



ANTONIO CARLOS DA SILVA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)

ANTONIO CARLOS DA SILVA

e aprovada pela Comissão Julgadora

Campinas 24/6/92

Estudo Genético da Tolerância Imunológica
por Seleção Bidirecional.

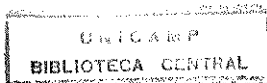
Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas, como
parte dos requisitos necessários à
obtenção do Título de Doutor em Ciências,
na Área de Biologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Oswaldo Augusto E.B. Sant'Anna

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
Campinas - São Paulo
- 1992 -

Si38e

17083/BC



840119267

ANTONIO CARLOS DA SILVA

Estudo Genético da Tolerância Imunológica por Seleção Bidirecional.

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVER-
SIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, COMO PARTE DOS REQUISI-
TOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOLOGIA.

Aprovada por:

Prof.
(Presidente da Banca)

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
Campinas - São Paulo
- 1992 -

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Antonio Carlos da

Estudo Genético da Tolerância Imunológica por Seleção Bidirecional. Campinas, SP, UNICAMP, 1992.

viii, 91 f., ilustr.

Tese: Doutor em Ciências (Imunologia)

1. Seleção Bidirecional
 2. Tolerância
 3. Genética
 4. Ovalbumina.
- II. Estudo Genético da Tolerância Oral por Seleção Bidirecional.

- I. Universidade Estadual de Campinas
- II. Título
-

Ao José Claudionor
e Nadir Coelho,
meus pais.

e à esposa e filhos

Gessy,

Leonardo e

Tiago

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Oswaldo Sant'Anna, pela orientação científica e pelo apoio e amizade demonstrados durante a realização deste trabalho, assim como ter me permitido observar a importância da seleção genética no estudo da resposta imune.

Aos pesquisadores do Laboratório Especial de Imunogenética do Instituto Butantan, que me mostraram a importância do trabalho em equipe. Um agradecimento especial à Drª Maria Siqueira e à Profª. Solange Massa.

Ao Dr. Marcos Garcia Costa do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, pela amizade e incentivo nos momentos críticos.

A Sra. Ismália Menegon Doné e Sr. Guilherme Vieira pelos cuidados oferecidos às linhagens de camundongos em processo de seleção.

A todos enfim, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Duas linhagens de camundongos estão em processo de seleção para susceptibilidade (linhagem ST) e resistência (linhagem RT) à tolerância oral. Os acasalamentos seletivos se iniciaram de uma população F_0 , geneticamente heterogênea, originada do inter cruzamento de oito linhagens isogênicas escolhidas por suas origens distintas: A, DBA₂, P, SWR, SJL, CBA, Balb/c e C57Bl₆. Sete dias após administração intragástrica de 5 mg/0,2 ml de proteína solúvel, camundongos de 2 a 3 meses de idade foram imunizados intraperitonealmente (ip) com 100 µg/0,2 ml dos antígenos correspondentes. Os títulos individuais de anticorpo, expressos como $\log_2$ da mais alta diluição do soro dando uma reação positiva, foram medidos pelo teste de hemaglutinação passiva 14 e 28 dias após a imunização.

Os fenótipos extremos correspondendo aos maiores e menores títulos foram escolhidos e, os camundongos acasalados evitando-se a união entre irmãos. A segunda prole de cada casal foi usada como controle e, imunizada apenas por via ip para avaliação de imunocompetência da geração correspondente e, para evitar a seleção de camundongos não-respondedores.

Duas proteínas heterólogas, albumina de ovo de galinha (OVA) e soro-albumina bovina (BSA), foram alternadas em gerações consecutivas de forma a evitar a interferência de anticorpos transmitidos maternalmente. Uma distribuição normal de títulos de anticorpos foi observada na população F_0 pré-tratada e imunizada com OVA. Os títulos aglutinantes oscilaram de 4 a 14 $\log_2$, com uma média ($\bar{X}$) de 10,12 e variância (V) de 4,67. Diferenças interlinhagens altamente significantes foram observadas nos descendentes F_4 , com $\bar{X} = 9,55 \pm 2,68$ para ST e $\bar{X} = 13,03 \pm 2,92$ para RT. Os valores de herdabilidade média (h^2) foram 10% e 23% para as linhagens ST e RT respectivamente. É importante enfatizar que não há diferença significativa na segunda prole controle, entre as linhagens ST e RT. Estes resultados indicam controle poligênico da tolerância e indicam a viabilidade de uma experiência de seleção.

ABSTRACT

Two lines of mice are in the process of selection for susceptibility (TS line) and resistance (TR line) to oral tolerance. The selective breeding was started from a highly genetically heterogeneous F_0 population consisting of the balanced intercrossing of eight inbred lines chosen for this distinct origin: A, DBA₂, P, SWR, SJL, CBA, Balb/c e C57Bl₆. Seven days after intragastric administration of 5 mg/0,2 ml solute protein, 2-3 months old mice were immunized intraperitoneally (ip) with 100 µg/0,2 ml of the corresponding antigen. The individual antibody titers, expressed as $\log_2$ of the highest serum dilution giving a positive reaction, were measured by the passive hemagglutination test 14 and 28 days after immunization.

The highest and lowest extreme phenotypes were chosen and mice were bred avoiding brother x sister meetings. The second offspring of each couple were used as control and only immunized ip to evaluate the immunocompetence of the corresponding generation and to ascertain the non-selection of non-responder mice.

Two non-cross-reacting heterologous proteins, hen ovalbumin (OVA) and bovine serum albumin (BSA), were alternated in consecutive even and other generations in order to avoid the interference of maternally transmitted antibodies. A normal distribution of antibody titers was observed in the F_0 population pretreated and immunized with OVA. The agglutinin titers ranged from 4 to 14 $\log_2$, with a mean ($\bar{X}$) of 10,12 and 4,67 variance (V). Highly significant interline differences were observed in the F_4 descendents, with a $\bar{X} = 9,55 \pm 2,68$ for TS and $\bar{X} = 13,03 \pm 2,92$ for TR line. The mean herdability (h^2) values were 10% and 23% for the TS and TR lines, respectively. It should be stressed that there was no significant difference in the control second offspring between the TS and TR lines. These results indicate polygenic control and predict the feasibility of a selection experiment.

Introdução

1 - INTRODUÇÃO

A variação genética é a característica mais importante das populações e, a base sobre a qual atua a seleção natural. Segundo Darwin "em um mundo de recursos finitos, alguns organismos farão uso mais eficiente destes recursos para produzirem sua prole e, deixarão mais descendentes que seus parentes menos eficientes". Esta definição enfatiza a probabilidade de sobrevivência (viabilidade) desde a concepção até a idade reprodutiva, como um componente da capacidade adaptativa do indivíduo a um determinado ambiente, assim como sua habilidade reprodutiva.

A base genética inicial para se compreender a ação da seleção natural foi dada por Mendel, que colocou ênfase nas variações entre os indivíduos de uma mesma família e, idealizou suas leis estudando caracteres em classes fenotípicas distintas onde a substituição de um alelo por outro leva a uma grande mudança fenotípica (distribuição descontínua). Estas grandes diferenças fenotípicas, tornam pouco importantes a participação do ambiente e de pequenas diferenças genéticas entre os indivíduos e, toda variação é vista como exclusivamente genética.

A seleção natural atua através da sobrevivência e reprodução dos indivíduos (valor adaptativo). Se as diferenças de valor adaptativo estão de alguma forma associadas com a presença ou ausência de um gene particular no genótipo do indivíduo, então a seleção opera naquele gene. Assim, um gene que aumente o valor adaptativo médio dos indivíduos que o

carregam provocará o aumento de sua própria freqüência na população. Este é o tipo de seleção assumido por Darwin como a principal causa de evolução adaptativa no mundo biológico. Por outro lado, se um gene reduz a aptidão dos indivíduos devido ao seu efeito deletério na viabilidade ou fertilidade, ele tende a ser eliminado. Entretanto, estes genes que aumentam ou diminuem a aptidão, não atuam dissociadamente dos outros genes. Desta forma, a viabilidade de um genótipo é uma propriedade da população. Uma medida eficiente do valor adaptativo de um dado genótipo, exige um conjunto de indivíduos homozigotos em relação ao respectivo locus, mas com distribuição ao acaso dos outros genes, a fim de que seja testado a sua contribuição à adaptabilidade, em combinação com todos os outros genes do patrimônio genético da espécie, o que é impossível.

Por outro lado, o objeto da mudança evolutiva são exatamente aqueles caracteres para os quais a substituição gênica individual permite apenas leves diferenças no fenótipo.

Francis Galton tentou construir um modelo de herança baseado no grau de semelhança entre os filhos e seus pais. A lei de Galton de "Regressão Filial" dá ênfase ao fato de que os filhos de pais com fenótipos extremos tendem a retornar a média da geração parental. O esquema de Galton depende inteiramente da regressão entre médias, isto é, a ênfase nas variações dentro das famílias foi colocada na descrição média dos filhos, ao invés da variação entre os filhos como fez Mendel. Diferente da natureza distinta das classes fenotípicas monogênicas, as características descritas pelo modelo de

herança de Galton são contínuas e se devem muito provavelmente a pequenas mudanças no fenótipo como consequência do acúmulo do pequeno efeito de vários genes e da ação ambiental. Nestes casos, é impossível caracterizar os indivíduos por seu fenótipo, já que diferentes genótipos produzem fenótipos superpostos, isto é, os genótipos particulares não podem ser identificados.

Os modelos genéticos utilizados para explicar a variação quantitativa, levam em conta a existência de um grande número de genes. É assumido que muitos genes polimórficos presentes na população afetem o caráter e, que cada alelo relevante em vários loci independentes, tem efeito aditivo. A variação fenotípica de indivíduos portadores de um mesmo genótipo é considerada como sendo devida a efeito ambiental. O somatório do efeito de cada alelo relevante, associado ao efeito ambiental, é responsável pela expressão do fenótipo individual e, a variação total depende então dos efeitos dos alelos, de suas frequências na população e, da magnitude do efeito ambiental.

As heranças monogênica ou digênica são demonstráveis em organismos superiores somente sob circunstâncias especiais como linhagens com genoma uniforme, ou de análise fenotípica a nível do produto do gene. A descrição de que os fenótipos de uma característica quantitativa são consequência apenas do efeito aditivo de genes isolados, na verdade se utiliza do modelo mendeliano demonstrado sob estas circunstâncias especiais. Esta descrição ignora a interação fisiológica entre os loci e, a existência de grupos de ligação.

Foi proposto por FISHER (1930) que a seleção natural poderia favorecer a ligação de dois genes influenciando o mesmo polimorfismo. Desta forma, loci contíguos poderiam formar blocos de alelos em segmentos cromossômicos que poderiam incluir braços cromossômicos ou cromossomos inteiros. A seleção natural favoreceria a ligação entre eles, dificultando o surgimento de recombinantes e, assim seriam preservados certas combinações gênicas polimórficas, possuidoras de uma variância potencial do valor adaptativo (LEWONTIN, 1974). Em resumo, genes nas populações não existem em combinações completamente ao acaso com outros genes (exemplo: o complexo principal de histocompatibilidade - MHC). Os alelos em um locus segregam em um contexto que inclui uma grande quantidade de correlação com a segregação de outros genes em loci vizinhos. Segmentos cromossômicos relevantes podem ser tornados homozigotos com distribuição ao acaso dos genes restantes, e o efeito destes segmentos pode ser mensurável. Um modelo de herança quantitativa teria também que levar em conta a ligação entre genes polimórficos constituindo grupos poligênicos de grande valor adaptativo.

Como as características biológicas gerais envolvem vários traços, um organismo bem adaptado a um dado ambiente, segundo FISHER (1930) requer o ajustamento simultâneo destes traços. As diferenças genéticas em todos os loci, como já vimos, sejam aquelas de genes isolados ou de genes mantidos em estreita ligação, devem ter efeito pleiotrópico a nível da observação dos fenótipos. Cada conjunto gênico então pode afetar mais de um caráter. Como consequência da contribuição

relativa de cada traço para o valor adaptativo, a pressão seletiva sobre cada um destes traços é conflitante e, a seleção natural atua no sentido de manter a integração entre os sistemas poligênicos. Como enfatizado por Darwin, a pressão aplicada a um caráter tem necessariamente efeito genético sobre outros.

Como consequência da complexidade dos sistemas biológicos, grande parte da informação relevante de caracteres quantitativos não pode ser mensurada. A única informação obtida de imediato em uma população consiste de mudanças fenotípicas individuais de uma ou mais gerações e das relações de parentesco entre seus membros.

Para o estudo do controle genético de características quantitativas, o ponto de partida é a descrição da sua variação biológica e a tentativa de caracterização de seus componentes, a saber genético e não-genético ($VF = VG + VE$). A contribuição não-genética (variação ambiental, VE) inclui toda fonte de variação, exceto aquela originada pelas diferenças genotípicas entre os indivíduos.

A variância genética (VG) pode ser fracionada levando-se em conta o efeito aditivo dos genes relevantes (VA), da relação de dominância entre os alelos (VD) e da interação epistática entre os diferentes loci (VI), daí:

$$VF = VA + VD + VI + VE.$$

A variância aditiva no entanto, é o único componente da variância genética que pode ser estimado diretamente das observações feitas na população já que ela é a causa principal da semelhança entre parentes. A variância aditiva é

basicamente a propriedade do gene enquanto que dominância e epistasia são propriedades das relações entre alelos de um mesmo locus e de loci diferentes. Como os indivíduos parentais contribuem com genomas haplóides para a constituição gênica da geração seguinte, as combinações epistáticas, assim como aquelas envolvendo relações de dominância, são desfeitas durante a reprodução para serem refeitas em diferentes combinações na população de genótipos na geração filial. Assim, contribui essencialmente para o progresso sob seleção, o parental com valor fenotípico superior à média de sua geração, como consequência do efeito aditivo de seus genes, embora, como visto acima, outros mecanismos genéticos possam contribuir para a variabilidade.

A mais importante propriedade de um caráter métrico, denominada herdabilidade (h^2), a qual é a proporção da variância total que é atribuída aos efeitos médios dos genes, é definida então como a fração da variância total na população que é devida a diferenças genéticas aditivas.

O estudo genético de uma característica quantitativa só pode ser feito por seleção direcional. Darwin postulou a existência deste tipo de seleção, para explicar mudanças evolutivas na natureza. A seleção direcional na natureza, é restrita a situações em que uma espécie enfrenta o impacto brusco de um novo ambiente.

Um programa de seleção direcional artificial permite a obtenção de informações muito úteis sobre características adaptativamente importantes. Este tipo de seleção artificial é feito pelo acasalamento preferencial de indivíduos apresentan-

do fenótipos semelhantes. A finalidade deste tipo de acasalamento é modificar a frequência gênica da população inicial, pelo aumento da probabilidade de acasalamentos dos fenótipos extremos. Desta forma é possível o acúmulo das características desejáveis pelo aumento da homozigose após várias gerações de seleção. Os genes não ligados aos alelos sob seleção permanecerão, em sua maioria, segregando, sem alteração sensível de suas frequências gênicas. É possível então, diferente dos animais isogênicos, a análise individual de segregantes F_2 e retrocruzados que reproduzem as populações naturais, permitindo assim o estudo comparativo entre populações geneticamente homogêneas e heterogêneas.

Já as linhagens isogênicas, com modificações conhecidas, embora extremamente esclarecedoras em relação ao efeito de alguns genes sobre as características estudadas, é limitante na medida em que estas não abarcam a amplitude de variação observada numa população natural e, conseqüentemente, não permitem um estudo global do caráter e seu controle genético (MOUTON et al., 1985; MOUTON et al., 1988).

A investigação da regulação genética da resposta imune tem sido realizada nas duas formas de expressão: qualitativa, a nível do indivíduo, pela utilização de linhagens isogênicas e, quantitativa, à nível de populações heterogêneas e de linhagens geneticamente selecionadas.

A utilização de linhagens isogênicas permitiu a descoberta de genes de resposta imune ligados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Este genes operam a nível de interações celulares entre macrófagos, linfócitos T e

B, controlam o reconhecimento específico de polipeptídeos sintéticos de heterogeneidade limitada, proteínas naturais complexas administradas em doses limítrofes de estimulação (onde somente o determinante mais potente é imunogênico) e aloantígenos que diferem do próprio somente por detalhes na estrutura molecular. Controlam, portanto, a resposta humoral ou celular a um único ou a poucos epítomos. Eles determinam então, o caráter respondedor ou não respondedor do animal imunizado (LEVINE et al., 1963; McDEVITT & SELA, 1965; VAZ & LEVINE, 1970; SACHS et al., 1977).

O estudo da regulação geral e quantitativa da resposta imune tem sido possível através da produção de linhagens de camundongos boas e más respondedoras a imunógenos naturais complexos administrados em doses ótimas, condições na qual a fase de reconhecimento a epítomos imunodominantes não é restritiva.

Estas linhagens foram obtidas por acasalamentos seletivos bidirecionais, a partir de populações de camundongos geneticamente heterogêneas, tendo como caráter fenotípico selecionador a produção máxima ou mínima de anticorpos em resposta aos antígenos escolhidos em condições de imunização previamente estabelecidas (BIOZZI et al., 1979a).

Os laboratórios de Imunologia do Instituto Biológico de São Paulo e Imunogenética do Instituto Curie de Paris, trabalhando conjuntamente, obtiveram cinco seleções independentes, usando diferentes antígenos: eritrócitos heterólogos (seleção I- BIOZZI et al., 1974; seleção II - FEINGOLD et al., 1976), antígenos flagelares e somáticos de *Salmonellas* (sele-

ção III e IV - SIQUEIRA et al., 1976) e proteínas heterólogas (seleção V - PASSOS et al., 1977).

A heterogeneidade genética, configurada na distribuição normal do caráter, das populações originais (F_0) das cinco seleções foi medida através da variância fenotípica (VF) e de seus componentes genético (VG) e ambiental (VE). A variância genética das populações iniciais (VGF_0) foi consequência da distribuição aleatória dos alelos de alta e baixa produção de anticorpos.

A divergência progressiva entre as linhagens de boa (H) e má resposta (L) em cada uma das seleções, ao lado do decréscimo de suas variâncias fenotípicas, evidenciaram a poligenia do caráter. Quando a separação máxima interlinhagem foi obtida, a continuidade dos cruzamentos não alterou mais a divergência e, a variância fenotípica se manteve constante. Neste ponto, atingiu-se o limite de seleção, ou seja, as linhagens foram consideradas homozigotas para todos os loci reguladores do caráter (BIOZZI et al., 1979a).

As cinco seleções mostraram similaridade nos vários parâmetros genéticos, tais como valores semelhantes para as herdabilidades realizadas ($h^2 = 0,20$) e variâncias genética e ambiental ao redor de 50%. A estimativa do número de loci (n), feita a partir da análise das médias e variâncias dos títulos de anticorpos das linhagens parentais, de híbridos F_1 , segregantes F_2 e retrocruzados, confirmou que a característica "síntese quantitativa de anticorpos" está submetida a regulação poligênica, determinada pelo efeito aditivo de

vários loci independentes (BIOZZI et al., 1979a; BIOZZI et al., 1980; SANT'ANNA et al., 1982).

Em cada seleção, os títulos de anticorpos produzidos contra os imunógenos selecionadores são sempre muito mais elevados nas linhagens H do que nas L. Esse efeito opera também em diferentes graus, conforme a seleção e o antígeno analisado, na resposta humoral contra muitos outros imunógenos naturais (efeito multiespecífico).

Apesar da modificação induzida nestas linhagens ter ocorrido ao nível de regulação da produção quantitativa de anticorpos, a amplitude variável desse efeito e do número de loci estimados sugere que grupos gênicos não equivalentes tenham sido afetados pelos vários processos seletivos, possivelmente em função do antígeno selecionador e do procedimento de imunização utilizado durante o processo seletivo (SIQUEIRA et al., 1977; BIOZZI et al. 1979a; BIOZZI et al., 1982; SANT'ANNA, 1979; SANT'ANNA et al., 1982).

A investigação da regulação genética da tolerância imunológica tem sido realizada apenas em seus aspectos qualitativos. A tolerância imunológica pode ser definida como a capacidade dos organismos em desenvolver um estado ativo de impedimento da resposta imune humoral ou celular. Assim, o estado tolerante não significaria incapacidade para responder imunologicamente. Normalmente dois grupos são distinguidos: os susceptíveis e os resistentes à tolerância.

A susceptibilidade ou resistência à tolerância imunológica é também influenciada por genes ligados ao MHC.

É conhecido que os genes de resposta imune (I_R) ligados ao MHC exercem seu efeito via moléculas de classe II, as quais são expressas nas células apresentadoras do antígeno (APC), provendo assim o contexto para o reconhecimento de antígenos pelas células T (ROSENTHAL & SHEVACH, 1975; YANO et al., 1977). Não apenas a ativação de células Th é restrita ao MHC, como também a ativação de células T_S depende da apresentação do antígeno no contexto de moléculas de classe II (TADA et al., 1976). No entanto, células Th reconhecem o antígeno no contexto de moléculas produzidas pela região I-A do H-2, e células T_S o reconhecem no contexto de moléculas da região I-E (BAXAVANIS et al., 1982). Os autores mostraram que a expressão de moléculas E^K é necessária para gerar células Ts específicas para o antígeno LDH-B, as quais suprimem a proliferação de células Th em camundongo não-respondedor B10-A (2R). Ao utilizarem anticorpo monoclonal contra moléculas E^K "in vitro" e "in vivo" eles descobriram que a não-resposta poderia ser desta forma convertida, confirmando assim a restrição MHC na indução de células T_S . Estes resultados, como aqueles de DEBRÉ et al., 1975; TANIGUSHI et al., 1976; WALTENBANG et al., 1976 e MIZUNO et al., 1988, permitiram postular a existência de gene de imunossupressão (I_S) que codifica(m) moléculas de classe II, que atuam como moléculas de restrição na indução de células T_S pela APC e, também regula(m) a resposta imune. Assim como a resposta controlada pelo gene I_R é dominante sobre a não-resposta, a supressão é dominante sobre a não-supressão.

Outros genes associados à tolerância, porém não ligados ao MHC, têm sido descritos. Um destes genes, denominado Tol-1 controla a resistência e a susceptibilidade a tolerância ao antígeno gama-globulina bovina (BGG). Sugere-se que ele afete a função de macrófagos (LUKIC et al., 1975b).

As primeiras observações demonstrando a interação entre o efeito de genes associados ao MHC com aqueles não-associados foram descritas por RICH et al. (1977) e RANGES & AZAR (1979). O primeiro autor postula a existência de genes não-H-2 controlando a expressão ou função de moléculas supressoras da resposta proliferativa da reação mista de leucócitos (MLR), cuja estrutura é codificada pela sub-região I-C do H-2. A linhagem de camundongos C57 BL/6J, assim como a linhagem congênica B6.C-H-2^d, falham em produzir o fator supressor ativo, implicando assim na existência de um ou mais genes não-H-2, compartilhados pelas duas linhagens. No entanto, ambas são capazes de responder aos fatores supressores ativos derivados de linhagens com as quais compartilham os genes H-2. Desta forma, a ação dos genes não-H-2 não afeta a expressão do receptor para as moléculas supressoras. Nos animais híbridos F1 da linhagem B6 com as linhagens BALB/c e CBA (estas carregam genes relevantes não-H-2 funcionais), os quais expressam de forma codominante as moléculas supressoras específicas de cada linhagem parental, as moléculas supressoras B6 são funcionais. Tudo se passa como se os genes não-H-2 do parental Balb/c ou CBA atuem preenchendo a função requerida para a expressão das moléculas supressoras B6. O segundo autor descreve genes H-2 e não H-2 controlando a

tolerância a gama-globulina humana (HGG) comparando um painel de linhagens congênicas, F1 entre sensíveis e resistentes e seus retrocruzados. Seus resultados sugerem três mecanismos genéticos: um onde genes H-2 admitem que genes não-H-2 confirmam resistência ou susceptibilidade a tolerância; outro onde um mecanismo controlado por genes ligados ao H-2 é mediado por células T-supressoras (T_S); e um terceiro controlado por genes não-H-2, que os autores sugerem estarem associados ao processamento de antígenos, como acontece com o gene Tol-1 que é aparentemente expresso em macrófagos, conferindo resistência ao camundongo Balb/c, ou na resistência à tolerância em SJL que parece envolver macrófagos eficientes.

O controle genético da susceptibilidade a tolerância oral foi estudado por VAZ et al. (1987) em camundongos isogênicos adultos que ingeriram ovalbumina (OVA) previamente ao tratamento intraperitoneal com OVA em adjuvante. Camundongos bons respondedores quando imunizados com altas ou baixas doses de antígeno em adjuvante, tinham suas respostas significativamente suprimidas por ingestão prévia de doses acima de 5 mg do antígeno correspondente. Utilizando um painel de linhagens isogênicas de camundongos, os autores sugerem que as diferenças entre as linhagens sejam controladas por genes ligados ao H-2 juntamente com genes não-H-2. O interessante é que os animais apresentaram uma flutuação de 1% (SJL e A/J) até 46% (B10.A) da resposta humoral encontrada nos grupos controles que não ingeriram OVA.

Camundongos das linhagens de boa e má resposta (H e L) seleccionados para a resposta imune geral quantitativa a

antígenos de *Salmonella* (seleção III e IVa) foram tratados com OVA por via digestiva e posteriormente imunizados com BGG em adjuvante. Aqueles das linhagens má-respondedoras (L_{III} e L_{IVa}) foram facilmente tolerados. Animais bons respondedores da linhagem H_{III} não tiveram sua resposta suprimida pelo tratamento intragástrico; já aqueles da linhagem H_{IVa} tiveram sua resposta anticorpo aumentada por este tratamento (RIOS et al., 1988). Sugere-se neste caso que: ou eles são incapazes de desenvolver os mecanismos de tolerância ou, estes mecanismos são estimulados, sendo porém incapazes de ultrapassar a expressão dos genes selecionados para a elevada resposta imune geral.

A tolerância imunológica é um caráter que se expressa de forma quantitativa quando medida a nível de produção de anticorpos. A observação do painel de linhagens isogênicas tratadas de forma tolerogênica por VAZ et al. (1987), permite observar que além da variância intra-linhagem que decorre de influência ambiental, ocorre uma variância inter-linhagem bastante alta, o que sugere diferenças genéticas importantes.

O estudo de um número maior de linhagens isogênicas, poderá mostrar que a variação do caráter é contínua e provavelmente distribuída normalmente.

Da mesma forma como a obtenção de linhagens boas e más-respondedoras permitiram o estudo da regulação genética geral da resposta imune quantitativa, acreditamos que, tendo em vista as observações da existência de vários genes controlando a tolerância e, as diferenças observadas entre

linhagens isogênicas, a tolerância medida pela supressão da síntese de anticorpos é uma característica quantitativa que deve ser estudada utilizando-se os métodos da genética de populações.

A tolerância induzida por via digestiva com antígenos naturais complexos solúveis ou particulados, é determinada por vários mecanismos específicos e não-específicos associados ao sistema imune e grandemente influenciada por fatores associados à fisiologia e penetração das proteínas na circulação variando desde pequenos peptídeos até estruturas com peso molecular idêntico as da proteína íntegra ingerida.

Pequenas quantidades de proteínas administradas oralmente escapam à digestão enzimática no intestino e são absorvidas como moléculas antígenicamente intactas. Estas moléculas entram em contato com as células linfóides associadas ao intestino e, cerca de 0,01% a 0,1% são encontradas na circulação como antígenos potenciais. Como consequência, uma resposta pode se desenvolver no intestino ou sistemicamente, ou ainda ocorrer a supressão da resposta imune em tecidos linfóides afastados do intestino, tais como baço e linfonodos periféricos (WALZER, 1927; CLARK, 1959; CRABBE & HEREMANS, 1966; STRANNEGARD & YURCHISION, 1969).

Várias observações foram publicadas demonstrando que a administração oral prévia de um dado imunógeno é capaz de tornar os animais, refratários à imunização com o antígeno em questão. Alguns dos antígenos utilizados foram: extratos de pólen, albumina de ovo de galinha (OVA), eritrócitos e gama-

globulinas heterólogas (DAVID, 1975; VAZ et al., 1977; NGAN & KIND, 1978; RICHMAN et al., 1978; MATTINGLY & WAKSMAN, 1978; VIVES et al., 1980).

É demonstrado que este estado de tolerância se deve ao surgimento de células T supressoras (T_S) que inibem ativamente a resposta imune, podendo inclusive transferir a tolerância adotivamente para animais não tratados previamente (NGAN & KIND, 1978; RICHMAN et al., 1978).

O controle mediado por células T supressoras parece ser o mecanismo mais comum no caso da tolerância induzida por proteínas solúveis como OVA e HGG, por haptenos como trinitroclorobenzeno ou por aloantígenos como proteína básica de mielina (RICHMAN et al., 1978; CHAOUAT, 1978; HANSON et al., 1979; VIVES et al., 1980; LIDER et al., 1989; GAUTAM et al., 1990).

Células T supressoras específicas inibem a resposta humoral e celular, incluindo inibição da hipersensibilidade no intestino. Estas células capazes de transferir a tolerância adotivamente, têm sido encontradas nos linfonodos mesentéricos, placas de Peyer e baço de animais que ingeriram antígeno (THOMAS & PARROT, 1974; PARKS et al., 1978; CHALLACOMBI & TOMASI, 1980; VIVES et al., 1980; MOWAT & FERGUSON, 1982; MOWAT, 1986).

As células T supressoras são aqui definidas segundo TADA et al. (1989) como aquelas especializadas em suprimir a resposta imune, não estando incluídas aí a supressão por atividade citotóxica e nem através da produção de linfocinas

como IL-4, conhecidas por sua atividade auxiliar da supressão (ASANO et al., 1988; POWELL & STREILEIN, 1990).

Apesar da atividade das células T supressoras ser bem documentada, sabe-se que em algumas situações estas células parecem apenas temporariamente associadas com o estado tolerante, isto é, a tolerância pode ser mantida na sua ausência. Isto tem sido observado para antígenos como HGG e SRBC. Nestas situações é sugerido que mecanismos intrínsecos como deleção ou aborto clonal de células B, deleção funcional da atividade T auxiliar (Th) ou regulação idiotípica seriam responsáveis por esta dissociação entre tolerância e atividade Ts (DOYLE et al., 1976; BENJAMIN, 1977a e 1977b; PARKS et al., 1978; GREEN et al., 1981).

Células T supressoras inibem a atividade das células Th que auxiliam células B (BENJAMIN, 1975), a atividade de células Th que induzem células supressoras (GREEN et al., 1981; MacDONALD, 1982), e a atividade de células B diretamente (FELDMAN, 1974) através de fatores solúveis.

Supressão da atividade de células B ou Th por células T supressoras são descritas em vários modelos experimentais. Doses sub-imunogênicas de antígenos como HGG, BSA e fago fd, induzem células Ts específicas que atuam sobre células Th que auxiliam células B (BENJAMIN, 1977a; KOLSCH et al., 1975; HEUER et al., 1982; DEGWERT et al., 1987). Injeção de número exponencialmente aumentado de células tumorais imunogênicas leva a ativação de células Ts, que atuam aparentemente inativando células Th que auxiliam células T citotóxicas (HAUBECK & KOLSCH, 1982; HAUBECK et al., 1988). Um

outro exemplo vem da resposta a antígenos timo-independentes. Camundongos Balb/c convencionais respondem a $\alpha(1 \rightarrow 3)$ dextran com a produção de IgM. Camundongos Balb/c nu/nu e livres de germes por outro lado, mostram vigorosa resposta IgG. Esta capacidade reduzida de camundongos Balb/c convencionais de produzir o isótipo IgG para o antígeno Dextran, é devida a células Ts (SCHULER et al., 1982) induzidas por contato neonatal com antígenos bacterianos.

Estas células Ts são idiótipo específicas (STAB et al., 1990) e asseguram uma imunidade antibacteriana efetiva, ao evitarem a produção de IgG, que é potencialmente danosa na autoimunidade. Estas células, além de regularem a expressão isotípica de anticorpos anti-dextran, estimulam células B que permanecem em repouso no hospedeiro original, mas podem ser expandidas e ativadas por transferência adotiva.

Supressão de IgG por doses baixas de fago fd (tolerância a baixa-dose) sem influência na produção de IgM foi descrita por WEBER & KOLSCH (1972), que sugeriram que tolerância a baixa dose de antígeno afeta o "switch" de IgM para IgG.

A ingestão de trinitroclorobenzeno (TNCB) por camundongos C3H/Hen, induz células Ts Lyt2^+ que regulam o desenvolvimento de sensibilidade de contacto sistêmica. No entanto, a inibição de geração de células T citotóxicas em camundongos tolerados oralmente, é resultante da inativação funcional de células Th (citado em GAUTAN, 1990). Estas descobertas sugerem uma dicotomia no controle das duas

respostas mediadas por células para o mesmo hapteno, quando a tolerância é induzida por via intragástrica.

A indução de tolerância imunológica para produção sistêmica de anticorpos e resposta mediada por células, também parecem ser controladas por mecanismos diferentes. A resposta mediada por células parece ser mais sensível a indução de tolerância do que a resposta humoral (HEPPELL & KILSHAM, 1982; ASKENASE et al., 1975). Camundongos ingerindo 2 mg de OVA suprimem preferencialmente a resposta celular, enquanto que a ingestão de 25 mg suprime ambos os tipos de resposta (MOWAT et al., 1982). A supressão das respostas celular e humoral como consequência da ingestão de OVA foi demonstrada estar relacionada a sub-populações distintas de células Ts (WHISLER & STOBO, 1976; WHISLER & STOBO, 1978).

Células T Lyt1^+ , I-J⁺ derivadas do baço de camundongos resistentes à indução de tolerância oral a SRBC (C3H/HeJ) são capazes de reverter a tolerância sistêmica de camundongos C3H/HeN por transferência adotiva. Estas células são desenvolvidas no camundongo C3H/HeJ somente após ingestão de SRBC. Estas células Lyt1^+ , diferente das células auxiliares são aderentes a lectina de Vicia villosa, e tem as características de célula T contrassupressora (GREEN & St. MARTIN, 1983; SUZUKI et al., 1986).

Outros mecanismos tem sido propostos como responsáveis pela indução e/ou manutenção da tolerância oral.

ANDRÉ et al. (1975) propõe que imunocomplexos circulantes contendo anticorpos da classe IgA são capazes de paralisar a atividade de células E.

A participação de macrófagos na tolerância oral foi proposta por MATTINGLY & WAKSMAN (1978) que observaram eliminação parcial da supressão por SRBC, após tratamento "in vitro" de células supressoras do baço com carragenina. Eles sugerem que células T supressoras específicas induzidas por rota oral podem trabalhar em conjunto com macrófagos esplênicos. Estes resultados diferem das observações de LUKIC et al. (1975a) que foram capazes de diminuir a resistência a tolerância de camundongos Balb/c a BCG ip ultracentrifugada, por tratamento com carragenina. Por outro lado, eles reduziram a susceptibilidade da linhagem DBA/2 (sensível a tolerância) por estimularem seu sistema fagocítico com BCG.

Estes resultados estão de acordo com a proposta de GOLUB & WEIGLE (1969) de que as diferenças entre as linhagens na indução de tolerância estão relacionadas à capacidade do sistema mononuclear fagocítico em "processar" o antígeno.

Células B com atividade supressora na tolerância oral foram descritas por ASHERSON et al. (1977). Ao estudarem a indução da tolerância oral a agentes causadores de sensibilidade de contacto, observaram a presença de células B supressoras predominantemente nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos de camundongos, após uma única ingestão de cloreto de picrila ou oxazolona e, no baço e linfonodos periféricos após três tratamentos orais. Sua presença mascara a atividade das células T efetoras que transferem passivamente a sensibilidade de contacto.

A participação de fatores solúveis na tolerância oral foi proposta inicialmente por KAGNOFF (1978) em

camundongos BDF₁. Eles descrevem um fator inibidor da resposta IgM em camundongos ingerindo SRBC. Pelo seu peso molecular e pela presença de imunoglobulina no fator supressor ele sugere que a supressão seja mediada por anticorpos. CHALON et al. (1979) descrevem um fator supressor em camundongos Balb/c tratados oralmente com SRBC. O fator era removível por absorção com SRBC e anti-IgG.

MATTINGLY et al. (1980) demonstraram a presença de dois fatores supressores distintos derivados de células T do baço de camundongos C57BL/6 que ingeriram SRBC. O fator I é antígeno específico e supressor da resposta primária "in vitro". Não é restrito aos genes do MHC ou genes imunoglobulina e, atua aumentando a atividade supressora de células Lyt2⁺. O fator II é também específico, mas tem efeito dual na resposta "in vitro". Este fator é capaz de estimular células formadoras de anticorpo (PFC) quando adicionado a culturas de células de baço nas primeiras 72 horas ou suprimi-la quando adicionado após 120 horas. Ele atua por ativar células Lyt1⁺. Este é o fenótipo de células Th e células T indutoras de supressão.

Embora as células Ts sejam apontadas como o principal mecanismo responsável pela indução e/ou manutenção da tolerância oral a antígenos naturais complexos, em linhagens isogênicas, vários mecanismos imunológicos podem estar atuando em conjunto neste tipo de resposta em indivíduos de populações geneticamente heterogêneas. Isto, por si, é indicativo da participação de vários genes na formação dos diferentes fenótipos em uma população.

A tolerância imunológica induzida por via digestiva tem sido demonstrada depender não apenas de mecanismos imunológicos. Uma relação íntima destes com os mecanismos associados a fisiologia digestiva também é observada.

Existe uma série de "barreiras" capazes de impedir a entrada da maior parte do material antígenoicamente intacto no organismo. Estas "barreiras" devem ter evoluído como consequência da exposição constante de parasitos, bactérias e seus produtos tóxicos, vírus e proteínas alimentares. Este contato constante de parasitas, vírus e bactérias seria prejudicial diretamente a todo o organismo. Como consequência, o que vemos são estas "barreiras" atuando em conjunção com o sistema imune com o objetivo de manter a integridade do organismo. Dentre estes mecanismos está a produção de muco pelas células caliciformes.

O muco não atua apenas como uma barreira física, já que foi detectada a presença de carboidratos similares àqueles dos componentes glicoproteicos da superfície microvilosa, provavelmente interferindo com a ligação de microrganismos e antígenos solúveis na superfície celular (SCHREIBER & WALKER, 1988). Sua produção pode ser modificada por influência imunológica além de físicas e químicas. Agentes como acetilcolina, prostaglandinas, somatostatina, histamina liberada por mastócitos sensibilizados por IgE e complexos imunes humorais com o isotipo IgA, aumentam a produção de mucina (WALKER et al., 1972; BOTTEN et al., 1978; SNYDER & WALKER, 1987; SCHREIBER & WALKER, 1988).

Além do muco, a saliva, a acidez gástrica, o peristaltismo e a proteólise (atividade de enzimas proteolíticas no intestino) podem atuar para impedir a entrada de macromoléculas intactas no organismo (WALKER, 1987; SCHREIBER & WALKER, 1988). A própria membrana epitelial microvilosa atua como uma barreira à entrada de macromoléculas íntegras ou clivadas pelo tratamento enzimático-digestivo no estômago e intestino. As células epiteliais (enterócitos) migram para o topo do villus durante cada 48 horas, podendo esta mudança afetar a ligação do antígeno ou fragmentos à membrana epitelial. Mudanças na composição da membrana celular intestinal ocorrem também com a idade (QUARONI et al., 1980; BRESSON et al., 1984).

Os antígenos capazes de se ligar a membrana das células epiteliais no lúmen, são absorvidos, isto é, são transportados por invaginação da membrana dos enterócitos (pinocitose) através de vacúolos digestivos, "processados" e depositados no espaço intraepitelial (CLARK, 1959; SCHREIBER & WALKER, 1988).

Os enterócitos envolvidos no transporte de nutrientes apresentam constitutivamente em sua membrana moléculas de classe II do MHC. Estes enterócitos são capazes de apresentar OVA e HGG especificamente a linfócitos T com fenótipo citotóxico-supressor e toxóide tetânico a células T supressoras inespecíficas (BLAND & WARREN, 1986b; MAYER & SHLIEN, 1987; BLAND, 1988).

Pouco se sabe sobre a atividade de "processamento" do antígeno por enterócitos, no entanto ele não é idêntico

àquele dos macrófagos. O "processamento" pelos enterócitos talvez dependa do tratamento anterior que a macromolécula recebeu no estômago e no lúmen intestinal (BLAND, 1988).

BRUCE & FERGUSON (1986) demonstraram que a absorção de OVA pelo intestino produz uma forma "tolerogênica" que é consequência de uma sutil alteração e, não uma mera desagregação do antígeno. Esta forma tolerogênica tem o peso molecular idêntico ao da OVA não processada e, o autor não descarta a possibilidade desta forma ser um fragmento tolerogênico, associado com antígenos Ia presentes no epitélio intestinal.

Estas observações sobre a possível participação dos enterócitos na resposta imune, suportam a hipótese de que os antígenos absorvidos de forma seletiva passariam através dos enterócitos em endossomos e, seriam reexpressos com Ia na membrana por exocitose. O complexo antígeno-molécula Ia seria reconhecido por receptores de células T intraepiteliais, que migrariam para a lâmina própria e para sítios extramucosais, impedindo a resposta imune a antígenos absorvidos (BLAND & WARREN, 1986a). Tudo isto, sugere a participação do epitélio intestinal como um elemento de restrição, controlado geneticamente, na regulação imune local e sistêmica.

Durante sua passagem através do espaço interepitelial, o antígeno absorvido pode entrar em contacto com células expressando imunoglobulinas de superfície ou citoplasmática, mastócitos, células NK, alguns polimorfonucleares, linfócitos Thy^- expressando a forma heterodimérica δ do receptor de células T (TCR-1) e linfócitos Thy^+ expressando a forma heterodimérica $\alpha\beta$ do receptor TCR-1 além do antígeno de superfície

CD8, característico de células T supressoras/citotóxicas (BIENENSTOCK & BEFUS, 1984; ERNST et al., 1985).

Na lâmina própria, situada logo abaixo do espaço intraepitelial, os antígenos passam por estruturas compostas principalmente de células B secretando principalmente IgA, mastócitos, células dendríticas Ia⁺, macrófagos, alguns poucos neutrófilos, eosinófilos e células T expressando a forma heterodimérica $\alpha\beta$ do receptor TCR-1, porém com o fenótipo CD4⁺ helper/indutor da supressão (ERNST et al., 1985; VAN DER HEIJDEN & STOK, 1987; TREJDOSIEWICZ et al., 1989; PAVLI et al., 1990).

Algumas observações sugerem que o tecido linfóide na lâmina própria é também importante na geração de respostas mediadas por linfócitos T para antígenos atravessando a mucosa (ENDERS et al., 1986; PAVLI et al., 1990).

A maior importância entretanto no estudo da imunidade e tolerância a antígenos cruzando a barreira intestinal tem sido dada as placas de Peyer. Uma das razões é que o epitélio cobrindo as placas de Peyer, contem células especializadas, chamadas células M ("microfold cell"), capazes de ingerir antígeno solúvel e particulado bidirecionalmente, para dentro e para fora do lúmen e, colocá-los em contacto direto com o tecido linfóide das placas de Peyer (OWEN, 1977; BIENENSTOCK & BEFUS, 1984). A outra razão, é que grande parte dos laboratórios que trabalham com o sistema imune associado às mucosas, utiliza antígeno particulado (SRBC). Esta parece ser a via preferencial de utilização de antígenos particulados no

intestino, enquanto que a absorção através dos enterócitos parece ser a mais comum para antígenos solúveis.

Inseridos entre as células M, encontram-se macrófagos capazes de fagocitar antígenos luminiais como Salmonella. As outras células encontradas são células B e linfócitos T com fenótipos $CD4^+$ e $CD8^+$ quase que na mesma proporção. Células Ts $CD8^+$ podem ser induzidas nas placas de Peyer e são associadas a tolerância oral.

O quadro possível de ser montado com estas informações é de que o sistema imune atua intimamente associado ao sistema digestivo (e às mucosas), no sentido de impedir a penetração de material antígenicamente intacto na circulação, seja de origem alimentar ou microbiana. A reação do sistema imune à penetração destas estruturas, seria a de impedir reações danosas de hipersensibilidade a nível do intestino e, de auto-imunidade como consequência da formação constante de imunocomplexos.

O fenômeno de tolerância oral teria desta forma, importância na modificação do valor adaptativo de um indivíduo.

Uma seleção direcional para modificar a frequência de genes do sistema imune associados à tolerância oral, poderá também modificar a frequência de genes não-associados ao sistema imune, mas que têm importância para a característica, já que o ajustamento simultâneo destes caracteres pode ser necessário para adaptação dos indivíduos selecionados.

A complexidade do fenômeno de tolerância descrito acima, onde diferentes mecanismos são propostos como responsáveis por sua indução, nos compele a propor a existência de

grupos poligênicos distintos controlando este tipo de resposta imune.

O estudo genético de características quantitativas é feito por seleção bidirecional. A vantagem deste tipo de experiência, é que ela permite o acúmulo de genes localizados em vários loci independentes, que interagem e determinam o fenótipo geral para o traço sob seleção. Traçamos então como objetivos:

- 1 - Demonstrar a distribuição contínua dos fenótipos de tolerância expressos por indivíduos em uma população heterogênea.
- 2 - Demonstrar a exequibilidade da seleção para o estudo genético e para obtenção de linhagens divergentes em sua resposta ao tratamento prévio por via intragástrica.
- 3 - Determinar a herdabilidade do caráter.

Materiais e Métodos

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Animais

Utilizamos uma população heterogênea obtida através do cruzamento balanceado de 8 (oito) linhagens isogênicas: A/J, DBA/2J, P/J, SWR, CBA, BALB/c, SJL e C57Bl/6J, de acordo com o seguinte esquema:

PARENTAIS:	A x DBA	P x SWE	SJL x CBA	BALB/c x C57Bl/6		
F1: híbridos	A	x	B	C	x	D
F2: segregantes		E (15 famílias)	x	F	(15 famílias)	
F3: segregantes			G (30 famílias)			
F4: segregantes			H			

Os animais nos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Guido Biozzi do Instituto Curie de Paris, na geração F₂.

A geração F₂ foi obtida da formação de vários casais de animais da F₁ (A x B, B x A e C x D, D x C). Dos segregantes F₂, foram escolhidos animais ao acaso para formação de novos casais (machos de 15 famílias E x fêmeas de 15 famílias F e vice-versa) que produziram a geração F₃. Desta população F₃, obtivemos uma população heterogênea F₄, proveniente de cruzamentos entre animais não-irmãos de 30 diferentes famílias da F₃. Estes animais da geração F₄ correspondem a geração Fo de onde se iniciou a seleção.

2 - Antígenos

Ovoalbumina de galinha (OVA) cinco vezes cristalizada (SERVA, FEINBIOCHEMICA - Heidelberg, New York) e soro albumina bovina (BSA) (SIGMA, CHEMICAL Co. - St.Louis, MO) foram utilizados em gerações alternadas para evitar a interferência de anticorpos transmitidos maternalmente.

3 - Adjuvante

O gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ foi preparado como descrito por VAZ & LEVINE (1971) a saber: a cada 1mg de alúmen de amônia $[\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ dissolvido em 12 ml de água destilada, foi adicionado 50 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N gota a gota. A mistura foi deixada precipitar por 30 min, a temperatura ambiente. Após este tempo, o precipitado foi lavado 4 vezes com água destilada, ressuspenso em um volume final de 20 ml. Após avaliações do peso seco foi conservada a 4 °C para uso.

4 - Imunização Intragástrica (IG)

Os camundongos foram tratados por via intragástrica com antígeno solúvel proteico, de acordo com o protocolo de VAZ et al. (1977). Sob leve anestesia, a ponta de uma sonda de aspiração traqueal para crianças recém-nascidas (nº 3131, Bard-Parker, Rutherford, NJ) foi introduzida no estômago, e

0,2 ml de solução isotônica contendo 5 mg de proteína (OVA ou BSA) foi injetada por meio de uma seringa acoplada à outra extremidade. Os grupos controles receberam 0,2 ml da solução isotônica sem proteína, através do mesmo tratamento.

Este procedimento se realiza em menos de 15 segundos e é atraumático.

Os animais foram mantidos com alimentação normal "ad libitum" imediatamente antes e após intubação.

5 - Imunização Intraperitoneal (IP)

Os camundongos tratados intragastricamente com proteína, assim como aqueles tratados com salina, foram imunizados, sete dias após, com uma única dose de 0,2 ml de uma solução contendo 100 µg de proteína adsorvidos em 1 mg de $Al(OH)_3$.

Quatorze e vinte e oito dias após a imunização, foram coletadas amostras de sangue através de punção retroorbital, e os soros individuais estocados à -20°C para posterior dosagem dos anticorpos.

6 - Conjugação de proteína à hemácias de carneiro (SRBC)

Os conjugados para detecção de anticorpos foram preparados como descrito por AVRAMEAS (1969). 0,4 ml de papa de hemácias (SRBC) previamente lavadas em salina, foi

ressuspensa em 10 ml de tampão fosfato 0,15 M e pH 7,2, contendo 20 mg de proteína (OVA ou BSA). Um mililitro de solução de glutaraldeído (glutardialdehyde sol. for electron microscopy, 25%, E.Merck, Darmstadt) preparada à 2,5% em água destilada, foi gotejada lentamente sob agitação suave. A mistura foi deixada agitar por 1 h a temperatura ambiente. Após este tempo, o conjugado SRBC-PROTEÍNA foi lavado 3 vezes com PBS por 1000 rpm durante 7 minutos, diluído para um volume final de 80 ml e estocado à 4°C para uso 2 a 3 dias após. Os conjugados foram sempre testados previamente às dosagens com soro padrão para comparação entre as várias preparações.

7 - Determinação do título máximo aglutinante

Os títulos individuais de aglutininas foram determinados por hemaglutinação passiva com o conjugado SRBC--proteína preparado conforme descrito acima.

Os soros foram diluídos em série em placas de microtitulação, e as reações desencadeadas pela adição de igual volume da suspensão do conjugado na concentração de 10^8 eritrócitos por ml. Como diluente foi empregado PBS contendo 0,1% de gelatina.

As placas eram deixadas duas horas à temperatura ambiente, após as quais era feita a leitura e, a seguir, deixadas a 4°C para confirmação da leitura na manhã seguinte.

O título foi considerado como recíproca em $\log_2$ da maior diluição apresentando reação positiva. Foram

determinados os títulos de soros de 14º e 28º dias, sendo que o mais alto título individual era considerado como o título máximo aglutinante.

8 - Determinação do título de anticorpos anafiláticos

Para detecção e titulação do anticorpo IgE, utilizamos o teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA) em ratos, tal como descrito por MOTA & WONG (1969). Os animais receptores foram levemente anestesiados com éter e raspados no dorso com um depilador elétrico, pelo menos 24 horas antes do teste.

Ratos foram injetados intradermicamente com 0,1 ml de diluições do antisoro a ser testado, de cada lado da linha média do dorso, usando-se seringas tuberculínicas de 1 ml.

Para leitura da atividade IgE, os ratos foram injetados intravenosamente, 24 horas após a sensibilização, com 1 mg da proteína utilizada na tolerização/imunização, diluída em 1 ml de azul de Evans à 0,5% (Evans Blue for Microscopy; E.Merck; Darmstadt).

Vinte a trinta minutos após o desencadeamento, os animais eram mortos, a pele invertida, e a magnitude da reação de PCA avaliada usando-se uma escala arbitrária de intensidade e diâmetros variando de 0 a 4 (VAZ & OVARY, 1968).

Os títulos de PCA foram determinados como a recíproca em $\log_2$ da mais alta diluição dando reações limiares.

9 - Critérios utilizados para seleção

A experiência de seleção foi iniciada a partir de uma população geneticamente heterogênea (F_0) tratada com OVA por via intragástrica e posteriormente imunizada com o mesmo antígeno por via intraperitoneal.

Uma segunda população heterogênea tendo a mesma origem da população acima (neste caso utilizamos as segundas ninhadas dos mesmos casais que originaram a população F_0) foi utilizada como controle, sendo tratada com salina por via intragástrica e posteriormente imunizada com o antígeno correspondente por via intraperitoneal. Esta população serve como indicadora da imunocompetência dos animais selecionados na população tratada com proteína por via intragástrica. Desta forma só eram selecionados aqueles animais com fenótipos extremos na população experimental, cuja família fosse comprovadamente respondedora, segundo as observações da população controle.

Cada animal era caracterizado de acordo com o seu título máximo aglutinante.

Para obtenção da linhagem sensível a tolerância (ST) foram escolhidos os animais com os menores títulos. No caso de dois animais com o mesmo título, era escolhido aquele com a menor diferença entre os títulos aglutinantes observadas nos soros de 14º e 28º dias (aproximadamente $2 \log_2$).

Para obtenção da linhagem resistente a tolerância (RT) foram escolhidos os animais com os maiores títulos. No caso de dois animais com o mesmo título, era escolhido aquele

com a maior diferença entre os títulos aglutinantes dos soros de 140 e 280 dias (acima de $2 \log_2$).

Os acasalamentos dos animais selecionados para constituírem as respectivas linhagens eram feitos evitando-se consangüinidade.

10 - Análise Genética

Os métodos para análise dos resultados da seleção são aqueles descritos por BIOZZI et al. (1979b).

A média e a variância de cada população são medidas dos títulos máximos individuais de anticorpos aglutinantes em $\log_2$, nos soros obtidos nos 140 e 280 dias após imunização intraperitoneal.

A resposta à seleção (R) é medida pela diferença entre médias dos títulos aglutinantes a cada geração consecutiva e pode considerar uma ou ambas as linhagens.

A resposta à seleção é também uma medida da divergência interlinhagens (XRT - XST) das gerações correspondentes. A resposta à seleção medida desta forma permite a eliminação dos efeitos ambientais afetando as linhagens na mesma direção (FALCONER, 1981).

A resposta à seleção resulta da pressão seletiva aplicada pela escolha dos parentais. Esta pressão é tanto maior quanto mais extremos são os valores dos parentais selecionados em relação à média da geração a qual eles pertencem. Esta diferença entre a média dos parentais

selecionados e a média de sua geração é a medida do diferencial de seleção (S).

Devido ao diferente número de filhos, cada par selecionado influencia diferentemente a composição da geração seguinte e, por esta razão, no cálculo de S, o valor médio ponderado do título aglutinante (Tp) de cada casal, considera o número de filhos participantes desta geração pela fórmula:

$$T_p = \frac{(X_p \times NF)}{NT}$$

onde: X_p é a média dos títulos do casal;

NF é o seu número de filhotes e;

NT o número total de animais produzido por todos os pares selecionados.

Os valores de R e S foram acumulados em gerações sucessivas para cálculo do valor da herdabilidade realizada (h^2) durante a seleção dentro de cada linhagem. O valor h^2 , definido pela razão R/S, representa a proporção do valor fenotípico parental que é herdado pela prole, e é expresso como um valor médio realizado durante as gerações de acasalamento seletivo. Ele pode ser medido para cada linhagem independentemente, calculando-se a relação R/S à cada geração ou pode ser medido da divergência de resposta entre as linhagens pela regressão linear de R/S acumulados.

Resultados

3 - RESULTADOS

1 - Imunização intraperitoneal com diferentes doses de OVA

Réplicas da F_0 constituídas de 12 camundongos por grupo foram imunizados intraperitonealmente com diferentes doses de ovalbumina (1, 10, 100 e 1000 μg) em gel de hidróxido de alumínio. A Figura 1 mostra a média em $\log_2$ dos títulos máximos aglutinantes obtidos aos 140 ou 280 dias. Os títulos médios correspondentes a cada dose são $2,9 \pm 1,2$; $7,8 \pm 2,1$; $9,6 \pm 1,9$ e $9,7 \pm 1,2$, respectivamente. A dose de 100 μg por animal foi escolhida como a melhor dose imunizante.

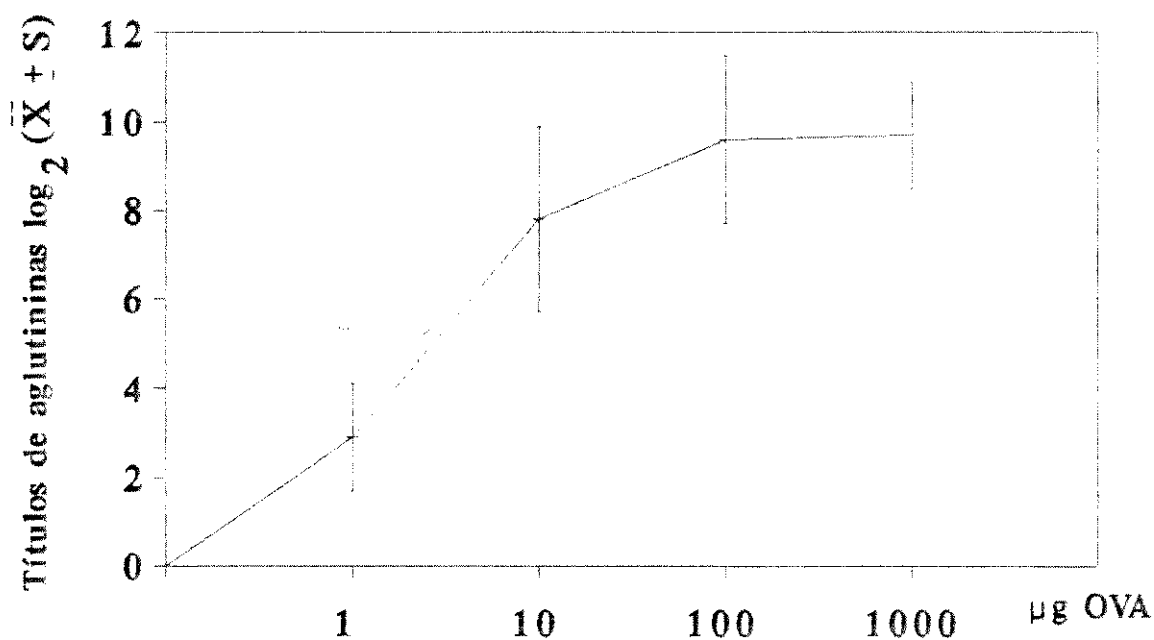


Figura 1 - Resposta à imunização por via intraperitoneal com diferentes doses de OVA.

Média $\pm$ desvio padrão dos títulos máximos aglutinantes de 12 indivíduos por grupo, imunizados com OVA em $\text{Al}(\text{OH})_3$

2 - Imunização intragástrica com diferentes doses de OVA

Grupos de 10 camundongos foram tratados por via intragástrica respectivamente com: salina, 2 mg, 5 mg, 10 mg e 20 mg de OVA por animal 7 dias antes da imunização ip. com OVA em Al(OH)₃. No soro normal, obtido um dia antes do primeiro contato com antígeno, não foram detectados anticorpos anti-OVA.

As médias dos títulos máximos aglutinantes de cada grupo foram: 11,9 ± 4,1; 11,95 ± 2,5; 9,1 ± 3,1; 11,4 ± 4,3 e 9,97 ± 3,7, respectivamente (Tabela I). As diferenças observadas nas médias dos grupos pré-tratados com 5 e 20 mg, quando comparadas com aquela do grupo controle, não se mostram estatisticamente significante, pelo teste de Mann-Whitney com aproximação feita pela curva normal, com p=0,07 e 0,30 respectivamente (Siegel, 1975).

Tabela I - Resposta à imunização por via ip de animais previamente tratados com diferentes doses de OVA.

Número de Animais (n)	T R A T A M E N T O I N T R A G Á S T R I C O				
	Salina (controle)	2mg OVA	5mg OVA	10mg OVA	20mg OVA
1	13	14	09	09	10
2	10	14	07	11	13
3	10	09	11	10	02
4	03	11	11	13	07
5	12	12	03	05	07
6	12	14	11	17	11
7	16	09	10	04	12
8	14	14	12	14	13
9	17	14	12	17	14
10	--	05	05	--	10
$\bar{X}=11.9\pm 4.1$ $\bar{X}=11.95\pm 2.5$ $\bar{X}=9.1\pm 3.1$ $\bar{X}=11.4\pm 4.3$ $\bar{X}=9.97\pm 3.7$					

Média ± erro padrão dos títulos máximos individuais por grupo, de animais de ambos os sexos. Todos os animais foram imuniza-dos com 100 µg de OVA em Al(OH)₃ por via intraperitoneal, 7 dias após o tratamento intragástrico com salina ou OVA.

3 - Análise da população F_0

Cento e cinquenta e oito camundongos de ambos os sexos constituíram a população inicial da seleção (população F_0). Os animais foram tratados com 5 mg de OVA ig. e imunizados por via ip. 7 dias após, com 100 μ g de OVA em $Al(OH)_3$.

A média dos títulos máximos aglutinantes foi de $10,12 \pm 2,16$, com uma variância de 4,66. Esta alta variância autoriza a dose de 5mg de OVA IG como adequada para o processo seletivo, já que permite um alto diferencial de seleção. O histograma da distribuição dos títulos desta população é apresentado na Figura 2 e comparado com aquele da população controle pré-tratada com salina por via IG. Os tratamentos foram simultâneos para as duas populações.

A população controle foi composta de 120 camundongos de ambos os sexos, e apresentou a média de $11,56 \pm 1,77$ com uma variância de 3,16, que é significativamente menor do que a variância da população pré-tratada por via ig ($F=1,47$; $p<0,05$). A diferença entre as médias das populações é também altamente significativa pelo teste t ($p<0,001$).

Os indivíduos com fenótipos extremos foram escolhidos da população tratada com OVA ig. para constituírem os parentais da geração I das linhagens ST e RT (Tabela II).

O estudo do perfil de populações heterogêneas ao tratamento com BSA foi feito utilizando-se 171 camundongos de ambos os sexos, pré-tratados com BSA ig. e 101 camundongos apenas imunizados por via ip. (pré-tratados com salina), também de ambos os sexos.

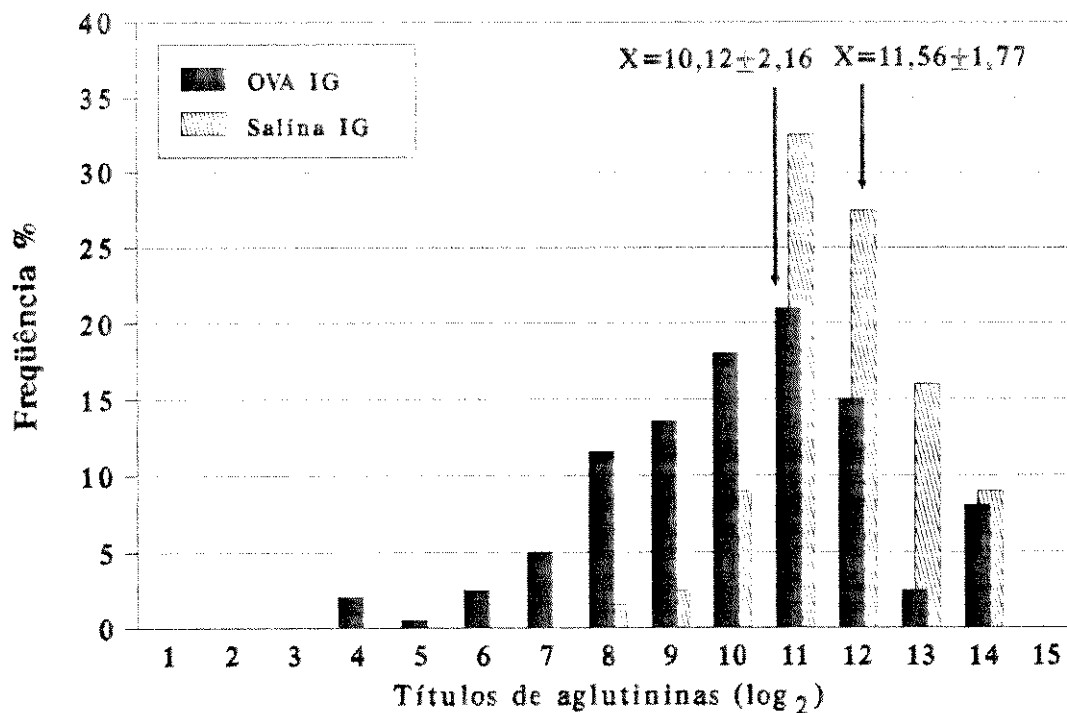


Figura 2 - Distribuição dos títulos máximos aglutinantes de camundongos pré-tratados com OVA ou salina IG:

- 158 camundongos de ambos os sexos tratados com 5 mg de OVA ig. e imunizados 7 dias após com 100 μ g OVA em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ip. ($x = 10,12 \pm 2,16$). Esta é a população F_0 da qual foram escolhidos os parentais da geração 1.

- 120 camundongos de ambos os sexos (controles) tratados com salina ig e imunizados 7 dias após com 100 μ g de OVA em $\text{Al}(\text{OH})_3$, ip. ($x = 11,56 \pm 1,77$) constituem a população controle F_0 .

A população tratada com BSA ig. apresentou a média de $9,73 \pm 2,36$ e variância de 5,6. A sua população controle apresentou a média de $10,94 \pm 2,32$ e variância de 5,41. A diferença entre as populações é altamente significativa ($p < 0,001$) pelo Teste t.

Os resultados podem ser observados graficamente na Figura 3. Observa-se que as curvas são homólogas àquelas obtidas com as populações heterogêneas tratadas com OVA.

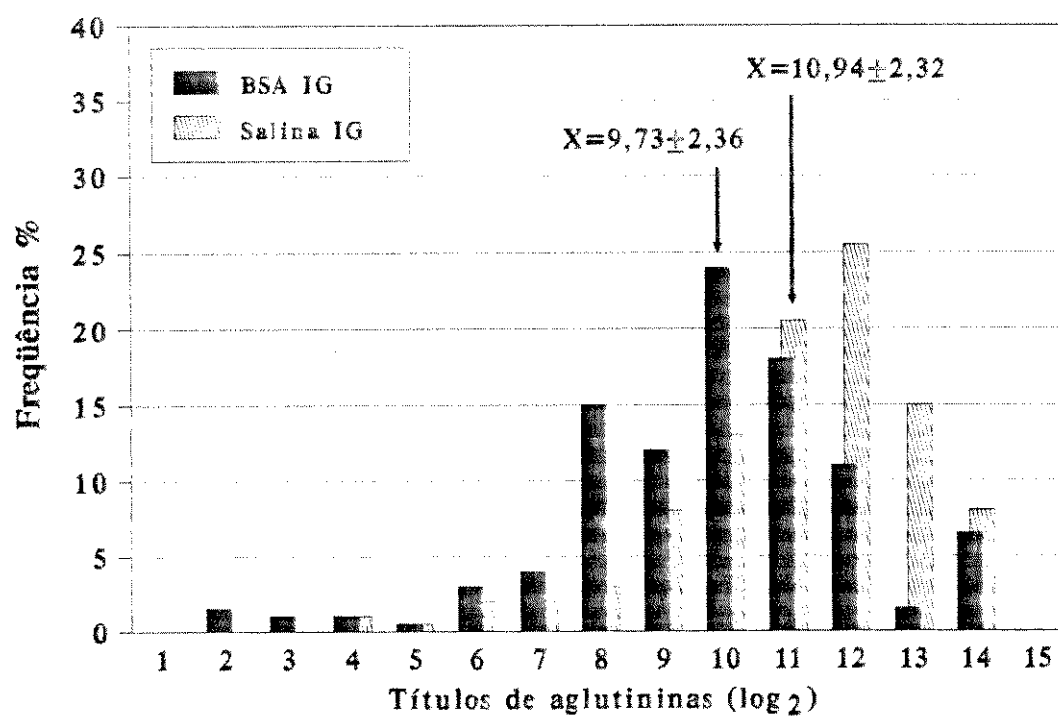


Figura 3 - Distribuição dos títulos máximos aglutinantes de camundongos pré-tratados com BSA ou salina IG:

- 171 camundongos de ambos os sexos tratados com 5 mg de BSA ig. e imunizados 7 dias após com 100 μ g BSA em $\text{Al}(\text{OH})_3$ ip. ($x = 9,73 \pm 2,36$).
- 101 camundongos de ambos os sexos tratados com salina ig e imunizados 7 dias após com 100 μ g de BSA em $\text{Al}(\text{OH})_3$, ip. ($x = 10,94 \pm 2,32$).

Tabela II - Resultados da seleção bidirecional para tolerância oral: Cálculo do diferencial de seleção acumulado (S), resposta à seleção acumulada (R) e da herdabilidade realizada (h₂) nas linhagens resistente (RT) e sensível (ST) durante 4 gerações de acasalamentos seletivos.

Linhagem	Geração	Antígeno	Títulos de Aglutininas		Número de pares selecionados	$\bar{x} \pm SD$ dos pares selecionados	Diferencial de seleção acumulado (S)	Resposta à seleção acumulada (R)	Herdabilidade h ₂	Média h ₂ $\pm$ SD
			Nº de Animais	$\bar{x} \pm SD$ (log ₂)						
ST	F ₀	OVA	158	10,12 $\pm$ 2,16	08	7,6	2,52	-	-	
	F ₁	BSA	67	9,69 $\pm$ 2,26	14	8,81	3,4	0,43	0,17	
	F ₂	OVA	86	10,85 $\pm$ 2,04	05	9,75	4,5	-0,73	-0,21	0,10 $\pm$ 0,24
	F ₃	BSA	62	8,45 $\pm$ 1,73	08	6,92	6,03	1,67	0,37	
	F ₄	OVA	81	9,55 $\pm$ 2,68	-	-	-	0,57	0,09	
RT	F ₀	OVA	158	10,12 $\pm$ 2,16	12	12,86	2,74	-	-	
	F ₁	BSA	65	10,46 $\pm$ 2,16	10	12,15	4,43	0,34	0,12	
	F ₂	OVA	64	12,54 $\pm$ 1,91	06	13,98	5,87	2,42	0,54	0,23 $\pm$ 0,26
	F ₃	BSA	92	9,67 $\pm$ 2,18	07	12,23	8,43	-0,45	-0,07	
	F ₄	OVA	91	13,03 $\pm$ 2,92	-	-	-	2,91	0,34	

Separação Interlinhagem

A Figura 4A mostra a divergência progressiva interlinhagens produzida pelo acasalamento seletivo. Diferenças significantes foram já observadas na geração F_2 ; na geração F_4 ocorreu uma dissociação ainda mais nítida entre RT e ST ($3,5 \log 2$), isto representa uma diferença maior do que 8 vezes ($p < 0,001$ pelo Teste t). Esta diferença $3,5 \log 2$ é maior do que o desvio padrão fenotípico observado na população inicial ($2,16 \log 2$). A diferença entre as duas linhagens, é uma medida geral da resposta a seleção. Em relação à variância fenotípica inicial, ela é da ordem de $3,5/2,16 = 1,6$ desvios-padrão. Podemos observar ainda, que as oscilações das médias das gerações, afetam igualmente os dois grupos (imunizados e tolerados) de ambas as linhagens. A divergência entre os grupos controle imunizados RT e ST (Figura 4B) embora menor, é significativa pelo Teste t ($p < 0,05$). Um outro aspecto interessante proveniente da análise da Figura 4A, é que as taxas de resposta são diferentes em direções opostas. As respostas são consideradas assimétricas. Isto pode ser também observado nas colunas títulos de aglutininas e diferencial de seleção da Tabela II. O progresso da linhagem RT sob seleção pode ser visto quando sua geração F_4 é comparada à geração F_0 ($p < 0,001$), enquanto que o da linhagem ST é mais lento quando a geração F_4 é comparada à F_0 (diferença F_4-F_0 não significativa).

As Figuras 5A e 5B mostram os valores da variância por geração dos grupos tolerados e imunizados das duas linhagens até a última geração estudada.

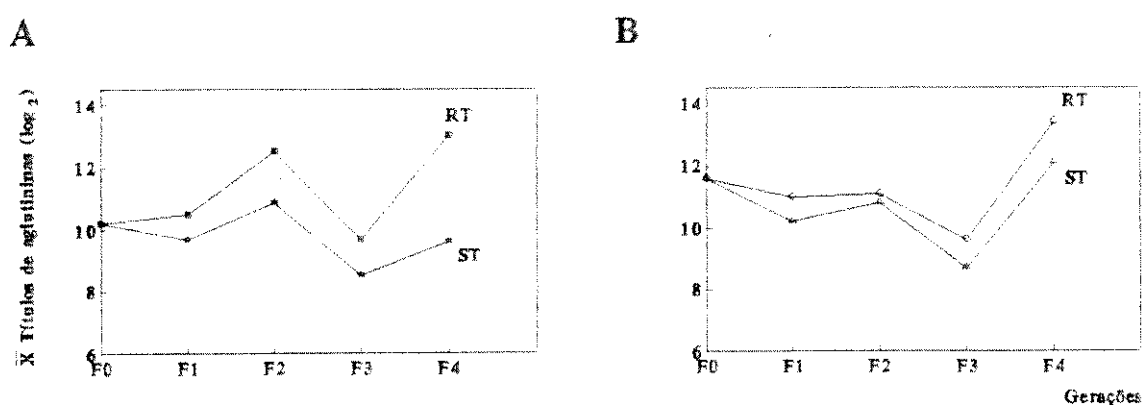


Figura 4 - Divergência progressiva interlinhagem. Médias das diferentes gerações. A - populações previamente tratadas com o antígeno por via intragástrica. B - populações controle previamente tratadas com salina por via intragástrica.

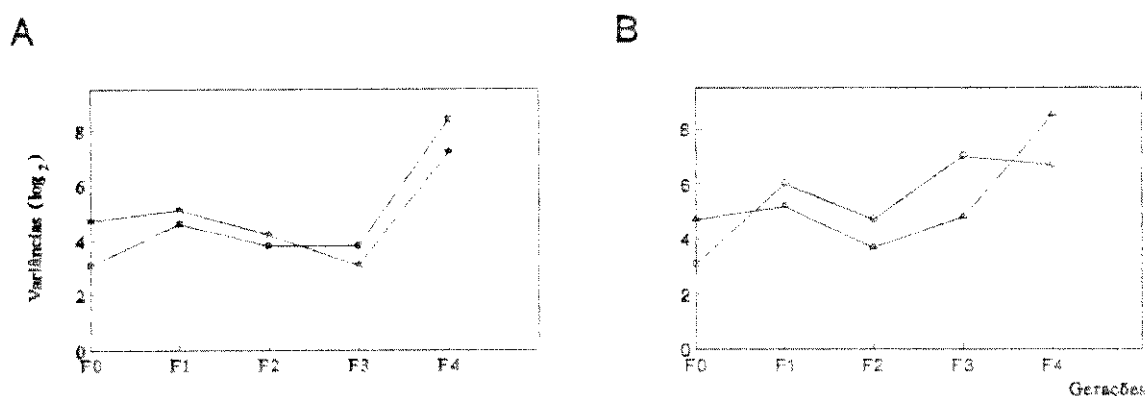


Figura 5 - Oscilação da variância dos títulos aglutinantes por geração. A - linhagem ST: comparação dos valores de variância do grupo experimental (★) com o grupo controle (■). B - linhagem RT: comparação dos valores da variância do grupo experimental (▲) com o grupo controle (●).

A Figura 6 é um histograma comparativo da distribuição da frequência dos títulos aglutinantes entre RT e ST na geração F_4 . Esta diferença como já vimos, é altamente significativa ($p < 0,001$; Teste t), apesar da superposição entre as distribuições. As Figuras 7A e 7B comparam as distribuições das frequências de ambas as linhagens com seus respectivos grupos controles. Na linhagem ST, a população tratada de forma tolerogênica apresenta média de $9,55 \pm 2,68$ com uma variância de 7,2 e, sua população controle uma média de $12,07 \pm 2,9$ com variância de 8,4 (diferença altamente significativa - $p < 0,001$; Teste t). Na linhagem RT, os valores são: para a população tratada de forma tolerogênica, a média é de $13,03 \pm 2,92$, com variância de 8,5 e, a média de $13,35 \pm 2,58$ com variância de 6,6 para sua população controle, não havendo diferença significativa (pelo Teste t) entre as duas populações.

Os resultados completos da seleção bidirecional são encontrados na Tabela II e as médias dos títulos das populações-controle. a cada geração na Tabela III.

Tabela III - Resposta das gerações à imunização intraperitoneal com os antígenos utilizados na seleção (populações-controle).

Linhagem	Geração	Antígeno	Títulos de Aglutininas	
			Nº de Animais	$\bar{X} \pm SD (\log_3)$
ST	F0	OVA	119	$11,56 \pm 1,77$
	F1	BSA	20	$10,20 \pm 2,16$
	F2	OVA	62	$10,80 \pm 1,98$
	F3	BSA	22	$8,64 \pm 1,97$
	F4	OVA	40	$12,07 \pm 2,90$
RT	F0	OVA	119	$11,56 \pm 1,77$
	F1	BSA	47	$11,08 \pm 2,44$
	F2	OVA	69	$11,14 \pm 2,17$
	F3	BSA	34	$9,59 \pm 2,64$
	F4	OVA	42	$13,35 \pm 2,58$

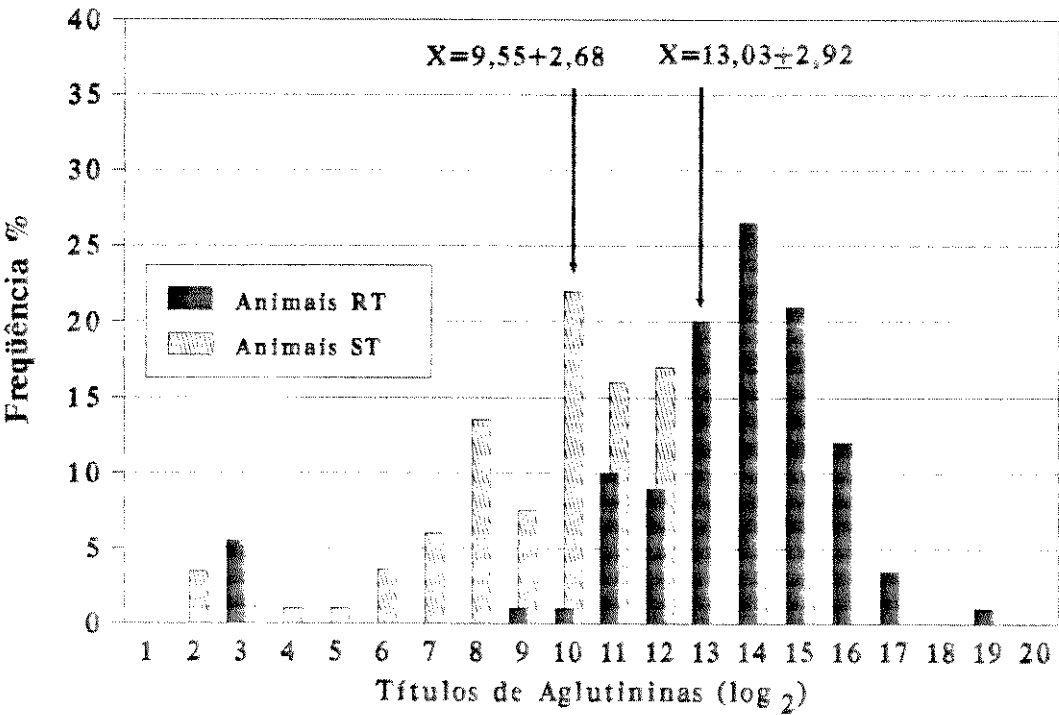
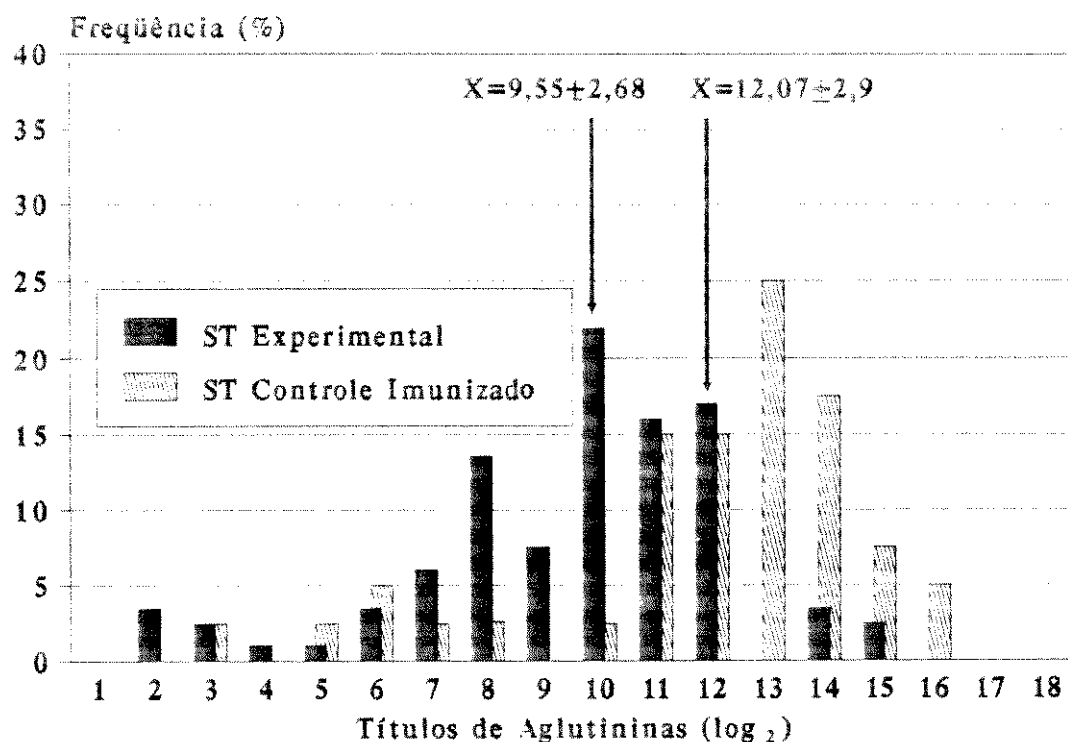


Figura 6 - Distribuição comparativa dos títulos aglutinantes anti-OVA de animais ST () e RT () da geração F₄ pré-tratados com OVA por via intragástrica (p<0,001 - Teste t).

A



B

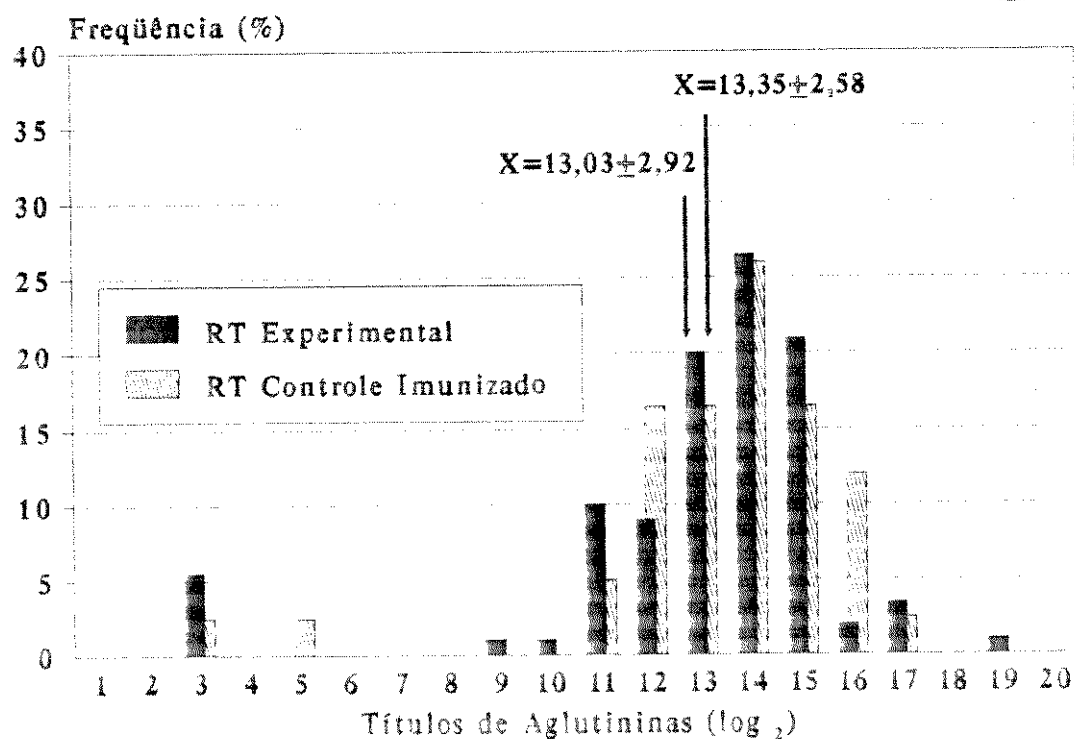


Figura 7 - Distribuição comparativa dos títulos aglutinantes anti-OVA das linhagens na geração F_4 com seus controles respectivos. A - linhagem ST tolerizada comparada com grupo controle imunizado da mesma linhagem ($p < 0,001$). B - linhagem RT tolerizada comparada com grupo controle imunizado da mesma linhagem (diferença não significativa).

Herdabilidade realizada

No cálculo da herdabilidade levamos em conta os valores de R e S obtidos e acumulados nas gerações sucessivas (Tabela II). Para isto, se torna necessário que os diferentes antígenos utilizados em gerações alternadas produzam respostas aglutininas equivalentes.

Embora ainda não possamos comparar as respostas das gerações pares com aquelas das gerações ímpares por termos estudado poucas gerações, podemos no entanto confirmar que as respostas induzidas por OVA se mostram equivalentes aquelas induzidas por BSA observando as curvas respectivas para populações heterogêneas (Figuras 2 e 3). Esta preocupação é procedente, porque flutuações muito bruscas nas médias das gerações dificultarão a medida da herdabilidade, já que a resposta à seleção é medida pela diferença entre as médias de gerações consecutivas e a herdabilidade está sendo obtida pela expressão da resposta como uma proporção do diferencial de seleção.

A resposta acumulada a seleção medida pela divergência entre as duas linhagens a cada geração, permite obter o valor médio da herdabilidade de forma mais apropriada, já que desta forma os fatores ambientais afetando igualmente as duas linhagens são eliminados. Este valor médio é apresentado na Tabela IV e é igual a $0,18 \pm 0,06$.

A taxa média de separação interlinhagem por geração, de F_0 a F_4 é de $1,80 \pm 1,2 \log 2$ por geração (parte superior direita da Figura 8). Esta resposta é resultado da pressão

seletiva medida pelo S acumulado com um valor médio de $9,5 \pm 4,0 \log 2$ por geração (parte inferior direita da Figura 8). A h^2 acumulada é medida da regressão linear de R/S acumulados nas gerações F_0 a F_4 e corresponde a 0,27 (parte esquerda da Figura 8).

Tabela IV - Cálculo da herdabilidade através da divergência entre as linhagens.

	R acumulado	S acumulado	h^2 (R/S)
F_1	0,77	5,26	0,15
F_2	1,69	7,83	0,22
F_3	1,22	10,37	0,12
F_4	3,48	14,46	0,24

$\bar{X} = 0,18 \pm 0,06$

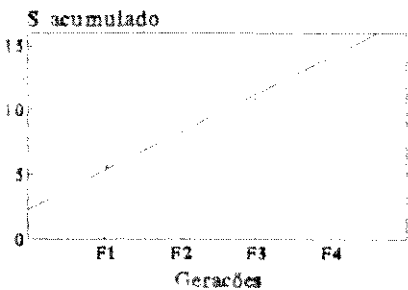
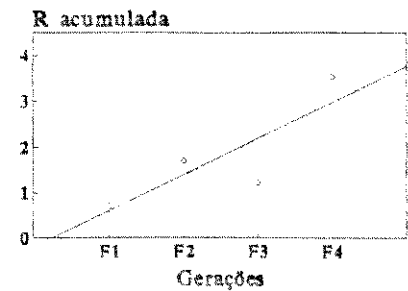
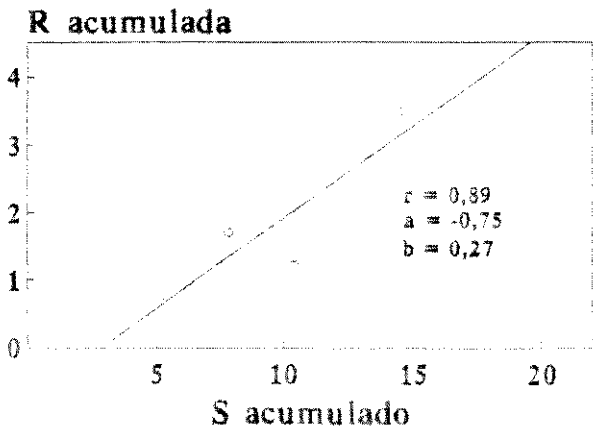


Figura 8 - Cálculo da herdabilidade acumulada (h^2) da divergência interlinhagem. Resposta a seleção (R) e diferencial de seleção acumulados durante quatro gerações de acasalamento seletivo.

Títulos de IgE

Embora apenas a resposta aglutinante seja levada em conta para a seleção bidirecional, a produção individual de IgE foi também investigada já que sua síntese é profundamente afetada por tratamento intragástrico. Na geração inicial, 63% dos animais não produziu IgE detectável por PCA, na população tratada por fia intragástrica. Na população imunizada a taxa de não respondedores foi de 43,3%. Esta alta taxa de não-respondedores é responsável pelas médias baixas de $1,7 \pm 2,45$ para a população tolerada e de $3,44 \pm 3,22$ para a população imunizada ($p < 0,001$). As variâncias são bastante altas; 6,0 e 10,36 respectivamente. Os resultados são similares para IgG₁. Nenhuma correlação foi observada entre os títulos aglutinantes e os títulos anafiláticos.

Na geração F₂, as linhagens ST e RT apresentaram resposta IgE diferentes após tratamento tolerogênico (Figura 9). Um grupo de cada linhagem foi imunizado sem prévio tratamento intragástrico. Estes grupos apresentaram resposta idêntica à população da linhagem RT tratada tolerogenicamente. A diferença entre o grupo ST tratado tolerogenicamente e os outros três grupos é altamente significativa pelo teste t de Student. A diferença entre os grupos experimentais ST e RT foi também analisada pelo teste de Mann-Whitney com aproximação feita pela curva normal, mostrando-se altamente significativa ($p < 0,0001$).

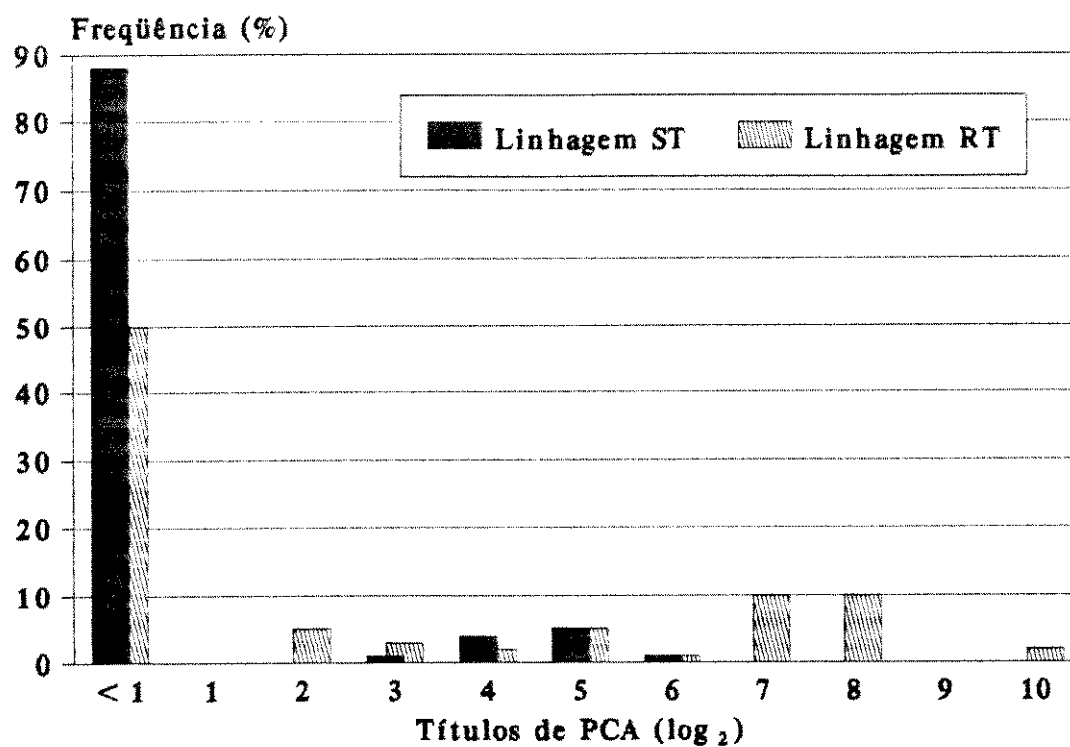


Figura 9 - Distribuição dos títulos máximos individuais de anticorpos IgE anti-OVA da geração F₂, medidos por anafilaxia cutânea passiva (PCA).

- 84 camundongos da linhagem ST; - 58 camundongos da linhagem RT.

Discussão

4 - DISCUSSÃO

As linhagens isogênicas de laboratório oferecem um modelo experimental simplificado para estudos genéticos de características complexas. Para alguns caracteres é possível encontrar linhagens com fenótipos divergentes, no entanto estas diferenças não são tão abrangentes como as que poderiam ser encontradas em populações naturais. Os caracteres estudados nestas linhagens se apresentam, por isto, como se fossem qualitativos e são descritos como sendo controlados por poucos genes. No entanto, a utilização de várias linhagens nos permite observar a distribuição de caracteres variáveis, sugerindo um controle poligênico. Um controle deste tipo não pode ser caracterizado simplesmente pelo estudo de populações híbridas F_1 ou F_2 entre linhagens isogênicas.

Este estudo é possível através de seleção genética bidirecional, para fenótipos extremos, a partir de uma população heterogênea e, como ocorreu, por exemplo, com o estudo da fase produtiva da síntese de anticorpos através da obtenção de linhagens boas e más respondedoras a antígenos naturais complexos por BIOZZI et al. (1979).

Os fenótipos extremos obtidos através de seleção artificial são raros em populações naturais; no entanto, o cruzamento entre eles permite recuperar a variabilidade observada na população inicial. Por outro lado, as linhagens isogênicas em sua maioria foram originadas de progenitores com os fenótipos intermediários, que são os mais freqüentes

(Mouton et al., 1985), não permitindo assim o estudo da variabilidade geral do caráter.

A seleção artificial tem sido utilizada no estudo da dinâmica evolutiva de fenótipos complexos, explorando a teoria genética da seleção (MacARTHUR, 1949; FALCONER, 1955; LATTER & ROBERTSON, 1962; DESJARDINS et al., 1986) e, para produzir uma grande divergência em um traço particular, com o fim de se estudar a genética fisiológica deste traço (MALIK, 1984; SITEPU et al., 1986; PANOCCA et al., 1986). O modelo utilizado leva em conta que o traço é normalmente distribuído como consequência da manifestação de muitos loci com efeito aditivo (componente herdável da variação) e, do efeito aditivo ambiental, e que a resposta a seleção é dependente de variação genética pré-existente na população inicial, cujo tamanho é considerado infinito.

Para o estudo do controle genético da tolerância oral, iniciamos um processo seletivo bidirecional. Isto visando o acúmulo gradual de genes relevantes para resistência e susceptibilidade a tolerância oral a antígenos naturais complexos.

A população heterogênea inicial (geração F_0), foi obtida pelo acasalamento equilibrado de oito linhagens isogênicas de origem diversa. A utilização de linhagens isogênicas, apresentando características definidas, como fonte para a obtenção da população inicial, garante a reprodutibilidade deste processo seletivo.

A escolha da dose intragástrica adequada aos propósitos da seleção artificial levou em conta que a

utilização de doses extremas como 2 ou 20 mg poderia mascarar a escolha daqueles indivíduos mais resistentes ou mais sensíveis, a uma e outra dose, respectivamente. Como suporte, existem observações na literatura de supressão significativa do título de anticorpos com doses de OVA intragástrica iguais ou maiores do que 5 mg (VAZ et al., 1977; MILLER & HANSON, 1979; LAMONT et al., 1989). Esta dose intermediária, teoricamente impediria a superposição de fenótipos intermediários com aqueles de valores extremos, facilitando a seleção pelo mérito individual.

A determinação da capacidade tolerogênica em linhagens isogênicas, é possível pela comparação do grupo experimental com um grupo controle imunizado da mesma linhagem. No nosso caso, os dois valores não podem ser obtidos em um mesmo indivíduo. SOBEY et al. (1966) interromperam uma experiência de seleção para tolerância pela dificuldade em distinguir nos indivíduos o fenótipo susceptível a tolerância do fenótipo baixo-respondedor. Isto impediu o progresso da seleção para tolerância por reduzir o diferencial de seleção. Nós resolvemos este problema usando a segunda ninhada de cada casal como controle. Estes indivíduos apenas imunizados, nos permitem avaliar a imunocompetência da geração correspondente e evitar a seleção de camundongos baixo- ou não-respondedores, permitindo assim uma taxa máxima de resposta.

Proteínas solúveis heterólogas foram escolhidas como antígeno, devido não só ao número relevante de informações concernentes a participação de vários genes no controle da resposta e da tolerância imunológica, como também porque um

única dose intragástrica de proteínas como OVA é capaz de induzir tolerância efetiva e duradoura. Indução de tolerância com antígeno particulado como SRBC, requer vários tratamentos intragástricos, o que aumentaria bastante o espaço entre as gerações durante a seleção (VAZ et al., 1971; MOWAT, 1986; RIOS et al., 1988).

Duas proteínas (OVA e BSA), por não apresentarem reação cruzada, são utilizadas em gerações alternadas evitando assim a interferência de anticorpos maternalmente transmitidos.

A população experimental tratada com OVA ou BSA apresentou uma curva normal, com ligeiro deslocamento quando comparada com a população controle (Figuras 2 e 3), o que confirma a eficácia do tratamento intragástrico para o processo seletivo. Este tipo de distribuição sugere um controle genético quantitativo para a tolerância, como já descrito para a síntese quantitativa de anticorpo (BIOZZI, 1979a).

A resposta de uma população heterogênea pré-tratada com BSA, similar àquela da população pré-tratada com OVA, permite que BSA seja utilizado em gerações alternadas. Uma diferença muito grande no padrão de resposta dos dois antígenos poderia dificultar o cálculo da herdabilidade.

Para evitarmos a perda de animais portadores de genes importantes para o traço sob seleção, tivemos o cuidado de selecionar inicialmente como parentais, também indivíduos das porções intermediárias da distribuição na faixa de um desvio padrão além da média. A razão disto é que a seleção de camundongos apresentando fenótipos extremos como consequência

da ação de um ou poucos genes de "grande efeito", produziria uma grande mudança na frequência gênica, equivalente a muitas gerações de seleção de genes de "pequeno efeito".

A divergência entre ST e RT vem ocorrendo de forma lenta como esperado e, como observado nas seleções para boa e má resposta à antígenos naturais complexos. Este progresso lento observado, é típico em seleções direcionais para traços quantitativos. A resposta acumulada de $3 \log 2$ na geração F_4 , assim como a diferença da resposta IgE já na geração F_2 , medidas pela diferença entre ST e RT demonstra que o acasalamento seletivo bidirecional é útil para o estudo genético da tolerância oral (SILVA et al., 1990; VAZ et al., 1977; THOMAS & PARROT, 1974).

As oscilações observadas a cada geração nas médias dos títulos de anticorpos, tanto na população tolerizada como na população controle imunizada, são consequência do efeito ambiental sobre a resposta, reflexo da utilização alternada de antígenos a cada geração, já que as médias de cada linhagem oscilam sempre na mesma direção (Figuras 5A e B).

Até a geração atual não ocorreu divergência significativa entre as respostas das populações controle das duas linhagens. Ambas produzem bons títulos de anticorpos quando imunizadas. Acreditamos que será possível obter linhagem boa respondedora altamente susceptível à tolerância, assim como linhagem boa-respondedora altamente resistente ou mesmo capazes de serem sensibilizadas por via intragástrica. Temos detectado alguns indivíduos da população RT tratada intragastricamente, cujos títulos estão acima da média de seus irmãos não tratados por esta via com a proteína correspondente.

Comparando as variâncias dos grupos experimentais com seus respectivos grupos controles (Figuras 6A e B) observamos que ambas oscilam, tendo ocorrido um aumento bastante significativo na geração F_4 . Estas variações paralelas falam a favor de influência ambiental durante o processo seletivo. Apesar de ser esperado uma diminuição gradual da variância com o progresso da seleção, à medida que os genes relevantes acumulados forem sendo fixados (homozigose), uma oscilação na variância a cada geração sempre acontece nas etapas iniciais do processo seletivo.

A herdabilidade, expressa a proporção da variância total (fenotípica) que é atribuída aos efeitos médios dos genes (que é o que determina o grau de semelhança entre parentes). No entanto na prática, não expressa o valor intrínseco do caráter mas a confiabilidade do valor fenotípico como indicação do valor genotípico, isto é, qualquer mudança no valor fenotípico em decorrência de circunstâncias ambientais, influenciará a estimativa da herdabilidade. Desta forma, condições mais variáveis reduzem os valores da herdabilidade, enquanto que condições mais uniformes os aumentam (FALCONER, 1981). Isto é, uma mesma população quando em ambientes diferentes terá valores diferentes de herdabilidade; como são valores relativos, uma maior influência ambiental na variância fenotípica significa uma menor participação genotípica. O reverso acontece com a diminuição da influência ambiental na variância fenotípica.

Tem sido observado que a magnitude da herdabilidade apresenta também alguma conexão com a natureza dos caracteres.

De diferentes caracteres estudados em vários organismos, aqueles com menor herdabilidade são exatamente os mais intimamente relacionados ao maior valor adaptativo. Aqueles com mais alta herdabilidade são caracteres considerados menos importantes (FALCONER, 1981).

O valor da herdabilidade realizada na seleção para tolerância oral até o momento, medido pela regressão linear de R/S acumulados é de 0,27, valor este similar aos valores encontrados nas cinco seleções obtidas para a resposta imune quantitativa que está em torno de 0,20 para cada uma delas. Este mesmo valor foi encontrado por FALCONER (1965) para o tamanho da ninhada em camundongos, que é um determinante importante da aptidão natural.

Esta homogeneidade em torno do valor de 0,20 para a herdabilidade acumulada para produção quantitativa de anticorpos, encontrada nas diferentes seleções submetidas a diferentes influências ambientais (diferentes antígenos e diferentes esquemas de imunização), inclui também valor semelhante para a herdabilidade encontrada em outra espécie - $h_2 = 0,18 \pm 0,04$ em cobaias (IBANEZ, 1979). Estes resultados sugerem a existência de grupos poligênicos adaptativamente importantes mantidos pela seleção natural. Estes grupos gênicos seriam ao menos parcialmente comuns no controle da resposta de anticorpos a diferentes antígenos e, seriam importantes em sua regulação geral e quantitativa. Entre estes grupos gênicos estão provavelmente incluídos os genes de resposta imune não associados ao principal complexo de histocompatibilidade (H-2), assim como alguns complexos

secundários de histocompatibilidade. GASSE (1969) descreve um locus, denominado Ir-2, localizado no quinto grupo de ligação, que controla a capacidade de linhagens isogênicas de camundongos formarem anticorpos aglutinantes para os aloantígenos Ea-1 encontrados nos eritrócitos de camundongos selvagens. Ao quinto grupo de ligação estão associados os loci de histocompatibilidade H-3, H-6 e H-13. O efeito quantitativo do locus H-2 foi determinado pela diferença entre as linhagens boa e má respondedora da seleção I, como sendo de 14% em um total de 10 loci regulando a produção de anticorpos.

A variância genética aditiva, medida pela herdabilidade em torno de 0,2, é consequência da pressão exercida pela seleção. Uma fonte variada de estímulos antigênicos exige uma complexidade funcional do sistema imune, onde grupos gênicos independentes que acumularam grande quantidade de polimorfismo genético e que controlam diferentes mecanismos regulatórios interagem obrigatoriamente de forma não aditiva. Apenas o efeito aditivo destes genes não é o suficiente para explicar a variância observada. Este baixo valor de herdabilidade nos permite propôr que a interação gênica é um fator importante na variação da tolerância imunológica medida pela produção de anticorpos. Desta forma fatores não-aditivos da variância genética tais como dominância, epistasia e desequilíbrio de ligação têm que ser considerados.

A interação gênica, definida em termos darwinianos, como aquela observada pela ação de um determinado gene em diferentes ambientes genéticos é parte da variação fenotípica

descrita. Estes genes são selecionados de acordo com sua contribuição à adaptabilidade em combinação com outros genes. Em um ambiente genético, um determinado gene pode aumentar a adaptabilidade do genótipo e, em outro, o mesmo gene pode produzir um efeito contrário. A pressão da seleção natural favorece a qualidade de cooperação e de adaptação deste gene aos demais genes do patrimônio genético. No caso da regulação da resposta imune, o importante para a seleção não está na performance isolada de linfócitos e fagócitos, mas na qualidade de cooperação de suas atividades para determinar o nível de resposta dos indivíduos na população (coadaptação). Infelizmente, a interação gênica em características controladas poligenicamente é difícil de ser mensurada, mas o valor de herdabilidade encontrado, aliado a descrição de diferentes mecanismos controlando a indução de tolerância são indicativos da importância da interação gênica neste tipo de resposta.

Um outro aspecto importante observado na seleção para tolerância é a desigualdade da resposta a seleção, que pode ser observada na figura 5A. A assimetria é um aspecto comum em experiências de seleção divergente, porém difícil de ser explicada (FALCONER, 1955; PASSOS et al., 1977; FALCONER, 1981).

Alguns dados provisórios apontam para diferenças na taxa de fecundidade, assim como na viabilidade entre as linhagens ST e RT, no entanto, embora estas diferenças possam explicar o menor diferencial de seleção na linhagem ST (menos fértil), já que os indivíduos inférteis são aqueles com

fenótipos extremos, elas não explicam adequadamente a menor resposta ou o menor valor de herdabilidade acumulada.

A assimetria da resposta poderia se originar como consequência da relação entre o ponto do início e o limite de seleção. O limite teórico da seleção é quando todos os alelos relevantes foram fixados. Se a população inicial não apresenta sua média exatamente entre os dois limites no valor fenotípico, a resposta a seleção será maior em uma direção do que na outra. Um aspecto desta relação, é se a seleção natural favorece o heterozigoto; neste caso o limite em uma direção não é a fixação, mas o equilíbrio da frequência gênica. A seleção natural evitaria a fixação porque os homozigotos para um determinado gene associado ao caráter sob seleção são menos aptos.

Uma outra explicação para a assimetria da resposta poderia ser a existência na população inicial, de indivíduos com o genoma em desequilíbrio como consequência do intercasamento das linhagens isogênicas (muitos destes novos arranjos genotípicos não seriam viáveis). Estes indivíduos estariam em desvantagem em relação a uma série de características métricas. É possível que alguns deles estejam dentre aquelas selecionados como sensíveis à tolerância. Neste caso, o problema seria resolvido com a tendência natural das populações e dos indivíduos a um balanço ótimo de sua composição genética.

Em experiência não mostrada, observamos que os indivíduos da porção intermediária da curva fenotípica da população F_0 apresentaram uma melhor performance quando

comparados com aqueles escolhidos como ST e, uma leve superioridade quando comparados com aqueles escolhidos como RT, quanto a fertilidade. A população originada dos casais com fenótipo intermediário apresentou média e mediana homóloga aquela dos parentais e, uma variância relativa bastante reduzida. Neste contexto poderíamos interpretar estas observações como se pequenas diferenças aditivas entre os indivíduos estivessem obscurecidas pelo tamponamento (ajustamento regulatório) encontrado em genomas equilibrados (homeostasia genética).

Uma forte ligação cromossômica dos loci associados ao caráter sob seleção e aqueles associados ao valor adaptativo também causaria assimetria na resposta a seleção. Estas ligações podem ser desfeitas com a formação de novos arranjos por recombinação.

Seleção direcional artificial é obviamente uma força empenhada em mover uma população de sua composição de equilíbrio, forçando-a, embora não necessariamente, a dificuldades adaptativas quando um caráter métrico é selecionado. Segundo FALCONER (1981), associações entre o caráter selecionado e o valor adaptativo são comuns em populações originadas de acasalamento entre linhagens isogênicas e, são temporárias.

Respostas correlacionadas causando assimetria podem também ser devidas a pleiotropia (correlação fisiológica). É conhecido que as diferenças entre certas linhagens selecionadas para alta e baixa quantidade de anticorpos a antígenos naturais complexos podem ser devidas a diferenças na atividade

catabólica de macrófagos. A formação de fragmentos imunogênicos pelos macrófagos, é o primeiro degrau na cadeia de interações levando à síntese de anticorpos, tendo assim importância nas etapas regulatórias posteriores. Os enterócitos, por exemplo, são capazes de produzir fragmentos tolerogênicos, sendo importantes nas etapas iniciais da indução de tolerância oral; seria esperado que variações geneticamente determinadas na fisiologia do intestino contribuíssem com a resposta a antígenos ingeridos. Uma correlação entre atividade absorptiva dos enterócitos e tolerância oral poderia ser suspeitada neste caso, levando como consequência a outras correlações não esperadas.

Neste caso, estes genes de efeito pleiotrópico controlando o processo de absorção, seriam componentes de algum segmento polimórfico de um cromossomo mantido como unidade por causa de seu alto valor adaptativo.

Não é possível no momento distinguir entre estas explicações e, só a continuidade da seleção nos permitirá chegar a conclusões mais concretas sobre as modificações genéticas que estão ocorrendo.

Conclusões

5 - CONCLUSÕES

- 1 - Os resultados predizem a plausibilidade do processo seletivo para o estudo genético quantitativo da tolerância imunológica.
- 2 - Predizem ainda, a possibilidade de podermos dispor de um modelo experimental único para estudo de características imunológicas e genéticas.
- 3 - A distribuição normal dos títulos aglutinantes na população F_0 e, a significativa diferença observada interlinhagem indicam que a tolerância oral é um caráter controlado pelo efeito aditivo de vários loci independentes.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- ANDRÉ, C.; HEREMANS, J.F.; VAERMAN, J.P. & CAMBRIASO, C.L. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. J. Exp. Med., v.142, p.1509-1519, 1975.
- ASANO, Y.; NAKAYAMA, T.; KUBO, M.; FUJISAWA, H.; SINGER, A.; HODES, R.J. & TADA, T. Analysis of two distinct B cell activation pathways mediated by a monoclonal T helper cell. II. T helper cell secretion of IL-4 selectively inhibits antigen specific B cell activation by cognate, but not noncognate, interactions with T cells. J. Immunol., v.140, p.419-426, 1988.
- ASHERSON, G.L.; ZEMBALA, M.; PERERA, M.A.C.E.; MAYHEW, B. & THOMAS, W.R. Production of immunity and unresponsiveness in the mouse by feeding contact sensitizing agents and the role of suppressor cells in the Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and the other lymphoid tissues Cell. Immunol., v.33, p.145-155, 1977.
- ASKENASE, P.W.; HAYDEN, B.J. & GERSHON, R.K. Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. J. Exp. Med., v.141, p.697-702, 1975.

- AVRAMEAS, S. Coupling of Enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry, v.6, p.43-52, 1969.
- BAXEVANIS, C.N.; ISHII, N.; NAGY, Z.A. & KLEIN, J. H-2 controlled suppression of T cell response to lactate dehydrogenase B. J. Exp. Med., v.156, p.822-833, 1982.
- BENJAMIN, D.C. Evidence for specific suppression in the maintenance of immunological tolerance. J. Exp. Med., v.141, p.635-646, 1975.
- BENJAMIN, D.C. Suppressor cells in tolerance to HGG: kinetics and cross-suppression in high dose tolerance - Absence in low dose tolerance. J. Immunology, v.118, p.2125-2129, 1977a.
- BENJAMIN, D.C. Neonatally induced tolerance to HGG: duration in B cells and absence of specific suppressor cells. J. Immunol., v.119, p.311-314, 1977b.
- BIENENSTOCK, J. & BEFUS, D. Gut and bronchus associated lymphoid tissue. The Am. J. Anatomy, v.170, p.437-445, 1984.

- BIOZZI, G.; CABRERA, W.H.; MOUTON, D. & IBANEZ, O.M.
Restricted and general polygenic regulation of antibody responsiveness. In: Immunogenetics and Immune Regulation. Ed. b. Benacerraf. Milan: Masson, 1982. p.31-60.
- BIOZZI, G.; MOUTON, D.; HEUMANN, A.M.; BOUTHILLIER, Y.; STIFFEL, C & MEVEL, J.C. Genetic analysis of antibody responsiveness to sheep erythrocytes in crosses between lines of mice selected for high or low antibody synthesis. Immunology, v.36, p.427-438, 1979b.
- BIOZZI, G.; MOUTON, D.; SANT'ANNA, O.A.; PASSOS, H.C.; GENNARI, M.; REIS, M.H.; FERREIRA, V.C.A.; HEUMAN, A.M.; BOUTHILLIER, Y.; IBANEZ, O.M.; STIFFEL, C. & SIQUEIRA, M. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. Curr. Top. Microb. Immunol., v.85, p.31-98, 1979a.
- BIOZZI, G.; SIQUEIRA, M.; STIFFEL, C.; IBANEZ, O.M.; MOUTON, D. & FERREIRA, V.C.A. Genetic selections for relevant immunological functions. In: Immunology: progress in immunology. Ed. M.Fougerean, J. Dausset. London: Academic Press, 1980. v.4, p.432-457.
- BIOZZI, G.; STIFELL, C.; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y. & DECREUSEFOND, C. La régulation génétique de la synthèse des immunoglobulines au cours de la réponse imunologique. Ann. Immunol., v.125C, p.107-142, 1974.

- BLAND, P.W. MHC class II expression by the gut epithelium. Immunology Today, v.9, p.174-178, 1988.
- BLAND, P.W. & WARREN, L.G. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. Immunology, v.58, p.1-7, 1986a.
- BLAND, P.W. & WARREN, L.G. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. Immunology, v.58, p.9-14, 1986b.
- BOTTEN, J.P.; PALMER, D. & COHEN, M.M. Stimulation of mucus and nonparietal cell secretion by the E2 prostaglandins. Am. J. Dig. Dis., v.23, p.359-364, 1978.
- BRESSON, J.L.; PANG, K.Y. & WALKER, W.A. Microvillus membrane differentiation: quantitative difference in cholera toxin binding to the intestinal surface of newborn and adult rabbits. Pediatr. Res., v.18, p.984-987, 1984.
- BRUCE, M.G. & FERGUSON, A. The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed circulating ovalbumin in mice. Immunol., v.59, p.295-300, 1986.

- CHALLACOMBE, S.J. & TOMASI, T.B. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. J. Exp. Med., v.152, p.1459-1472, 1980.
- CHALON, M.P.; MILNE, R.W. & VAERMAN, J.P. In vitro suppressive effect of serum from orally immunized mice. Eur. J. Immunol., v.9, p.747-751, 1979.
- CHAOUAT, G. Suppressor T-cells in tolerance to human gamma globulin: mediation by a specific soluble factor. Cell. Immunol., v.36, p.1-14, 1978.
- CLARK, S.L. The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. J. Biophys. and Bioch. Citol., v.5, p.41-65, 1959.
- CRABBÉ, P.A. & HEREMANS, J.F. Presence of antibodies against egg-white antigens in human lymphoid tissues. Int. Arch. Allergy, v.30, p.597-603, 1966.
- DAVID, M.F. Prevention of homocytotropic antibody formation and anaphylaxis in rats by prefeeding antigen. J. Allergy Clin. Immunol., v.55, p.135, 1975.

- DEBRET, P.; KAPP, J.A.; DORF, M.E. & BENACERRAF, G. Genetic control of specific immune suppression. II H-2 linked dominant genetic control of immune suppression by the random. J. Exp. Med., v.142, p.1447-1454, 1975.
- DEGWERT, J.; BETTMANN, R.; HEUER, J. & KOLSCH, E.L. Isolation of a new bovine-serum-albumine specific T suppressor cell clone and evaluation of its "in vitro" functions. Immunology, v.60, p.345-352, 1987.
- DESJARDINS, C.; BRONSON, F.H. & BLANK, J.L. Genetic selection for reproductive photoresponsiveness in deer mice. Nature, v.322, p.172-173, 1986.
- DOYLE, M.V.; PARKS, D.E. & WEIGLE, W.O. Specific suppression of the immune response by HGG tolerance spleen cells. I. Parameters affecting the level of suppression. J. Immunol., v.116, p.1640-1645, 1976.
- ENDERS, G.; GOTTWALD, T. & DRENDER, W. Induction of oral tolerance in rats without Peyer's patches. Immunology, v.58, p.311-314, 1986.
- ERNST, P.B.; BEFUS, D. & BIENENSTOCK, J. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment. Immunology Today, v.6, p.50-55, 1985.

FALCONER, D.S. Patterns of response in selection experiments with mice. Cold Spring Harbos Symp. Quant. Biol., v.20, p.178-196, 1955.

FALCONER, D.S. Introduction to quantitative genetics. New York: Longman Inc., 2.ed., 1981.

FEINGOLD, N.; FEINGOLD, T.; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; STIFFEL, C. & BIOZZI, G. Polygenic regulations of antibody synthesis to sheep erythrocytes in the mouse: a genetic analysis. Eur. J. Immunol., v.6, p.43-51, 1976.

FELDMANN, M. T cell supression in vitro. II. Nature of specific supressive factor. Eur. J. Immunol., v.4, p.667-674, 1974.

FISHER, R.A. The genetical theory of Natural Selection. Oxford: Clarendon, 1930.

GASSER, D.L. Genetic control of the immune response in mice. I. Segregation data and localization to the fifth linkage group of a gene affecting antibody production. J. Immunol., v.103, p.66-70, 1969.

GAUTAM, A.M. & GLYM, P. Competition between foreign and self proteins in antigen presentation. Ovalbumin can inhibit activation of myelin basic protein. Specific T cells. J.Immunol., v.144, p.1177-1180, 1990.

GAUTAM, S.C.; CHIKKALA, N.F. & BATTISTO, J.R. Oral administration of the contact sensitizer trinitrochlorobenzene: initial sensitization and subsequent appearance of a suppressor population. Cell. Immunol., v.125, p.437-448, 1990.

GOLUB, E.S. & WEIGLE, W.O. Studies on the induction of immunologic unresponsiveness. III. Antigen form and mouse strain variation. J. Immunol., v.102, p.389-396, 1969.

GREEN, D.R. & MARTIN, St.S. Suppression and contrasuppression in the regulation of gut-associate immune responses. Ann. N.Y. Acad. Sci., v.409, n.284-291, 1983.

GREEN, D.R.; GERSHON, R.K. & EARDLY, D.D. Functional detection of different Ly-1 T-cell inducer subset activities by Ly-2 suppressor T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., v.78, p.3819-3823, 1981.

HANSON, D.G.; VAZ, N.M.; MAIA, L.C.S. & LYNCH, J.M. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies. J. Immunol., v.123, p.2337-2343, 1979.

- HANSON, D.G.; VAZ, N.M.; MAIA, L.C.S.; HORNBROOK, M.M.; LYNCH, J.M. & ROY, C.A. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., v.55, p.526-532, 1977.
- HAUBECK, H.D. & KOLSCH, E. Regulation of immune responses against, the syngenic ADI-PC-5 plasmacytoma in Balb/c mice. III. Induction of specific T suppressor cells to the Balb/c plasmacytoma ADJ-PC-5 during early stages of tumorigenesis. Immunology, v.47, p.503-510, 1982.
- HAUBECK, H.D.; STUTENKEMPER, R. & KOLSCH, E. Suppression of specific and non-specific cytolytic anti-tumor responses by tumor-specific T suppressor lymphocytes. Clin. Exp. Immunol., v.74, p.47-52, 1988.
- HEPPEL, L.M.J. & KILSHAW, P.J. Immune responses of Guinea pigs to dietary protein. I. Induction of tolerance by feeding with ovalbumin. Int. Archs. Allergy appl. Immun., v.68, p.54-59, 1982.
- HEUER, J.; BRUNER, K.; OPALKA, B. & KOLSCH, E. A cloned T-cell line from a tolerant mouse represents a novel antigen-specific suppressor cell type. Nature (Lond.), v.296, p.456-459, 1982.

IBANEZ, O.C.M. Seleção genética bidirecional de linhagens de cobaias boas e más produtoras de anticorpos contra eritrócitos heterólogos. São Paulo, 1979. Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina.

JENSEN, E.P. & KAPP, J.A. Genetics of Insulin specific helper and suppressor T cells in nonresponder mice. J. Immunol., v.135, p.2990-2995, 1985.

KAGNOFF, M.F. Effects of antigen feeding on intestinal and systemic immune responses. III. Antigen specific serum mediated suppression of humoral antibody responses after antigen feeding. Cell Immunol., v.40, p.186-203, 1978.

KOLSCH, E.; STUMPF, R. & WEBER, G. Low dose tolerance and suppressor T cells. Transplant. Rev., v.26, p.56-86, 1975.

LAMONT, A.G.; MOWAT, A.M.I. & PARROT, D.M.V. Priming of systemic and local delayed-type hypersensitivity response by feeding low doses of ovalbumin to mice. Immunology, v.66, p.595-599, 1989.

LATTER, B.D.H. & ROBERTSON, A. The effects of inbreeding and artificial selection on reproductive fitness. Genet. Res., v.3, p.110-138, 1962.

- LEECH, S.H. & ALI, M. Low dose restriction in Ir-gene control reflects susceptibility to tolerance induction. Cell. Immunol., v.64, p.350-358, 1981.
- LEVINE, B.B.; OJEDA, A. & BENACERRAF, B. Studies on artificial antigens. III. The genetic control of the immune response to hapten poly-L-lysine conjugates in guinea pigs. J. Exp. Med., v.118, p.953-957, 1963.
- LEWONTIN, R.C. The genetic basis of evolutionary change. New York: Columbia University Press, 1974.
- LIDER, O.; SANTOS, L.M.B.; LEE, C.S.Y.; HIGGINS, P.J. & WEINER, H.L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T-lymphocytes. J. Immunol., v.142, p.748-752, 1989.
- LUKIC, M.L.; COWING, C. & LESKOWITZ, S. Strain differences in case of tolerance induction to bovine-gamma-globulin: dependence on macrophage function. J. Immunol., v.114, p.503-506, 1975a.
- LUKIC, M.L.; WORTIS, H.H. & LESKOWITZ, S. A gene locus affecting tolerance to BCG in mice. Cell. Immunol., v.15, p.457-463, 1975b.

- MacARTHUR, J.W. Selection for small and large body size in the house mouse. Genetics, v.34, p.194-209, 1949.
- MacDONALD, T.T. Immunosuppression caused by antigen feeding. I. Evidence for the activation of a feedback suppressor pathway in the spleens of antigen fed mice. Eur. J. Immunol., v.12, p.767-773, 1982.
- MALIK, R.C. Genetic and physiological aspects of growth, body composition and feed efficiency in mice: a review. J.Anim.Sci., v.58, p.577-590, 1984.
- MATTINGLY, J.A. & WAKSMAN, B.H. Immunologic suppression after oral administration of antigen. I. Specific suppressor cells formed in rat Peyer's patches after oral administration of sheep erythrocytes and their systemic migration. J. Immunol., v.121, p.1878-1883, 1978.
- MATTINGLY, J.A.; KAPLAN, J.M. & JANEWAY, C.A. Two distinct antigen-specific suppressor factors induced by the oral administration of antigen. J. Exp. Med., v.152, p.545-554, 1980.
- MAYER, L. & SHLIEN, R. Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man. J. Exp. Med., v.166, p.1471-1483, 1987.

- McDEVITT, H. & SELA, M. Genetic control of the antibody response. I. Demonstration of determinant-specific differences in response to synthetic polypeptide antigens in two strains of inbred mice. J. Exp. Med., v.122, p.517-531, 1965.
- McDEVITT, H.O.; DEAK, B.D.; SHREFFLER, D.C.; KLEIN, J.; STIMPFLING, J.H. & SNELL, G.D. Genetic control of the immune response. Mapping of the Ir-1 locus. J. Exp. Med., v.135, p.1259-1278, 1972.
- MILLER, S.D. & HANSON, D.G. Inhibitory of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of call-mediated immune responses to ovalbumin. J.Immunol., v.123, p.2344-2350, 1979.
- MIZUNO, K.; TSUCHIMOTO, S.; MATSUNO, Y.; NIIYAMA, T.; FUJII, H.; NATORI T. & AIZAWA, M. The functional link between the immune suppression gene and Mhc class II molecules. Immunogenetics, v.27, p.406-413, 1988.
- MOUTON, D.; SANT'ANNA, O.A.; BIOZZI, G. Mutigenic control of specific and non-specific immunity in mice. A review. Livest. Prod. Sci., v.20, p.277-286, 1988.

- MOUTON, D.; STIFFEL, C. & BIOZZI, G. Genetic factors of immunity against infection. Annal. Immunol., v.136D, p.131-141, 1985.
- MOWAT, A.M. Depletion of suppressor T cells by 2'-deoxyguanosine abrogates tolerance in mice fed ovalbumin and permits the induction of intestinal delayed type hypersensitivity. Immunology, v.58, p.179-184, 1986.
- MOWAT, A.M. & FERGUSON, A. Migration inhibition of lymph node lymphocytes as one assay for regional cell-mediated immunity in the intestinal lymphoid tissues of mice immunized orally with ovalbumin. Immunology, v.42, p.365-370, 1982.
- MOWAT, A.M.; STROBEL, S.; DRUMMOND, H.E. & FERGUSON, A. Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. Immunology, v.45, p.105-113, 1982.
- NGAN, J. & KIND, L.S. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. J Immunology, v.120, p.861-865, 1978.

- OWEN, R.L. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. Gastroenterology, v.72, p.440-451, 1977.
- PANOCKA, I.; MAREK, P.; SADOWSKI, B. Inheritance of stress-induced analgesia in mice. Selective breeding study. Brain Res., v.397, p.152-155, 1986.
- PARKS, D.E.; DOYLE, M.V. & WRIGLE, W.O. Induction and mode of action of suppressor cells generated against human gamma globulin. J. Exp. Med., v.148, p.625-638, 1978.
- PASSOS, H.C.; SIQUEIRA, M.; REIS, M.H.; FERREIRA, V.C.A.; IBANEZ, O.M.; SANT'ANNA, O.A. & BIOZZI, G. Genetic control of immune response to protein antigens. 1. Two-way selective breeding of mice for quantitative antibody responsiveness to bovine serum albumin and rabbit gamma-globulin. J. Immunol., v.119, p.1439-1444, 1977.
- PAVLI, P.; WOODHAMS, C.E.; DOE, W.F. & HUME, D.A. Isolation and characterization of antigen presenting dendritic cells from the mouse intestinal lâmina própria Immunology, v.70, p.40-47, 1990.
- POWELL, T.J. & STREILEIN, J.W. Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4 secreting, tolerogen responsive T cells. J. Immunology, v.144, p.854-859, 1990.

- QUARONI, A.; KIRSCH, K. & HERSCOVICS, A. Surface-membrane biogenesis in rat intestinal epithelial cell at different stages of maturation. Biochem. J., v.192, p.133-144, 1980.
- RANGES, G.E. & AZAR, M.M. Inheritance of tolerance susceptibility to human gamma-globulin in congenic mice. J. Immunology, v.123, p.1151-1154, 1979.
- RICH, S.S.; ORSON, F.M. & RICH, R.R. Regulatory mechanisms in all-mediated immune responses. J. Exp. Med., v.146, p.1221-1233, 1977.
- RICHMAN, L.K.; CHILLER, J.M.; BROWN, W.R.; HANSON, O.G. & VAZ, N.M. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. J. Immunology, v.121, p.2429-2434, 1978.
- RIOS, M.J.; PEREIRA, M.A.C.; LOPES, L.M.; FARIA, A.M.C.; GONTIJO, C.M.; CASTANHEIRA, E.B. & VAZ, N.M. Tolerance induction and immunological priming initiated by mucosal contacts with protein antigens in inbred strains of mice. Braz. J. Med. Biol. Res., v.21, p.825-836, 1988.

- ROSENTHAL, A.S. & SHEVACH, E.M. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. J.Exp.Med., v.138, p.1194-1212, 1973.
- SACHS, D.H.; BERZOFKY, J.A.; FATHMAN, C.G.; PISETSKY, D.S.; SCHECHTER, A.N. & SCHAWARTZ, R.H. The immune response to Staphylococcal nuclease: a probe of cellular and humoral antigen specific receptors. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., v.41, p.295-306, 1977.
- SANT'ANNA, O.A. Regulação poligênica não específica da síntese de anticorpos. São Paulo, 1979. Tese de Doutorado - Escola Paulista de Medicina.
- SANT'ANNA, O.A.; FERREIRA, V.C.A.; REIS, M.H.; GEUNARI, M.; IBANEZ, O.M. ; ESTEVES, M.; MOUTON, D. & BIOZZI, G. Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic of Salmonellae. J. Immunogenetics (Oxford), v.9, p.191-205, 1982.
- SCHREIBER, R.A. & WALKER, W.A. The gastrointestinal barrier: antigen uptake and perinatal immunity. Ann. Allergy, v.61, p.3-12, 1988.

- SCHULER, W.; LEHLE, G.; WEIBER, E. & KOLSCH, E. Immune response against the T-independent antigen $\alpha(1 \rightarrow 3)$ dextran. I. Demonstration of an unexpected IgG response in athymic and germfree-raised euthymic Balb/c mice. Europ. J. Immunol., v.12, p.120-125, 1982.
- SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica. McGraw Hill do Brasil Ltda, 1975.
- SILVA, A.C.; MASSA, S. & SANT'ANNA, O.A. Preliminary results corroborating the polygenic control of immunologic tolerance. Braz. J. Med. Biol. Res., v.23, p.581-584, 1990.
- SIQUEIRA, M.; BAUDIERI, A.; REIS, M.H.; SANT'ANNA, O.A. & BIOZZI, G. Selective breedings of mice for antibody responsiveness to flagellar, and somatic antigens of Salmonellae. Eur. J. Immunol., v.6, p.241-249, 1976.
- SIQUEIRA, M.; ESTEVES, M.B.; IBANEZ, O.M.; FERREIRA, V.C.A.; SANT'ANNA, O.A.; REIS, M.H. & BIOZZI, G. Non specific regulation of antibody responsiveness in the mouse. Eur. J. Immunol., v.7, p.195-203, 1977.
- SITEPU, P.; BRINDLEY, P.T.; DOBSON, C. Nematospiroides dubius: direct and correlated responses to selection for high and low immune responsiveness in mice. Exp. Parasitol., v.61, p.57-64, 1985.
- SNYDER, J.S. & WALKER, W.A. Structure and function of intestinal mucin: developmental aspects. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., v.82, p.351-356, 1987.

SOBEY, W.R.; MAGRATH, J.M. & REISNER, A.H. Genetically controlled specific immunologic unresponsiveness. Immunology, v.11, p.511-514, 1966.

STAB, F.; AUSTRUP, F. & KOLSCH, E. Regulation of the anti- $\alpha(1 \rightarrow 3)$ dextran IgG antibody response of Balb/c mice by idiotype specific T suppressor lymphocytes. J. Immunology, v.144, p.53-59, 1990.

STRANNEGARD, O. & YURCHISION, A. Formation of agglutinating and reaginic antibodies in rabbits following oral administration of soluble and particulate antigens. Int. Arch. Allergy, v.35, p.579-590, 1969.

SUZUKI, I.; KIYONO, H.; KITAMURA, K.; GREEN, D.R. & MCGHEE, J.R. Abrogation of oral tolerance by contrasuppressor T cells suggests the presence of regulatory T-cell networks in the mucosal immune system. Nature, v.320, p.451-454, 1986.

TANIGUCHI, M.; TADA, T. & TOKUHISA, T. Properties of the antigen-specific suppressive T cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. III. Dual gene control of the T-cell mediated suppression of the antibody response. J. Exp. Med., v.144, p.20-31, 1976.

THOMAS, H.C. & PARROTT, M.V. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. Immunology, v.27, p.631-639, 1974.

TADA, T.; TANIGUCHI, M. & DAVID, C.S. Properties of the antigen-specific T-cell factor in the regulation of antibody response of the mouse. IV. Special subregions assignment of the gene(s) that codes for the suppressive T-cell factor in the H-2 histocompatibility complex. J.Exp.Med., v.144, p.713-725, 1976.

TREJDOSIEWICZ, L.K.; SMART, C.J.; OAKES, D.J.; HOWDLE, P.D.; MALIZIA, G.; CAMPANA, D. & BOYLSTON, A.W. Expression of T-cell receptors TcR1 (gamma/delta) and TcR2 (alfa/beta) in the human intestinal mucosa. Immunology, v.68, p.7-12, 1989.

van der HEIJDEN, P.J. & STOK, W. Improved procedure for the isolation of functionally active lymphoid cells from the murine intestine. J. Immunol. Methods, v.103, p.161-167, 1987.

VAZ, N.M. & LEVINE, B.B. Immune responses of inbred mice to repeated low doses of antigen: relationship to histocompatibility (H-2) type. Science, v.168, p.852-854, 1970.

- VAZ, N.M.; MAIA, L.C.S.; HANSON, D.G. & LYNCH, J.M. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. J. Allergy Clin. Immunol., v.60, p.110-115, 1977.
- VAZ, N.M.; PHILLIPS-QUAGLIATA, J.M.; LEVINE, B.B. & VAZ, E.M. H-2 linked genetic control of immune responsiveness to ovalbumin and ovomucoid. J. Exp. Med., v.134, p.1335-1348, 1971.
- VAZ, N.M.; RIOS, M.J.C.; LOPES, L.M.; GONTIJO, C.M.; CASTANHEIRA, E.B.; JACQUEMART, F. & ANDRADE, L.A.B. Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. Braz. J. Med. Biol. Res., v.20, p.785-790, 1987.
- VIVES, J.; PARKS, D.E. & WEIGLE, W.O. Immunologic unresponsiveness after gastric administration of human gamma-globulin. Antigen requirements and cellular parameters. J. Immunology, v.125, p.1811-1816, 1980.
- WALKER, W.A.; ISSELBACHER, K.J. & BLOCH, K.J. Intestinal uptake of macromolecules. Effect on oral immunization. Science, v.177, p.608-610, 1972.
- WALTENBAUGH, C.R.; DEBRE, P.; DORF, M. & BENACERRAF, B. Two H-2 gene control of GT specific immune suppression. Fed. Proc., v.35, p.713, 1976.

WALZER, M. Studies in absorption of undigested proteins in human beings. I. A simple direct method of studying the absorption of undigested protein. J. Immunology, v.14, p.143-174, 1927.

WEBER, G. & KOLSCH, E. Low zone tolerance: a possible defect in the switch from IgM to IgG production. Eur. J. Immunol., v.2, p.191-193, 1972.

WHISLER, R.L. & STOBO, J.D. Heterogeneity of murine regulatory T cells. I. Subpopulations of amplifier and suppressor T cells. J. Exp. Med., v.144, p.398-413, 1976.

WHISLER, R.L. & STOBO, J.D. Suppression of humoral and delayed hipersensitivity by distinct T cell subpopulations. J. Immunology, v.121, p.539-542, 1978.

YANO, A.R.; SCHWARTZ, R.H. & PAUL, W.E. Antigen presentation in the murine T-lymphocyte proliferative response. I. Requirements for genetic identity at the major histocompatibility complex. J.Exp.Med., v.146, p.828-842, 1977.