cells do not express foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 5986-5993.
119. Viney, J., Mowat, A.M., O'Malley, J.M., Williamson, E., and Fanger, N.A. (1998) Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J.Immunol.* 160, 5815-5825.
120. Wakabayashi, A., Utsuyama, M., Hosoda, T., Sato, K., Hidokawa, K. (1999) Differential age effect of oral administration of na antigen on antibody response: an induction of tolerance in young mice but enhancement of immune response in old mice. *Mech. Ag. Develop.* 109: 191-201.



121. Wakabayashi, A., Kumagai, Y., Watari, E., Shimizu, M., Utsuyama, M., Hirokawa, K. and Takahashi, H. (2006). Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunol.* 119: 167-177.
122. Wan, Y.Y., and Flavell, RA. (2006) The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 212, 114-30.
123. Weiner, H.L, Friedman, A., Miller, A. 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: 809-838.
124. Weiner, H.L., Gonnella, P.A., Slavin, A. and Maron, R. (1998) III. Tolerance in the Mucosal Immune System. Oral tolerance: cytokine milieu in the gut and modulation of tolerance by cytokines. *72<sup>nd</sup> Forum in Immunol.* 528-533.
125. Weiner, H.L. (2001) The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and Tr1 and TH3 regulatory cells. *Nature.* 2 (8) : 671-672.
126. Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R. and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 203: 519-527.
127. Zhang, X., Izikson, L., Liu, L., and Weiner, H.L. (2001) Activation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by oral antigen administration. *J. Immunol.* 167: 4245-4253.
128. Zhao, L. Sun, H.W., Ma, H., Liu, G. And Zhao, Y. (2007) Changes of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in aged BALB/c mice. *J. Leuck. Biology.* 81: 1386-1394.





**Anexo A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal  
da UFMG**

**Anexo B – Artigos Científico Publicados**