

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Patricia Ucelli Simioni

“ESTUDO SOBRE A TOLERÂNCIA ORAL EM CAMUNDONGOS:
A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS E ATIVIDADE DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular na área de
Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Campinas
2004

Campinas, 26 de novembro de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Assinatura

Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Assinatura

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Assinatura

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia Celular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, contando com financiamento da FAPESP e uma bolsa de doutoramento da CAPES.

-Ao André, meu porto seguro, pelo apoio, confiança e compreensão e à minha filha Giuliana, minha maior motivação.

-Aos meus pais, Mário e Christina, que me ensinaram a seguir em frente, sempre.

AGRADECIMENTOS

- Aos órgãos de fomento ao ensino e à pesquisa, CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro concedido ao desenvolvimento deste trabalho, através de concessão de bolsa de doutoramento e auxílio pesquisa, respectivamente.
- À Profa. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro, orientadora e amiga, com quem aprendi que seja qual for o caminho escolhido, a vida é sempre desafiante;
- À Dirce Lima Gabriel, pelo carinho sincero e pelo auxílio experimental;
- Ao Luis Gustavo Romani Fernandes, por toda ajuda e companheirismo;
- Às alunas do laboratório 1, em especial às amigas Carla, Ellen e Lóren, que se tornaram minha segunda família;
- Aos funcionários do Biotério que souberam colaborar com o andamento das pesquisas;
- Aos funcionários do Hemocentro, em particular à Fernanda Gonçalves Pereira, pelo auxílio durante ensaios de citometria de fluxo;
- Aos professores e funcionários do DMI, em especial aos funcionários da secretaria do departamento;
- Aos amigos do curso de Pós-Graduação, pelo espaço de conhecimento e parceria;
- Às professoras, Dra. Maria Heloisa S. Lima Blotta, Dra. Maria Cristina Roque-Barreira e Dra. Leonilda Maria B. dos Santos, pela cuidadosa análise prévia desse trabalho;
- Aos meus irmãos e familiares, por estarem sempre ao meu lado;
- A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho;

Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XVI
I –INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
<i>CONSIDERAÇÕES GERAIS</i>	<i>5</i>
<i>A TOLERÂNCIA ORAL.....</i>	<i>6</i>
<i>AS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....</i>	<i>9</i>
<i>AS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA.....</i>	<i>10</i>
<i>MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS</i>	<i>12</i>
<i>O MODELO TRANSGÊNICO DO11.10</i>	<i>13</i>
<i>O ENVELHECIMENTO E A SUSCEPTIBILIDADE À TOLERÂNCIA.....</i>	<i>14</i>
II – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	17
III – MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. ANIMAIS	21
2. REAGENTES.....	22
3. INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL.....	22
4. ENSAIO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA OVA	23
5. ENSAIO DE DETECÇÃO DAS SUBCLASSES IGG1 E IGG2A DOS ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA OVA	24
6. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA	25
7. ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T ANTÍGENO ESPECÍFICAS	25
7.1- ENRIQUECIMENTO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	26
7.2- ENRIQUECIMENTO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T.....	27
7.3. ENSAIO DE ATIVAÇÃO ANTÍGENO-ESPECÍFICA DE CÉLULAS T.....	28
8. DOSAGEM DE CITOCINAS.....	29

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
IV – RESULTADOS.....	31
1. OS EFEITOS DA INGESTÃO DE OVA SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS EM CAMUNDONGOS	32
2. A MANUTENÇÃO DA TOLERÂNCIA EM CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6.....	34
3. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE OVA E DA TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS A CAMUNDONGOS BALB/C E TRANSGÊNICOS DO11.10 DE IDADE AVANÇADA.....	38
4. SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS PRODUZIDAS POR CAMUNDONGOS TRATADOS OU NÃO COM OVA	42
5. MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS T DE CAMUNDONGOS DO11.10 TRATADOS COM OVA	44
6. PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T ATIVADOS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS	46
6.1 EFEITO DA INGESTÃO DE OVA SOBRE A CAPACIDADE DE APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA E EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	47
7. A SECREÇÃO DE CITOCINAS EM CO-CULTURAS DE LINFÓCITOS T E DCS.....	52
VII- DISCUSSÃO.....	64
V – CONCLUSÕES.....	76
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXOS.....	86

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: EFEITO DA INGESTÃO VOLUNTÁRIA DE OVA SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS BALB/C E DO11.10.....	33
FIGURA 2: EFEITO DA GAVAGEM COM OVA SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS BALB/C E DO11.10.....	35
FIGURA 3: MANUTENÇÃO DE TOLERÂNCIA À OVA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS BALB/C E C57BL/6...37	
FIGURA 4: EFEITO DA INGESTÃO VOLUNTÁRIA DE OVA SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POR CAMUNDONGOS BALB/C DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	39
FIGURA 5: EFEITO DA TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS <i>NAIVE</i> DE CAMUNDONGOS COM O AVANÇO DA IDADE.	41
FIGURA 6: DETERMINAÇÃO DAS SUBCLASSES DE ANTICORPOS SÉRICOS DE CAMUNDONGOS BALB/C E TRANSGÊNICOS DO11.10 TRATADOS COM OVA PELA VIA ORAL.	43
FIGURA 7: EXPRESSÃO DO MARCADOR DE SUPERFÍCIE ANTI CLONOTIPO KJ1-26 NOS LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS DO11.10	45
FIGURA 8: ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T <i>NAIVE</i> POR PREPARAÇÕES ENRIQUECIDAS DE DCs DE CAMUNDONGOS BALB/c.....	48
FIGURA 9: INFLUÊNCIA DO STATUS IMUNOLÓGICO DAS DCs SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T.	50
FIGURA 10: INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE A CAPACIDADE APRESENTADORA DE ANTÍGENO DAS DCs.	51
FIGURA 11: FREQUÊNCIA DO MARCADOR DE ATIVAÇÃO CD80 NAS DCs DE CAMUNDONGOS BALB/c E DO11.10.....	53
FIGURA 12: FREQUÊNCIA DO MARCADOR DE ATIVAÇÃO CD86 NAS DCs DE CAMUNDONGOS BALB/c E DO11.10.....	54
FIGURA 13: PERFIL DE CITOCINAS TH1 EM SOBRENADANTES DE CULTURAS DE CÉLULAS T ESTIMULADAS POR DCs DE CAMUNDONGOS JOVENS BALB/c OU TRANSGÊNICOS DO11.10.	56
FIGURA 14: PERFIL DE CITOCINAS TH2 EM SOBRENADANTES DE CULTURAS DE CÉLULAS T ESTIMULADAS POR DCs DE CAMUNDONGOS JOVENS BALB/c OU TRANSGÊNICOS DO11.10.	57
FIGURA 15: PRODUÇÃO DE TGF-BETA EM SOBRENADANTES DE CULTURAS DE CÉLULAS T ESTIMULADAS POR DCs DE CAMUNDONGOS JOVENS BALB/c OU TRANSGÊNICOS DO11.10.	58
FIGURA 16: PRODUÇÃO DE IL-1 EM CO-CULTURAS DE CÉLULAS T E DCs.	60
FIGURA 17: PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH1 EM CULTURAS DE CÉLULAS T ESTIMULADAS POR DCs DE CAMUNDONGOS BALB/c DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	61

FIGURA 18: PRODUÇÃO DE CITOCINAS TH2 EM CULTURAS DE CÉLULAS T ESTIMULADAS POR DCs DE CAMUNDONGOS BALB/C DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS	62
FIGURA 19: PRODUÇÃO DE TGF-BETA EM CULTURAS DE CÉLULAS T ESTIMULADAS POR DCs DE CAMUNDONGOS BALB/C DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS.	63

ABREVIATURAS

AL(OH) ₃	- Hidróxido de alumínio
APCs	- Células apresentadoras de antígeno
BSA	- Soro albumina bovina
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
Con-A	- Concanavalina A
CpG	- Sequência citidina-guanina não metilada de DNA bacteriano
CTLA-4	- Proteína associada à linfócitos T citotóxicos 4
DCs	- Células dendríticas
DMSO	- Dimetilsulfoxido
ELISA	- Enzyme linked immunoabsorbant assay
FBS	- Soro fetal bovino
FITC	- Isotiocinato de fluoresceína
GM - CSF	- Fator estimulador de colônia de granulócito/ macrófago
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
HBSS	- Solução salina balanceada de Hank's
HEPES	- N-[2-hidroxietil] piperazina N'[2-ácido etanesulfónico]
HRPO	- Peroxidase
i.p.	- Intraperitoneal
IFN- γ	- Interferon gamma
Ig	- Imunoglobulina
IL-1 β	- Interleucina 1 beta
IL-2	- Interleucina 2
IL-4	- Interleucina 4
IL-10	- Interleucina 10
LPS	- Lipopolissacarídeo
MHC	- Complexo de histocompatibilidade principal
MTT	- 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 bromídeo difeniltetrazolio

NK	- <i>Natural Killer</i>
OPD	- Ortofenilenodiamina
OVA	- Ovalbumina
PBS	- Salina tamponada
PE	- Ficoeritrina
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
TCR	- Receptor de células T
TGF	- Fator transformador de crescimento
Th1	- Linfócitos T <i>helper</i> tipo 1
Th2	- Linfócitos T <i>helper</i> tipo 2
TLR	- Receptor <i>toll -like</i>
TNF	- Fator de necrose tumoral

RESUMO

A administração de uma proteína solúvel por via oral é um dos meios mais efetivos de induzir a supressão da resposta imune sistêmica a antígenos protéicos, conhecida como tolerância oral ou de mucosas. No presente estudo, a tolerância oral à ovalbumina (OVA) foi analisada em camundongos BALB/c, selvagens e transgênicos (DO11.10), jovens, adultos, de meia-idade e velhos, utilizando-se protocolos de ingestão forçada (gavagem) ou voluntária (adicionada à água de beber) da proteína, aplicados por tempos variados. Tanto a gavagem como a ingestão voluntária de OVA induziram a tolerância sistêmica em camundongos BALB/c selvagens, de todas as faixas etárias avaliadas, de modo dose-dependente, conforme constatado pela produção reduzida de anticorpos séricos específicos, após o desafio antigênico por via parenteral. Entretanto, o tratamento oral com OVA não produziu o mesmo efeito nos camundongos transgênicos DO11.10, de qualquer das idades examinadas, muito embora esses animais tenham apresentado uma redução significativa no número de células do clonotipo KJ1-26, observada tanto no baço quanto no sangue periférico, após a ingestão da proteína. Nos camundongos BALB/c, o esquema de imunização parenteral com OVA, utilizando o hidróxido de alumínio como adjuvante, gerou preferencialmente a produção de anticorpos da classe IgG1, dependentes de linfócitos Th2, cujos níveis foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento oral com OVA. Nos camundongos transgênicos DO11.10, o mesmo esquema de imunização induziu uma resposta humoral mista, com a produção de anticorpos IgG2a e IgG1, dependentes das citocinas produzidas por linfócitos Th1 e Th2, respectivamente, cujos níveis não foram afetados pela prévia ingestão de OVA. Uma vez que camundongos BALB/c jovens tornaram-se tolerantes pela ingestão voluntária de OVA (4mg/mL, por 7 dias consecutivos), esse estado foi mantido por mais

de 44 semanas e pôde ser revertido pela transferência adotiva de 6×10^6 células esplênicas *naive*, isoladas de camundongos jovens da linhagem selvagem. Entretanto, nos camundongos transgênicos DO11.10, a transferência adotiva do mesmo número de células esplênicas da linhagem selvagem, seguida por novo tratamento oral com OVA por ingestão voluntária, resultou em níveis ainda mais elevados de anticorpos séricos específicos. As células dendríticas (DCs) de camundongos BALB/c jovens tolerantes à OVA foram menos eficientes em sustentar a proliferação *in vitro* de células T *naive*, isoladas tanto de camundongos selvagens como transgênicos, do que as DCs de camundongos BALB/c imunizados apenas por via intraperitoneal (i.p.). As co-culturas de células T *naive* e DCs de camundongos tolerantes apresentaram níveis significativamente menores de citocinas liberadas por células com perfil Th1 (IL-2 e IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10) do que as culturas realizadas na presença de DCs obtidas de camundongos BALB/c imunizados com OVA por via i.p. Por outro lado, as DCs de camundongos transgênicos DO11.10, alimentados ou não com OVA e desafiados com o antígeno por via i.p., foram igualmente eficientes em induzir a proliferação de células T específicas, assim como a secreção das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10. Entretanto, a secreção de TGF- β foi significativamente mais elevada nos sobrenadantes de cultura de células T *naive* co-cultivadas com as DCs de camundongos BALB/c tolerantes do que com as DCs de camundongos DO11.10 ou dos BALB/c imunizados por via parenteral. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que, em um sistema imune integro, a tolerância às proteínas da dieta se estabelece às custas das interações entre células apresentadoras de antígeno e células T, nas quais as proporções celulares e as moléculas estimuladoras resultantes estão em delicado equilíbrio. Alterações nesse balanço podem provocar, como observado no camundongo DO11.10, o desencadeamento de respostas imunes

dirigidas contra o antígeno relacionado com a população linfocitária predominante, podendo resultar em doenças inflamatórias e alérgicas. Estudos mais aprofundados são necessários para entender a dinâmica dessas populações celulares na indução e manutenção da tolerância, para eventualmente utilizar esse conhecimento na reversão de manifestações autoimunes ou de hipersensibilidades ou ainda na prevenção da rejeição de transplantes.

ABSTRACT

The oral administration of soluble protein is one of the most effective ways of inducing the suppression of the systemic immune response to proteic antigens, otherwise known as oral tolerance. In this study, oral tolerance to ovalbumin (OVA) was analyzed in wild type BALB/c and DO11.10 transgenic mice of four ages: young, young adult, middle-aged and old, using protocols of forced ingestion (gavage) and continuous feeding (OVA added to the drinking water). Both gavage and voluntary ingestion (continuous feeding) of OVA induced dose-dependent systemic tolerance in the BALB/c mice of all ages evaluated, as indicated by reduced production of specific antibodies in the sera after antigenic challenge. However, neither treatment affected the DO11.10 transgenic mice, since these present a significant reduction in the number of clonotype KJ1-26 cells after the ingestion of the protein, as observed in the spleen and peripheral blood. In BALB/c mice, a schedule of parenteral immunization with OVA using alum as adjuvant preferentially leads to IgG1 antibody production, which is dependent on Th2 lymphocytes, with levels significantly reduced by oral pre-treatment with OVA. In DO11.10 transgenic mice, however, the same immunization schedule induced not only the production of the IgG1 antibodies related to cytokines produced by Th2 lymphocytes, but also IgG2a, related to Th1-producing cytokines, which had not been affected in the BALB/c mice. Once young BALB/c mice became tolerant by voluntary ingestion of OVA (4mg/mL, for 7 consecutive days), the state of tolerance was maintained for more than 44 weeks, although reversed by adoptive transference of 6×10^6 naive spleen cells, isolated from young wild type mice. However, in the DO11.10 transgenic mice, the adoptive transfer of the same number of BALB/c spleen cells had to be followed by a new oral treatment with OVA by continuous feeding; this resulted in higher specific

antibody levels in the sera. The dendritic cells (DCs) from tolerant young BALB/c mice were less efficient in supporting *in vitro* proliferation of isolated naive T cells (whether from BALB/c or DO11.10 mice) than were the DCs from BALB/c mice immunized intraperitoneally (i.p.). Co-cultures of naive T cells and DCs from tolerant BALB/c mice revealed lower levels of cytokines from Th1 (IL-2 and IFN γ) and Th2 (IL-4 and IL-10) than did those including DCs from i.p. immunized individuals. On the other hand, the DCs from DO11.10 transgenic mice, whether or not they had been fed with OVA, challenged intraperitoneally with the antigen were all equally efficient in the induction of the proliferation of specific T cells, as well as the secretion of IL-2, IFN γ , IL-4 and IL-10. However, TGF- β secretion was significantly higher in the supernatants of T cell cultures from naive BALB/c mice co-cultivated with DCs from tolerant BALB/c mice than in the presence of DCs from DO11.10 or immunized BALB/c mice. The results indicate that tolerance to dietary proteins is dependent of interactions between antigen presenting cells and T cells, with the ratio of these cells and the resultant stimulatory molecules in delicate balance. As observed in DO11.10 mice, alterations in this balance can cause immune responses against the antigen and generate inflammatory and allergic illnesses. Other studies are necessary to understand the dynamics of these cell populations in the induction and maintenance of tolerance, in the hopes that autoimmune and hypersensitivity manifestations can be reversed and transplant rejection prevented.

I-INTRODUÇÃO

O sistema imune presente nas mucosas do trato gastrointestinal coexiste com os antígenos da dieta e as bactérias da flora intestinal, além de diferenciar o que é próprio e não próprio [Appud. MAYER 2004]. Assim, as respostas imunes geradas nesse ambiente podem apresentar características diversas, que vão desde a eliminação de agentes patogênicos até a tolerância local ou sistêmica para antígenos ingeridos na dieta [Appud. ALPNA, 2001]. A tolerância oral que se segue à ingestão de proteínas provavelmente desempenha o papel vital de impedir as reações de hipersensibilidade aos alimentos [HAYDAY & VINEY, 2000]. Dessa forma, é lícito pensar que os antígenos consumidos na dieta também possam interferir no curso de doenças autoimunes, tornando de grande interesse o entendimento dos mecanismos de tolerância oral [WAKABAYASHI *et al.*; 1999; FARIA *et al.*, 2003].

Os dois principais protocolos experimentais usados para induzir a tolerância sistêmica pela via oral são a gavagem e a administração *ad libitum* de proteína misturada à água de beber, geralmente denominada de ingestão voluntária. Entretanto, as variações nas doses e na duração da exposição aos antígenos pela via oral têm gerado uma quantidade considerável de dados divergentes relatados na literatura [MOUREAU & GABORIAU-ROUTHIAU, 1996; FARIA *et al.*, 1998-b; WAKABAYASHI *et al.*, 1999].

É sabido que o envelhecimento pode afetar negativamente a susceptibilidade à indução ou à manutenção da tolerância oral [MOUREAU & GABORIAU-ROUTHIAU, 1996; FARIA *et al.*, 1998-B; WAKABAYASHI *et al.*, 1999; VERDOLIN *et al.*, 2001] A literatura cita que a susceptibilidade à tolerância oral em camundongos BALB/c velhos não foi alterada pela transferência adotiva de células do baço de camundongos jovens [LAHMANN *et al.*,1992]. Entretanto, a susceptibilidade de camundongos C57BL/6 velhos à tolerância oral pode ser

restaurada pela transferência adotiva de células do baço de animais jovens [LAHMANN *et al.*, 1992], indicando que o envelhecimento leva a modificações na dinâmica das populações celulares que compõem o circuito imune. Porém, é possível que as deficiências observadas nas respostas de indivíduos velhos tanto à imunização como à tolerização possam estar também relacionadas com alterações na capacidade de processamento e/ou de apresentação antigênica de células dendríticas (DCs).

As DCs são consideradas apresentadoras profissionais de antígeno para as células T *naive*, estimulando respostas imunes ou tolerogênicas. Trabalhos recentes têm sugerido o uso dessas células como ferramenta na imunoterapia do câncer, de doenças autoimunes, de alergias, assim como em processos de vacinação [Appud. LEGGE *et al.*, 2002; ARDAVIN, 2003; STEINMAN *et al.*, 2003]. Entretanto, existem poucos dados na literatura sobre as características fenotípicas e funcionais das DCs que atuam em uma resposta tolerogênica ou imunogênica, no decorrer do envelhecimento. Há, porém, relatos de que DCs derivadas do sangue periférico de humanos, de diferentes faixas etárias, não apresentam alterações significativas nos seus marcadores de superfície e nem na sua capacidade de ativar linfócitos T previamente estimulados *in vitro* com toxina tetânica [STEGGER *et al.*, 1996].

A produção diferenciada de sinais químicos por células apresentadoras de antígeno também pode ser um dos fatores determinantes de uma resposta imunogênica ou tolerogênica. Por exemplo, a IL-1 derivada de DCs e de outros tipos celulares é considerada um dos mais importantes sinais requeridos para ativação de células T e para a produção de IL-2 por essas células em uma resposta imunogênica [MARTH *et al.*, 2000; THORSTENSON & KHORTUTS, 2001].

Além das DCs, atribui-se também um papel importante às células regulatórias na indução e

manutenção da tolerância, seja pelo contato célula a célula ou através de citocinas secretadas, tais como IL-10 e TGF- β [NAKAMURA, 2001; THORSTENSON & KHORTUTS, 2001; JEGO & PALUCKA, 2003; RAMSDELL, 2003].

Recentemente, os modelos experimentais desenvolvidos para estudar a tolerância central têm sido usados para investigar a tolerância oral, particularmente os camundongos transgênicos DO11.10, nos quais a maioria das células T periféricas carregam um TCR específico para a ovalbumina (OVA) [MURPHY *et al.*, 1990; NAGLER-ANDERSON, 2001]. Estudos realizados com os camundongos DO11.10 têm mostrado que a ingestão da proteína nativa ou do peptídeo tolerogênico OVA323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) resulta em tolerância, como detectado através da redução da proliferação de células T antígeno-específicas e produção de citocinas [LAHMANN *et al.*, 1992; HAWIGER *et al.*, 2001; JONULEIT *et al.*, 2001; BELZ *et al.*, 2002; STEINMAN *et al.* 2003]. Entretanto, os efeitos da administração oral da proteína nativa ou de seu peptídeo sobre a produção de anticorpos específicos nos camundongos DO11.10 permanecem pouco explorados.

Dessa forma, foram objetivos desse estudo analisar a resposta imune humoral de camundongos BALB/c, selvagens e transgênicos (DO11.10), de diferentes faixas etárias, tratados oralmente com OVA e a expressão de moléculas de superfície (CD80/86) de DCs obtidas de camundongos tolerizados ou não, bem como a capacidade dessas células de sustentar a proliferação e a secreção de citocinas por células T de camundongos *naive*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A tolerização de linfócitos T CD4⁺ pode resultar na inibição da resposta imune humoral e/ou celular, uma vez que essa célula é o elemento crítico no controle de ambos os tipos de resposta aos antígenos protéicos [MILLER & MORAHAN, 1992].

A indução de tolerância em linfócitos B é determinada, em parte, pelo grau de ligação do antígeno ao receptor e pela disponibilidade de células T *helper*. Entretanto, a tolerância imunológica parece mais facilmente induzida em células T do que em células B, por requerer menores quantidades de tolerógeno. (FAZEKAS *et al.*, 1997, FULCHER & BASTEN, 1997).

Diferentes formas de exposição ao antígeno podem induzir a tolerância em células T, por exemplo, a administração sistêmica de altas doses de proteínas solúveis na ausência de adjuvantes (tolerância de alta dose), a administração oral de antígenos protéicos (tolerância oral) ou a administração repetida de baixas doses de antígeno protéico na ausência de adjuvante (tolerância de baixa dose) [MILLER & MORAHAN, 1992; WEINER, 1997].

Diversos fatores parecem estar envolvidos no estabelecimento da tolerância periférica de células T. Dentre eles destacam-se a ausência de expressão de moléculas co-estimulatórias pelas APCs, a sinalização negativa ou inibitória por parte de certas APCs, a afinidade de reconhecimento do antígeno pelas células T e o microambiente onde os linfócitos T reconhecem e respondem aos antígenos [MILLER & MORAHAN, 1992].

Acredita-se ainda que os mesmos mecanismos responsáveis pela indução de tolerância imunológica aos antígenos próprios sejam também responsáveis pela tolerância aos antígenos exógenos, isto é, a deleção clonal de linfócitos, a anergia clonal e a supressão da atividade de células efetoras por células regulatórias [MILLER & MORAHAN, 1992]. Os mecanismos envolvidos na função inibitória das células T regulatórias podem estar relacionados com as citocinas IL-10 e TGF- β , ou ainda com a sinalização via CTLA4 ou via TGF- β de membrana, no contato célula a célula [NAKAMURA, 2001; CHEN, 2002].

A TOLERÂNCIA ORAL

Várias pesquisas conduzidas na década de 1970 demonstraram que o sistema imune associado às mucosas do trato gastrointestinal, além de gerar respostas imunes clássicas, com a produção de anticorpos protetores contra microrganismos patogênicos ou contra outros antígenos misturados a adjuvantes, também podia iniciar um tipo peculiar de resposta imune mediada por células T, caracterizado pela supressão da produção de anticorpos específicos contra antígenos protéicos introduzidos pela via intragástrica [VAZ *et al.*, 1977; HANSON *et al.*, 1978; RICHMAN *et al.*, 1978]. Esses trabalhos mostraram que a exposição a doses moderadas de proteína pela via digestiva levava ao desenvolvimento de um estado tolerante específico e de longa duração, que podia ser transferido adotivamente de animal tolerante para animal normal ou irradiado, através da inoculação de células esplênicas totais ou purificadas por lã de nylon. Esse estado era abolido pelo tratamento com soro anti-linfócitos e complemento. Esses trabalhos pioneiros mostraram ainda que a administração de proteína pela via entérica resultava em

supressão da proliferação de linfócitos T de linfonodos, atribuída a um tipo particular de célula supressora não identificada.

Como discutido por VAZ & VARELLA [1978], o aparente paradoxo das respostas imunes desenvolvidas nas mucosas do trato digestivo pode ser conciliado pela idéia de um sistema imune centrado no reconhecimento de seus próprios componentes, mas capaz de integrar certos elementos vindos do meio externo, como os antígenos da dieta e os microrganismos da flora normal, e de excluir outros elementos como os patógenos.

Cerca de duas décadas depois da publicação desses primeiros trabalhos, as pesquisas sobre a tolerância imunológica induzida pela administração intragástrica de proteínas, ou tolerância oral, como o fenômeno ficou sendo conhecido, ganharam novo impulso graças a possibilidade de se utilizar esses conhecimentos no tratamento das alergias e das doenças autoimunes.

Os resultados experimentais até agora acumulados permitiram avançar no conhecimento de importantes aspectos da tolerância oral. Por exemplo, os mecanismos que operam na tolerância imune a antígenos da dieta parecem ser os mesmos que induzem a tolerância a antígenos próprios no nível central e/ou periférico, quais sejam, a deleção e a anergia clonal. Acredita-se que, na tolerância oral, uma única dose de proteína possa levar a anergia ou deleção de células T. Já na tolerância induzida por múltiplas doses de baixas quantidades de antígeno, a supressão da resposta imune pode ser atribuída à expansão de células regulatórias que secretam citocinas como a IL-4, IL-10 e/ou TGF- β [Appud. WEINER, 1997; WU *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 1999].

Tem-se buscado, sem êxito, reverter o estado tolerogênico, isto é, quebrar a tolerância já estabelecida, através de imunizações sucessivas com o antígeno misturado a poderosos adjuvantes, como relatado por BARONE *et al.* [2000]. Apenas a administração por via oral de uma preparação de proteína encapsulada em um polímero acrílico, resistente a degradação por pH

baixos, proporcionou algum sucesso na quebra da tolerância, manifesto por aumento significativo de resposta proliferativa e humoral [BARONE *et al.*, 2000].

Trabalhos recentes têm abordado o papel das células T CD4⁺CD25⁺ na tolerância central [WALKER *et al.*, 2003; WOOD & SAKAGUSHI, 2003]. KAWAHATA *et al.* [2002] demonstraram que parte das células T autoreativas, portando TCR com afinidade suficiente para sofrerem deleção clonal, podem ser selecionadas positivamente no timo como células T CD4⁺CD25⁺. Relatos recentes apontam para um importante papel regulatório exercido por células TCD4⁺CD25⁺ no fenômeno de tolerância a antígenos introduzidos pela via oral [THORTENSON & KHORUTS, 2001; ZHANG *et al.*, 2001; DUBOIS *et al.*, 2003]. Utilizando o modelo transgênico DO11.10, ZHANG *et al.* [2001] demonstraram que a ingestão de OVA resulta em um aumento no número de células T CD4⁺CD25⁺ expressando CTLA-4, capazes de secretar grandes quantidades de IL-10 e TGF-β₁ quando estimuladas *in vitro* com anti-CD3. Coerentemente, a transferência adotiva de células esplênicas de camundongos transgênicos DO11.10 para camundongos BALB/c, seguida de administração oral de OVA, resultou em aumento do número de células T CD4⁺CD25⁺ originadas do animal transgênico [THORTENSON & KHORUTS, 2001]. Ainda, WALKER *et al.* [2003] demonstraram que as células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ de camundongos transgênicos DO11.10 imunizados com a OVA são capazes de proliferar *in vivo*, diferentemente das células T CD25⁻, que são deletadas após estimulação antigênica.

AS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Dentre as APCs, células dendríticas são consideradas os principais tipos celulares envolvidos no *priming* dos linfócitos T [STEINMAN, 1991; STEINMAN *et al.*, 1983]. As DCs são especializadas na apresentação de antígenos para células T *naive* ou quiescentes, desempenhando um papel fundamental na indução da imunidade de células T e B. [STEINMAN, 1991; INGULLI *et al.*, 1997; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; KAPSENBERG, 2003]. Essas células também participam do desenvolvimento dos linfócitos no timo, órgão onde é gerado o repertório de células T.

As DCs se localizam na maioria dos tecidos, capturam e processam o antígeno e o apresentam em sua superfície, associados a moléculas de MHC [STEINMAN, 1991; KOCH *et al.*, 1995]. As DCs migram dos tecidos para os órgãos linfóides periféricos - baço e linfonodos - onde ativam células T específicas para o antígeno [BANCHEREAU & STEINMAN, 1998].

As células dendríticas se originam na medula óssea através da diferenciação de precursores mielóides ou linfóides, podendo desempenhar papéis distintos na imunidade ou na tolerância [STEINMAN, 1991; SHORTMAN & LIU, 2002; ARDAVIN, 2003]. ARDAVIN *et al.* [2003] reportam que as DCs expressando a molécula CD8 (DC CD8⁺) tem menor capacidade fagocítica e endocítica que as DCs que não expressam essa molécula na superfície celular. As DCs CD8⁻ induzem preferencialmente a diferenciação do subgrupo de linfócitos Th2, enquanto as DCs CD8⁺ induzem Th1, por secretarem IL-12. Entretanto, essa divisão pode ser alterada pelos fatores que modulam a função das DCs, em particular a capacidade de produzir IL-12. Esses fatores incluem o status de ativação das DCs, a natureza do antígeno, a concentração do antígeno, o tipo de receptor responsável pelo processamento do antígeno, bem como a produção de citocinas

específicas, como IL-10 e IFN- γ . Como exemplo, tem sido demonstrado que as DCs CD8⁻, cultivadas na ausência de IL-10 ou ativadas por CD40, produzem IL-12 e induzem a secreção de citocinas Th1. Já as DCs CD8⁺, na presença de baixas concentrações de antígeno, induzem a secreção de citocinas Th2.

AS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA

Inicialmente, a maior parte dos estudos sobre a tolerância se detinha, quase exclusivamente, no papel desempenhado pelos linfócitos nesse fenômeno. Mais recentemente, tem-se atribuído um papel importante às células apresentadoras de antígeno (APC) na indução e na manutenção da tolerância central e periférica [FINKELMAN *et al.*, 1996; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; NAGLER-ANDERSON *et al.*, 2001; BELZ *et al.*, 2003; KAPSENBERG, 2003]. As DCs podem ativar ou suprimir respostas imunológicas, dependendo dos sinais que recebem de outras células. As DCs podem participar de diferentes mecanismos envolvidos na indução da tolerância de células T, tais como: deleção clonal, anergia clonal e indução de células T regulatórias [STEINMAN *et al.*, 2003].

A tolerância central das células T no timo é mediada pelas DCs, que induzem a morte por apoptose dos linfócitos T auto-reativos [SHORTMAN & LIU, 2002]. Na periferia, as DCs quiescentes são suficientemente maduras para expressar moderados níveis de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias; porém, por não estarem completamente ativadas, ao interagirem com os linfócitos T, induzem um estado de tolerância sistêmico. As DCs imaturas capturam células apoptóticas e induzem tolerância por deleção de células T antígeno-específicas [INABA, 1990].

Há evidências do envolvimento de DCs na indução de tolerância periférica e de respostas imunes a patógenos. Trabalho recente indica que além da apresentação de antígeno e de sinais co-estimulatórios, as DCs também estão preparadas para emitir um sinal adicional, denominado sinal três, relacionado com a secreção diferenciada de citocinas, que contribuiria para modular a diferenciação de células T *naive* em células Th1 ou Th2 [KALINSKI *et al.*, 1999].

Doses baixas de antígenos solúveis podem induzir tolerância quando encontram as DCs em estado quiescente [BELZ *et al.*, 2002, STEINMAN *et al.*, 2003]. Entretanto, os diversos subtipos de DCs podem se envolver na tolerância de forma distinta. Há dados de literatura indicativos de que DCs imaturas participem da modulação da tolerância por induzir a diferenciação de células T regulatórias. Há também, evidências de que algumas populações de DCs, como DCs imaturas moduladas por IL-10, DCs derivadas do fígado ou DCs linfóides, sejam capazes de regular negativamente a resposta imune por inibir a proliferação de célula T [HAWIGER *et al.*, 2001; JONULEIT *et al.*, 2001].

BANCHEREAU & STEINMAN [1998] sugerem que DCs originadas de diferentes progenitores podem estar envolvidas em diferentes tarefas, isto é, DCs residentes de origem linfóide podem estar relacionadas com a indução de tolerância ao próprio, enquanto células de origem mielóide, incluindo as células de Langerhans, são ativadas por antígenos estranhos na periferia e migram para os órgãos linfóides para iniciar uma resposta imunológica. SUSS & SHORTMAN, [1996] sugerem que as células envolvidas na indução de tolerância sejam qualitativamente diferentes daquelas responsáveis por uma resposta imune, possivelmente pela expressão de moléculas de superfície distintas.

Certas citocinas produzidas por DCs, como IL-1, são fundamentais para a ativação de células T e a produção de IL-2. Esta citocina exerce um efeito inibitório sobre a indução de tolerância e

sua adição reverte a tolerância pré-estabelecida. O fato de células T anérgicas re-estimuladas *in vitro* não produzirem IL-2 corrobora para essa idéia [MILLER & MORAHAN, 1992]. Por outro lado, a indução de tolerância parece ser também um atributo da IL-10. A IL-10 inibe o desenvolvimento de DCs e atua de modo a converter as DCs imaturas em células apresentadoras tolerogênicas [STEINBRINK *et al.*, 1997].

A ligação de CD2/CD58 desempenha um papel importante na interação de células T e NK com DCs e na iniciação da resposta imune inata e adaptativa. A interferência na ligação de CD2 à CD58 leva ao decréscimo da proliferação de células T CD4 *naive*. As DCs obtidas diretamente do sangue periférico (DCs primárias) exibem CD2 na superfície. A ativação das DCs desencadeada por anticorpos monoclonais específicos para CD2, resulta em aumento significativo da expressão de MHC de classe II, de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80 e CD86), de moléculas de adesão (CD54 e CD58) e de CCR7. Entretanto, pouca ou nenhuma dessas mudanças foram observadas em DCs maturadas *in vitro* pela ação de GM-CSF/IL4 e TNF α , células que já apresentam expressão máxima dessas moléculas. Entretanto, ambos os tipos de DCs liberam IL-1 β e IL-12 após ligação de CD2 [CRAWFORD *et al.* 2003].

MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

A ocorrência de vários marcadores de superfície celular tem sido demonstrada em DCs, muito embora existam poucos marcadores específicos dessas células. Entre os marcadores específicos de DCs de camundongos destaca-se o antígeno 33D1, reconhecido por um anticorpo monoclonal de mesma designação. Esse anticorpo marca cerca de 18,5 a 35,5% da fração

enriquecida com DCs obtidas de baço de camundongos [NUSSENZWEIG *et al.*, 1982; CROWLEY *et al.*, 1989].

Os marcadores CD80 e CD86 (B7.1 e B7.2) são considerados marcadores de ativação de APCs. Entretanto, VINEY *et al.* [1998] sugeriram que após a interação do receptor CTLA4 de alta afinidade de células T *naive* com os receptores CD80/86 pouco expressos em DCs, os linfócitos T liberariam estímulos capazes de provocar o aumento de expressão da molécula CD80/86 em APCs. A ligação de um grande número de moléculas CD80/86 a receptores CTLA4 do linfócito, ao invés da interação com CD28, induziria a tolerização da célula T. A baixa expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs, como B7.2, leva a tolerância, neste caso, especificamente devido a supressão de respostas Th2 [LIU *et al.*, 1999].

Estudos realizados com DCs obtidas do trato gastrointestinal de camundongos mostram que essas APCs expressam CD80/86 em níveis suficientes para apresentar antígenos de uma forma tolerogênica a linfócitos T locais [VINEY *et al.*, 1998]. Entretanto, a natureza das APCs ou os eventos indutores envolvidos na tolerância oral ainda não estão bem definidos.

O MODELO TRANSGÊNICO DO11.10

Algumas linhagens transgênicas foram geradas para estudar os mecanismos envolvidos na tolerância central. Dentre elas inclui-se a linhagem denominada DO11.10, constituída por camundongos com *background* BALB/c portando um transgene para as cadeias α e β de um TCR que reconhece o peptídeo 323-339 da ovalbumina (OVA), apresentado pelo MHC II-IA^d. Os linfócitos que expressam tal TCR podem ser rastreados pela reação com um anticorpo monoclonal específico (KJ 1-26) para esse clone de linfócitos T [MURPHY *et al.*, 1990].

Os camundongos DO11.10 também são muito utilizados em estudos de tolerância oral a OVA. Neles tem-se observado que a ingestão de OVA nativa ou do peptídeo OVA 323-339 provoca redução da proliferação de célula T e da secreção de citocinas [MARTH *et al.*, 1996; VAN HOUTEN & BLAKE, 1996; WU *et al.*, 1998; MARTH *et al.*, 2000; THORSTENSON & KHORUTS, 2001; ZHANG *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2003].

Diversos estudos que utilizam a transferência adotiva de células T TCR-OVA específicas de camundongos DO11.10 buscam investigar a localização e a quantidade de linfócitos T presentes em diferentes órgãos e tecidos linfóides após a administração do antígeno por via oral. Relata-se que a administração oral do antígeno é seguida de acúmulo de células T nos linfonodos periféricos, locais e mesentéricos, nas placas de Peyer e na lâmina própria [SUN *et al.*, 1999, SMITH *et al.*, 2002-A, SMITH *et al.*, 2002-B]. Entretanto, os animais receptores das células T dos camundongos DO11.10 apresentaram uma menor quantidade de células T em divisão após a ingestão de OVA do que após a imunização por via parenteral [SMITH *et al.*, 2002-B]. Além disso, após a ingestão de OVA, os animais receptores não foram capazes de estimular os linfócitos B a secretarem anticorpos. Entretanto, pouco é sabido sobre produção *in vivo* de anticorpos nos camundongos DO11.10 após a ingestão de OVA.

O ENVELHECIMENTO E A SUSCEPTIBILIDADE À TOLERÂNCIA

Alguns estudos têm mostrado que o envelhecimento afeta a susceptibilidade à indução de tolerância oral. Em modelos experimentais murinos, animais das faixas etárias mais avançadas têm se mostrado menos susceptíveis a indução de tolerância pela administração oral de ovalbumina do que animais mais jovens [FARIA *et al.*, 1998-A; FARIA *et al.*, 1998-B; WABAYASHI *et al.*,

1999]. LAHMANN *et al.* [1992] mostraram que, além da idade, a susceptibilidade à indução de tolerância a proteínas administradas por via oral é dependente do *background* genético dos animais experimentais. Esses autores mostraram também que a transferência adotiva de células esplênicas de animais jovens de linhagem susceptível à tolerância oral induzida pela OVA é capaz de restituir essa característica aos camundongos velhos ou de linhagem refratária à tolerização.

WAKABAYASHI *et al.* [1999] relataram ainda que camundongos C57BL/6 velhos eram menos susceptíveis do que os jovens à indução de tolerância a hemácias de carneiro, administradas tanto pela via oral como pela via intraperitoneal.

O envelhecimento também acarreta um declínio da imunidade a antígenos introduzidos por via parenteral. Nesse sentido, nós e outros autores temos verificado que camundongos velhos são menos susceptíveis à imunização por via parenteral, associada a adjuvantes, do que camundongos jovens [CALLARD & BASTEN, 1978; KISHIMOTO *et al.*, 1976; SEGRE & SEGRE, 1976A e SEGRE & SEGRE, 1976B, UCELLI, 1998]. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelas alterações observadas no sistema imune de camundongos velhos são pouco conhecidos. Com base nas deficiências observadas nos camundongos idosos, tanto na imunização como na tolerização, pode-se sugerir que os defeitos estejam no processamento e/ou apresentação antigênica pelas células dendríticas (DCs).

Desta forma, era de nosso interesse investigar os efeitos de diferentes regimes de ingestão de OVA na resposta imune humoral de camundongos DO11.10 e de camundongos BALB/c com o avanço da idade, observando os níveis de anticorpos no soro de camundongos jovens, adultos e idosos de ambas as linhagens. Além disso, também nos interessava investigar a capacidade de DCs de camundongos tolerantes e não-tolerantes de estimular a proliferação de células T *naive*, assim como a secreção de citocinas.

II – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O objetivo do presente trabalho foi avançar no entendimento da tolerância periférica, induzida pela administração oral de antígeno em camundongos e estudar o papel das células dendríticas nesse processo.

O trabalho teve como objetivos específicos:

- Analisar a resposta imune humoral em camundongos jovens da linhagem BALB/c e da linhagem transgênica DO.11.10, submetidos à diferentes protocolos de ingestão de ovalbumina, voluntária ou forçada, seguido pelo desafio antigênico com o mesmo antígeno, por via imunizante, visando determinar o melhor protocolo de indução de tolerância.

- Analisar a resposta humoral de camundongos BALB/c e transgênicos DO.11.10, jovens (entre 4 e 12 semanas de idade), adultos jovens (16 a 24 semanas de idade), de meia idade (32 a 48 semanas de idade) e idosos (acima de 60 semanas) tratados oralmente com OVA, através um protocolo previamente estabelecido como tolerogênico para camundongos BALB/c jovens.

- Observar os efeitos da transferência adotiva de células *naive* de camundongos BALB/c jovens para os camundongos tratados oralmente com OVA.

- Analisar a expressão dos marcadores de ativação celular CD80/86 na superfície de DCs isoladas de camundongos tratados oralmente com OVA, e seus controles, através de ensaios de citometria de fluxo.

- Analisar a função apresentadora de antígenos de células dendríticas isoladas de camundongos tratados oralmente com OVA, e seus controles, através de ensaios de proliferação de células T *naive*.

- Verificar a produção das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ e TGF- β , nos sobrenadantes das co-culturas de linfócitos T *naive* e DCs obtidas dos camundongos que ingeriram ou não a OVA e seus controles.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

As matrizes dos camundongos transgênicos DO11.10, com *background* genético de BALB/c, cujos linfócitos T portam o TCR específico para OVA de camundongos C57BL/6 [MURPHY *et al.*, 1990], e camundongos isogênicos BALB/c foram obtidas do Laboratório Jackson (Bar Harbor, Maine, EUA). Estes camundongos BALB/c e transgênicos DO11.10, assim como camundongos C57BL/6, machos e fêmeas, com quatro semanas de idades, foram fornecidos pelo CEMIB (Centro de Investigações Biológicas da UNICAMP, Campinas, SP). Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, em ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados, em isoladores [TREXLER, 1959], com água e ração autoclavados em livre demanda, até o momento dos ensaios.

Os grupos utilizados nas experimentações foram constituídos por um número mínimo de cinco camundongos. Para análises e discussões futuras, foi realizada uma classificação dos camundongos em função da idade, sendo essa: camundongos jovens (4 a 8 semanas), adultos jovens (16 a 24 semanas), de meia idade (32 a 48 semanas) e velhos (60 a 72 semanas).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (Processo no. 594-1- Anexo 1).

2. REAGENTES

Soro albumina bovina do tipo V (BSA), solução a 35%, e ovalbumina do tipo VI (OVA, Conalbumina) foram adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A ovalbumina para tolerância oral foi adquirida da Rhoster (Comércio e Indústria Rhoster. Ltda., Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). Os anticorpos de coelho anti-camundongo e anticorpos Ig de carneiro anti-coelho foram preparados e conjugados com peroxidase tipo IV (HRPO, Sigma) em nosso laboratório.

3. INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL

Para a indução de tolerância oral, concentrações diferentes de OVA (Rhoster) foram adicionadas à água de beber oferecida aos camundongos BALB/c e DO11.10, sendo essa sua única fonte de bebida durante períodos variáveis de tempo [FARIA, 1998-B]. Foram utilizadas doses diárias totais de OVA de: 5 e 20 mg, administradas por 7 dias, 0,5 mg, administrada por 14 dias e 10mg, administrada por 30 dias. Os camundongos controle receberam apenas água. Sete dias após a interrupção do tratamento oral, todos os camundongos foram desafiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 µg do antígeno OVA emulsionado em 1 mg de hidróxido de alumínio em 1,0 mL de solução salina (NaCl 0,15M). Quatorze dias após a administração da primeira dose, os camundongos receberam uma dose de reforço de 10 µg do antígeno em solução salina. Os camundongos foram sangrados pelo plexo retro-orbital sete dias após da administração

da última dose de ovalbumina i.p. e os soros assim obtidos foram empregados para dosagem de anticorpos [LAHMANN *et al.*, 1992; FARIA *et al.*, 1998-B; VERDOLIN *et al.*, 2001].

No protocolo de indução de tolerância por gavagem, camundongos BALB/c e DO11.10 de oito semanas de idade receberam 1 mL de solução de OVA (0,05; 0,5 ou 5 mg/mL) por gavagem, durante 14 dias consecutivos. Os camundongos do grupo controle receberam solução salina (NaCl 0,15N) por gavagem. Em seguida, todos os camundongos receberam desafio com o antígeno por via i.p. e foi realizada a coleta de soro, como acima descrito.

4. ENSAIO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA OVA

Os níveis de anticorpos anti-OVA foram determinados por ELISA, utilizando-se leitor automático de placas de ELISA (Multiskan II, MS, Labsystem, Helsinki, Finland). Placas de ELISA (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) foram sensibilizadas com 50µL de uma solução de OVA (Sigma) a 20µg/mL (em tampão carbonato/bicarbonato de sódio, pH 9,6) e mantidas por 1 hora à 37°C e, em seguida, por 18 horas à 4°C. Após a incubação, os poços foram lavados com solução salina tamponada (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Em seguida, os sítios livres de reação foram bloqueados pela adição de PBS contendo 5% de leite desnatado (Nestlé) e as placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C.

Após novo ciclo de três lavagens, as amostras de soros de camundongos imunizados, tratados ou não tratados com OVA, foram adicionadas aos poços da placa, em diluições seriadas de 1/100 a 1/12.800. Após mais um ciclo de lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de camundongo conjugada com peroxidase (HRPO) (275 ng/mL). Sessenta minutos mais tarde, os reagentes foram removidos por lavagem e

a reação foi revelada pela adição do 50 µl substrato/cromógeno, (H₂O₂ 0,03% (Merck) e ortofenilenodiamina 0,04% (OPD) (Sigma), em tampão ácido cítrico/fosfato di-sódio, pH 5,5). Após 30 minutos no escuro, 25 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N foram adicionados aos poços da placa, para o bloqueio das reações.

As absorbâncias foram obtidas através de leitura em espectrofotômetro, a 492nm. Os valores dos ELISA foram calculados através das somas das densidades ópticas obtidas em cada ponto das diluições dos soros (1:100 até 1:12.800) dos camundongos, e foram expressos como a média e erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental. A análise estatística detalhada demonstrou que essa forma de representação foi significativamente mais confiável que dados baseados em um único valor, seja esse ponto ou título [CARVALHO *et al.*, 1994; FARIA *et al.*, 1998-A; FARIA *et al.*, 1998-B; VERDOLIN *et al.*, 2001; FARIA *et al.*, 2003].

5. ENSAIO DE DETECÇÃO DAS SUBCLASSES IgG1 E IgG2A DOS ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA OVA

Para determinar as subclasses de anticorpos específicos para OVA, contidos nos soros de camundongos tratados com OVA via oral, após a adição das amostras de soro dos camundongos, as placas de 96 poços foram incubadas com anticorpos anti-IgG1 de camundongo ou anti-IgG2a de camundongo, produzidos em coelho (Isotyping Kit, Pierce, Rockford, IL, USA). Em seguida, foi realizado novo ciclo de incubação por 1 hora a 37°C. Após as lavagens com PBS-T, foi adicionada a cada poço imunoglobulina de carneiro anti-imunoglobulina de coelho conjugada com HRPO (250 ng/mL). A reação foi revelada como descrito no item 4.

6. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA

A transferência de células de baço de camundongos BALB/c *naive* foi realizada segundo descrição de LAHMANN *et al* [1992], com modificações. Em resumo, células esplênicas foram coletadas de três camundongos BALB/c *naive*, reunidas em um *pool* e em seguida, 2×10^6 células foram injetadas pelo plexo retro-orbital de camundongos tolerantes ou não tolerantes à OVA, duas semanas após o último desafio i.p. com o antígeno. As injeções de células foram repetidas duas vezes, em dias alternados. Três dias após a última injeção, camundongos tolerantes foram novamente desafiados com OVA por via i.p., como acima descrito, e camundongos não-tolerantes foram submetidos a um novo protocolo de indução de tolerância, seguido pelo desafio i.p. com o antígeno. Os níveis de anticorpos nos soros dos camundongos foram testados por ELISA como descrito no item 4.

7. ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T ANTÍGENO ESPECÍFICAS

Para os ensaios de ativação de células T antígeno-específicas por células dendríticas de camundongos, tratados ou não com OVA por via oral, e desafiados com o antígeno pela via i.p., foi necessária a obtenção de frações celulares enriquecidas com células dendríticas e com células T.

7.1- ENRIQUECIMENTO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Baços de camundongos das faixas etárias selecionadas, que ingeriram ou não OVA, foram utilizados para a obtenção das DCs [HUNT, 1987; , LEVIN *et al.*, 1993; NUNEZ, 1999]. Foi realizada a separação dessa fração celular de baixa densidade, através da centrifugação em gradiente de BSA (Albumina Bovina, solução 35%, Sigma) e através da propriedade dessas células de aderir ao suporte de cultivo nas primeiras horas de incubação e soltar-se espontaneamente após períodos mais extensos de cultura. [STEINMAN *et al.*, 1983; HUNT, 1987]. Brevemente: Os baços dos camundongos foram removidos e incubados em meio HBSS livre de cálcio e magnésio, contendo 1 mg/mL de colagenase (tipo IA – Sigma), por 20 minutos, à 4°C. Em seguida, os baços foram homogeneizados com auxílio de uma peneira e as suspensões celulares foram lavadas duas vezes por centrifugação à 200g por 10 min. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em uma solução de BSA, cuja densidade foi ajustada para 1,08 g/mL, e centrifugados por 40 minutos a 250g, à 4°C. As células da interface, sobre a camada de BSA, foram coletadas, lavadas, ressuspensas em meio de RPMI com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), e colocadas em cultura, para adesão a superfície plástica, por 90 minutos, à 37°C. Após remoção das células não aderentes, a cultura foi mantida por 18 horas à 37°C, na presença de OVA (Conalbumina, 500µg/mL, Sigma), em estufa com 5% de CO₂. As DCs se desprendem espontaneamente após esse período de cultura. O enriquecimento foi acompanhado por ensaio de fluorescência em citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) localizado no Hemocentro da UNICAMP, usando os seguintes marcadores celulares: clone 33D1 (anticorpo anti-células dendríticas de baço de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC), Leinco Technologies, Inc., St. Louis, MO,

USA); clone-HL-3 (anticorpo anti-CD11c de camundongo conjugado com ficoeritrina (PE); PharMingen, BD PharMingen, San Diego, CA, USA); clone TIB229 (anti-MHC de classe II conjugado com FITC, preparado em nosso laboratório); e clone NLDC-145 (anti-CD205 de camundongo conjugado com FITC; Diagnostics Inc, Flanders, NJ, USA). [STEINMAN *et al.*, 1983; VINEY *et al.*, 1998; CROWLEY, *et al.*, 1989; METLAY, *et al.*, 1990; SCHULER *et al.*, 1999; STEINMAN *et al.*, 2003]. A amplificação e compensação ótimas foram determinadas pelo exame de células não marcadas e as análises foram realizadas através do software Cell Quest (Becton-Dickinson) [MANSON *et al.*, 1987]. Preparações enriquecidas de DCs contiveram aproximadamente 80% de células expressando o marcador de classe II MHC, 60% expressando o marcador CD11c, 30% expressando o marcador 33D1 e 13% expressando o marcador CD205.

Os anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície de DCs murinas, CD80 (clone 16-10A1) e CD86 (clone GL1), ligados a fluoresceína (PharMingen, BD PharMingen), foram utilizados para analisar a ativação dessa população celular.

Preparações de células esplênicas obtidas dos camundongos DO11.10 que ingeriram OVA e seus controles foram analisadas por citometria de fluxo, após a lise de hemácias, empregando-se os anticorpos anti-CD3- FITC (clone 145-2C11), anti-CD4-FITC (clone GK1.5) e anti-DO11.10-PE (clone KJ1-26).

7.2- ENRIQUECIMENTO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T

Os baços de camundongos BALB/c ou transgênicos DO11.10, de oito semanas de idade, foram utilizados para obtenção de células T *naive*, por separação em lâ de nylon [HENRY *et al.*, 1980]. Brevemente, os baços foram removidos em condições assépticas e, após lise de hemácias,

1×10^8 células esplênicas foram adicionadas à coluna contendo lã de nylon, previamente equilibrada com RPMI. Células B, células plasmáticas e células acessórias aderem preferencialmente à lã de nylon, enquanto muitas células T passam livremente através da coluna. Após incubação por 30 minutos à 37°C , as colunas foram lavadas com 20mL de meio RPMI para coleta da fração contendo células T. O processo de enriquecimento de célula foi acompanhado por ensaio de fluorescência em citômetro de fluxo [MANSON *et al.*, 1987], usando os anticorpos anti-CD3-FITC/PE (clone 145-2C11), anti-DO11.10-PE (clone KJ1-26) e anti-CD4-FITC (clone GK1.5) (PharMingen, Diego de São, CA, USA). As suspensões celulares obtidas contiveram aproximadamente 75% de células expressando o marcador CD3 e 50% expressando CD4. Oitenta a noventa por cento das células CD4^+ obtidas de camundongos *naive* DO11.10 expressaram o marcador KJ1-26.

7.3. ENSAIO DE ATIVAÇÃO ANTÍGENO-ESPECÍFICA DE CÉLULAS T

Os ensaios de proliferação de células T foram executados como descrito previamente [HUNT *et al.*, 1987; LEVIN *et al.*, 1993; NUNEZ, 1999], com modificações. As frações enriquecidas com células T, obtidas como acima descrito, foram adicionadas a placas de 96 poços (Corning) na concentração de 5×10^5 células T por poço em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP). As células T foram co-cultivadas com frações enriquecidas de células dendríticas obtidas de camundongos que ingeriram ou não OVA, na quantidade de 2×10^4 células por poço, na presença de antígeno (Conalbumina, $1.000 \mu\text{g/ml}$, Sigma, USA). Após quatro dias de incubação, à 37°C e em atmosfera de CO_2 , os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -80°C para dosagem de citocinas. A proliferação celular foi acompanhada através da adição do

corante 4,5-(Dimetil-2 tiazolil)-2,5difeníl-2H-brometo de tetrazolio (MTT; 5mg/mL, 10µl por poço) às culturas. Após quatro horas de incubação, os cristais de formazan precipitados nas células viáveis que incorporaram o MTT foram solubilizados pela adição de álcool isopropílico acidificado (0,04N), seguindo-se a leitura das placas em espectrofotômetro, à 540 nm. Todos os testes foram conduzidos em sextuplicata.

8. DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ ; foram medidos, através de anticorpos e reagentes para ELISA (ELISA sets, PharMingen), em sobrenadantes de cultura de células T co-cultivadas com células dendríticas.

Par a sensibilização das placas de 96 poços (Falcon), foram utilizados 100µL de cada solução de anticorpo de captura e de anticorpo de detecção, nas diluições recomendadas pelo fabricante. As curvas padrão para o ensaio de IL-2, variaram de 3,125 pg/mL até 200 pg/mL, para IL-4, de 7,8125 pg/mL até 500 pg/mL , para IL-10, de 31,25 pg/mL até 2.000 pg/mL e, para IFN- γ , de 31,25 pg/mL até 2.000 pg/mL.

Os ensaios para detecção de IL-1- α e TGF- β em sobrenadantes de cultura foram realizados através de kits específicos de ELISA (PharMingen). Foram utilizados 100µL de cada solução de anticorpo de detecção. Concentrações de IL-1 α variando de 4,69 pg/mL a 300 pg/mL e de TGF- β , variando de 31,25 pg/mL a 2.000 pg/mL foram detectadas. Todos os procedimentos foram realizados seguindo-se as indicações descritas pelo fabricante.

Para todos os ensaios de detecção de citocinas, cem microlitros de cada sobrenadante a ser dosado, obtido após 96 h de cultura, foram utilizados em triplicata. As absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o comprimento de 540nm para correção (Multiskan II, MS, Labsystem, Helsinki, Finland). As concentrações das citocinas nas amostras testadas foram calculadas através da equação da reta, obtida com os dados da curva-padrão.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados obtidos foi realizada através do teste de t de Student bi-caudal para as comparações entre os grupos. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

IV – RESULTADOS

1. OS EFEITOS DA INGESTÃO DE OVA SOBRE A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS EM CAMUNDONGOS

Buscando estabelecer um protocolo experimental capaz de induzir um estado duradouro de tolerância sistêmica à ovalbumina (OVA), camundongos jovens (oito semanas de idade) da linhagem BALB/c, normais ou transgênicos DO11.10, receberam doses variadas da proteína misturada na água de beber (ingestão voluntária) ou por gavagem (ingestão forçada), por diferentes períodos. Os animais foram, então, desafiados com o mesmo antígeno por via i.p. A eficiência dos protocolos de ingestão voluntária ou forçada de OVA foi avaliada pela redução da produção de anticorpos específicos nos soros dos camundongos tratados com a proteína por via oral, em comparação com os controles imunizados.

Os resultados dos ensaios de indução de tolerância por ingestão voluntária estão mostrados em Figura 1. Os camundongos BALB/c e DO11.10 receberam OVA adicionada à água de beber, nas seguintes quantidades: 0,5 mg por dia, por 14 dias; 5 mg ou 20 mg por dia, por 7 dias e 10 mg por dia, por 30 dias.

Os camundongos BALB/c que foram continuamente alimentados com OVA tornaram-se tolerantes ao antígeno, em quaisquer das doses orais utilizadas, com níveis séricos de anticorpos significativamente menores do que os encontrados nos camundongos do grupo que recebeu OVA i.p. (Painel A).

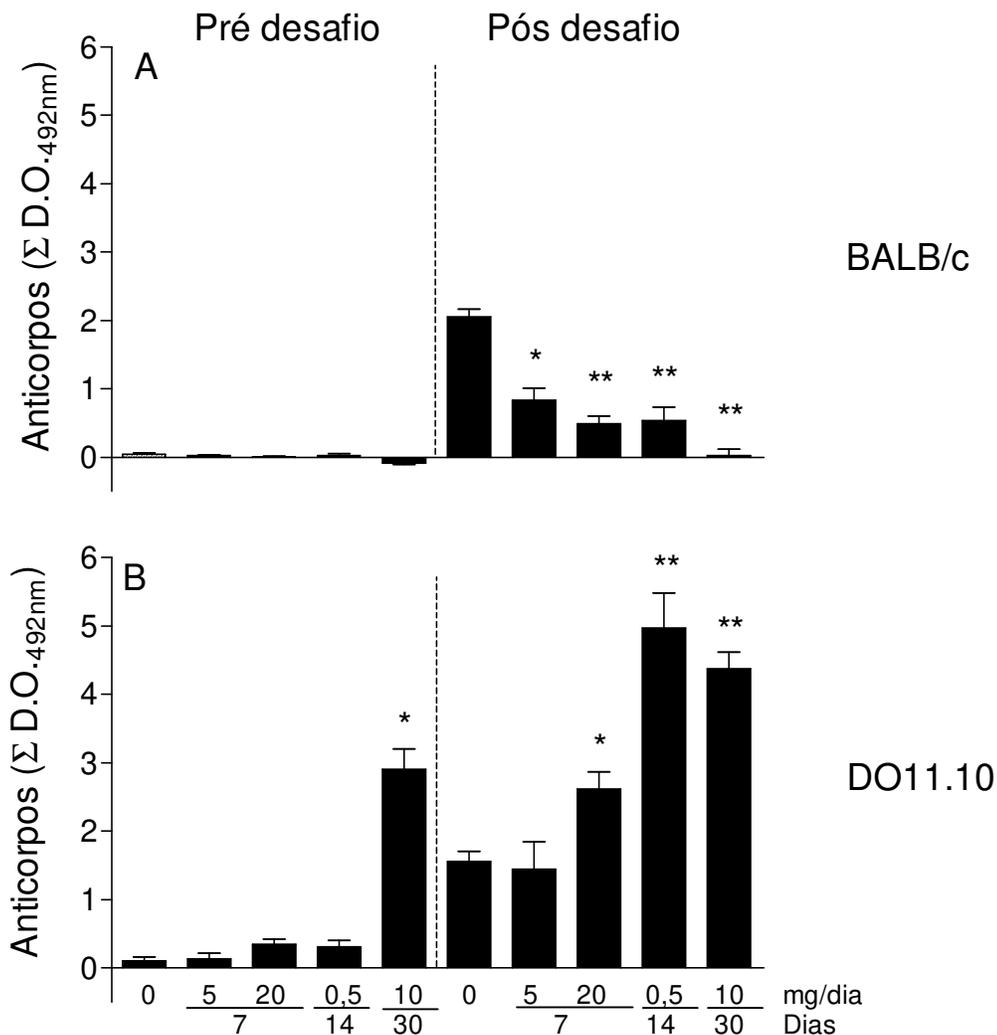


Figura 1: Efeito da ingestão voluntária de OVA sobre a produção de anticorpos em camundongos BALB/c e DO11.10. As barras sólidas representam os níveis de anticorpos específicos nos soros de camundongos BALB/c (Painel A) e transgênicos DO11.10 (Painel B), de oito semanas de idade, após a ingestão voluntária de OVA, nas seguintes quantidades: 0,5 mg por dia, por 14 dias; 5 mg ou 20 mg por dia, por 7 dias; 10 mg por dia, por 30 dias. Os camundongos do grupo controle consumiram apenas água livre de proteínas (barras achuriadas). Uma semana após a interrupção da administração oral de OVA, os soros dos camundongos de todos os grupos experimentais foram coletados individualmente e os camundongos foram desafiados com OVA por via i.p. (duas doses). Sete dias após o último desafio antigênico, os camundongos foram sangrados e os níveis de anticorpos específicos nos soros imunes e pré-imunes foram medidos por ELISA. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da somatória das densidades ópticas (D.O.) encontradas quando os soros foram diluídos de 1:100 até 1:12.800. Cada grupo foi constituído por 5 camundongos e os dados apresentados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

Camundongos transgênicos DO11.10 submetidos aos mesmos tratamentos, ao serem desafiados com OVA i.p., apresentaram níveis altos de anticorpos anti-OVA em seus soros (Painel B), indicando que a ingestão de OVA imunizou os animais, ao invés de tolerizá-los, como observado nos camundongos BALB/c não transgênicos. Observou-se ainda que, antes do desafio, já eram detectados anticorpos específicos nos soros dos camundongos DO11.10 que receberam a proteína por via oral, fato não verificado nos camundongos BALB/c (Painel B, lado esquerdo).

Dentre os camundongos BALB/c que receberam o antígeno por gavagem, ingerindo diferentes doses de OVA por 14 dias, tornaram-se tolerantes apenas os que receberam a dose mais elevada de OVA (5mg ao dia) (Figura 2, Painel A). Já os camundongos da linhagem DO11.10 não se tornaram tolerantes ao antígeno administrado por gavagem, independentemente da dose administrada (Figura 2, Painel B).

2. A MANUTENÇÃO DA TOLERÂNCIA EM CAMUNDONGOS BALB/c E C57BL/6

Uma vez que a ingestão voluntária de OVA foi eficaz em induzir a tolerância oral em camundongos BALB/c (H2-K^d) jovens, o mesmo tratamento foi usado para acompanhar, ao longo do tempo, a tolerância estabelecida em camundongos dessa linhagem. A indução e manutenção da tolerância também foi analisada em camundongos C57BL/6, de haplótipo H2-K^b.

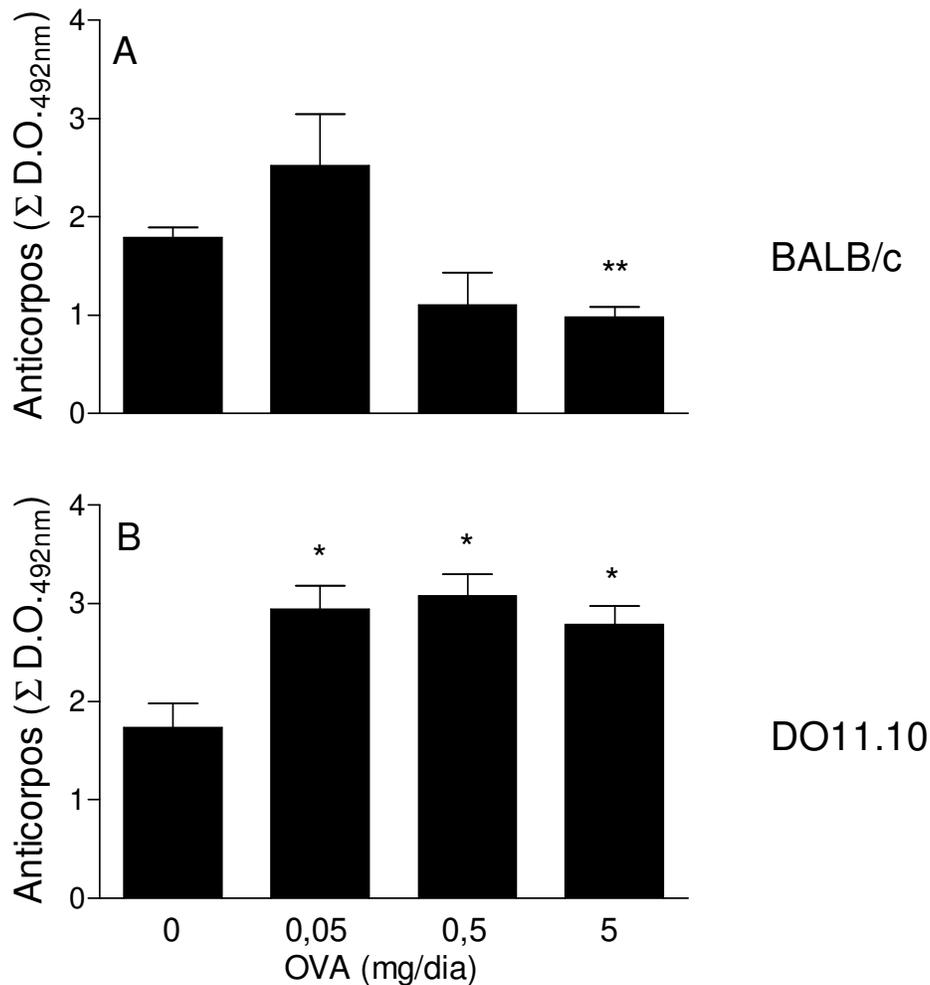


Figura 2: Efeito da gavagem com OVA sobre a produção de anticorpos em camundongos BALB/c e DO11.10. As barras representam os níveis de anticorpos específicos, medidos por ELISA, nos soros de camundongos BALB/c (Painel A) e transgênicos DO11.10 (Painel B), de oito semanas de idade, após a ingestão forçada de OVA (barras sólidas), nas quantidades de 0,05 mg, 0,5 mg ou 5 mg por dia, por 14 dias. As barras achuriadas representam os níveis de anticorpos nos soros de camundongos que receberam apenas salina por gavagem. Os camundongos de todos os grupos representados foram desafiados com OVA (duas doses) por via i.p. e os soros foram coletados para a determinação dos níveis de anticorpos sete dias após o desafio antigênico. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da somatória das densidades ópticas (D.O.) encontradas quando os soros foram diluídos de 1:100 até 1:12.800. Cada grupo foi constituído por 5 camundongos e os dados apresentados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

Camundongos das duas linhagens foram tratados oralmente com OVA diluída na água de beber, na concentração de 4 mg/mL, durante sete dias consecutivos, presumindo-se uma ingestão total de cerca de 140 mg de OVA por animal. Sete dias após a interrupção do tratamento oral, todos os camundongos foram imunizados com OVA por via i.p., incluindo os camundongos controle de cada linhagem que não ingeriram OVA. Para o seguimento da produção de anticorpos específicos, os soros desses camundongos foram coletados vinte e um dias após o primeiro desafio antigênico e em outras duas ocasiões, isto é, na 26^a e na 44^a semana após a primeira dose i.p. do antígeno, sempre precedidas de um novo desafio antigênico por via intraperitoneal. Os soros foram ensaiados individualmente e a figura 3 resume os resultados obtidos.

Verifica-se que a tolerância induzida em camundongos jovens da linhagem BALB/c (Painel A) foi mantida por um longo período de tempo, correspondente a metade do período estimado de vida desses camundongos. No painel B estão representados os resultados do experimento conduzido com camundongos da linhagem C57BL/6. Da mesma forma que os BALB/c, os C57BL/6 foram tolerizados pela ingestão de OVA e este estado de tolerância também foi mantido por todo o tempo de observação, isto é, até 44 semanas após o primeiro desafio antigênico.

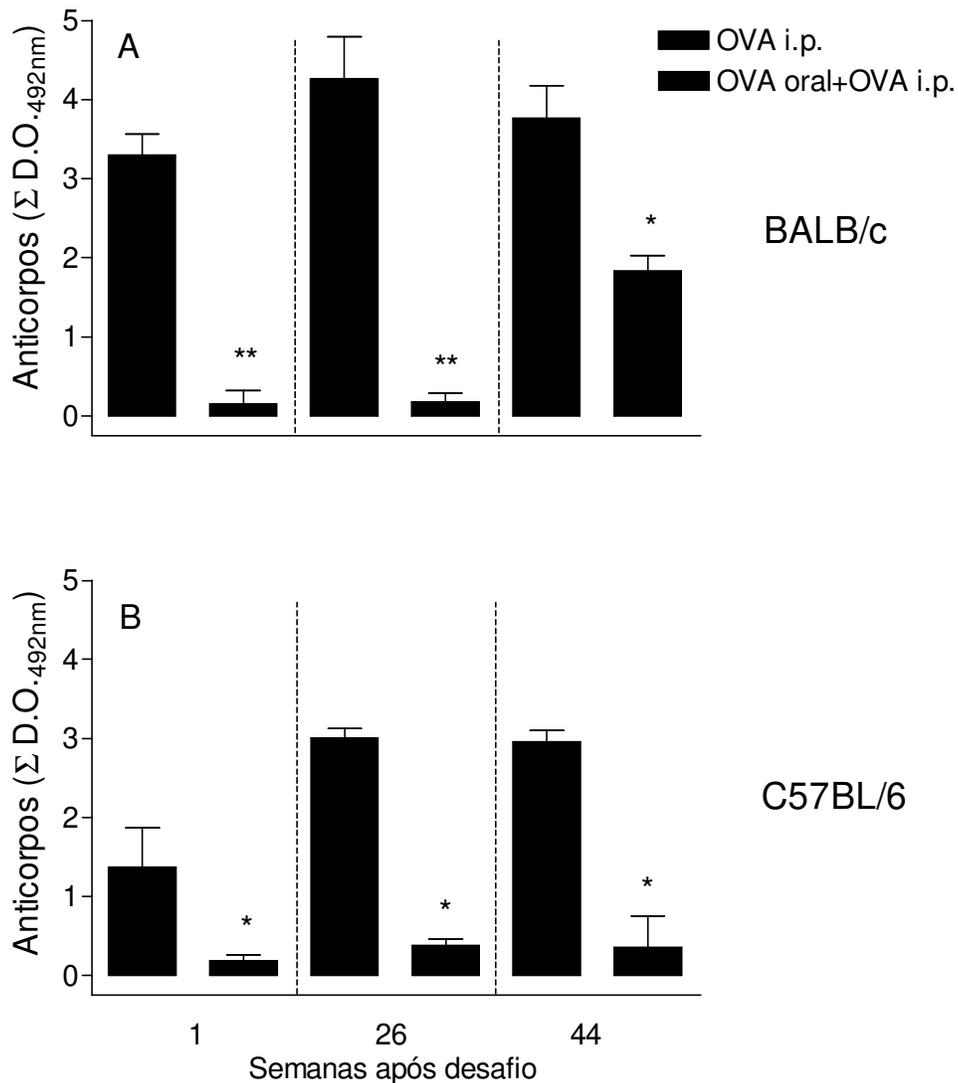


Figura 3: Manutenção de tolerância à OVA induzida em camundongos BALB/c e C57BL/6. As barras representam os níveis de anticorpos específicos nos soros de camundongos BALB/c (Painel A) e C57BL/6 (Painel B), de oito semanas de idade no início do experimento, após ingestão (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) de uma solução de OVA (4 mg/mL), por sete dias consecutivos. Uma semana após a interrupção da administração oral de OVA, todos os camundongos foram desafiados com a proteína por via i.p. Duas, vinte e cinco e quarenta e três semanas após a primeira injeção i.p., os camundongos receberam novo desafio antigênico pela mesma via. Uma semana após cada desafio i.p., os camundongos foram sangrados e os níveis de anticorpos específicos nos soros imunes foram medidos por ELISA. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da somatória das densidades ópticas (D.O.) encontradas quando os soros foram diluídos de 1:100 até 1:12.800. Cada grupo foi constituído por 5 camundongos e os dados apresentados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

3. EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE OVA E DA TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS A CAMUNDONGOS BALB/c E TRANSGÊNICOS DO 11.10 DE IDADE AVANÇADA

Avaliou-se o efeito de ingestão de OVA na resposta imune de camundongos da linhagem BALB/c de distintas faixas etárias. Camundongos com 20, 40 e 60 semanas de idade foram tratados oralmente com OVA (4 mg/mL, por 7 sete dias) e desafiados por via intraperitoneal com OVA e hidróxido de alumínio. O soros foram coletados uma semana após o desafio e ensaiados para a detecção de anticorpos específicos por ELISA indireto.

A figura 4 mostra que os camundongos BALB/c do grupo controle de cada uma das idades avaliadas, imunizados apenas por via i.p., responderam à OVA produzindo anticorpos séricos em níveis significativamente mais elevados que os encontrados no soro pré-imune (dados não mostrados). Com o avanço da idade, houve um significativo declínio da capacidade de resposta ao desafio antigênico. Apesar disso, foi possível verificar que os camundongos dos grupos pré-tratados oralmente com OVA tornaram-se tolerantes à proteína, produzindo níveis ainda mais reduzidos de anticorpos séricos específicos.

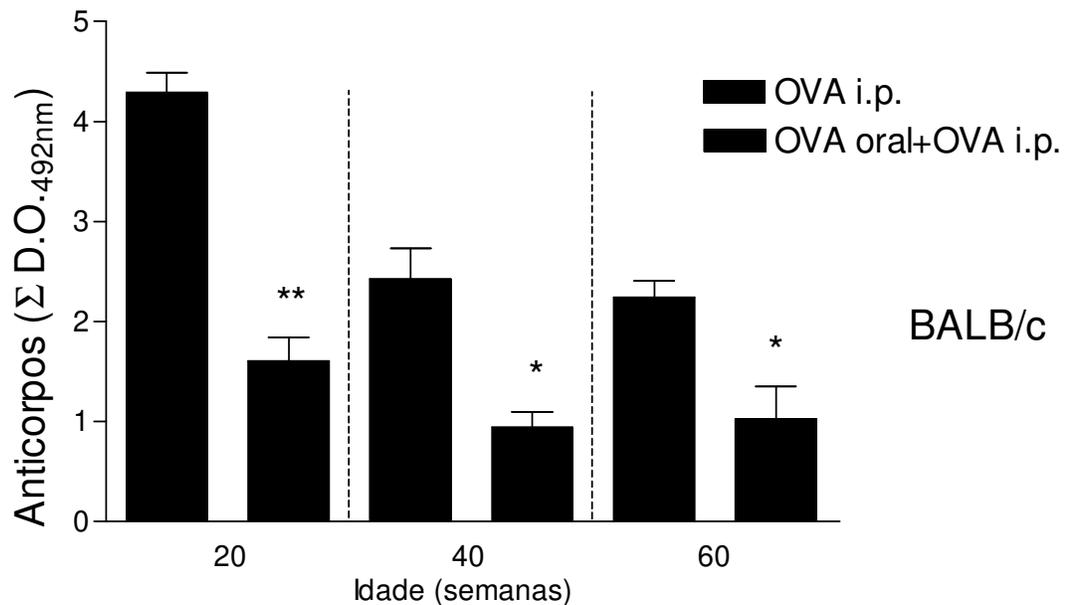


Figura 4: Efeito da ingestão voluntária de OVA sobre a produção de anticorpos por camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias. Camundongos BALB/c de 20, 40 e 60 semanas de idade foram utilizados nos ensaios de indução de tolerância. As barras representam os níveis de anticorpos específicos nos soros de camundongos que ingeriram (barras sólidas) ou não ingeriram (barras achuriadas) uma solução de OVA (4 mg/mL) por sete dias consecutivos. Os camundongos de todos os grupos representados foram desafiados com OVA (duas doses) por via i.p. e os níveis de anticorpos nos soros, coletados sete dias após o último desafio antigênico, foram medidos por ELISA. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da somatória das densidades ópticas (D.O.) encontradas quando os soros foram diluídos de 1:100 até 1:12.800. Cada grupo foi constituído por 5 camundongos e os dados apresentados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

Em experimento subsequente, a produção de anticorpos específicos foi comparada em camundongos BALB/c e DO11.10 de 8, 36 e 72 semanas de idade. Os animais foram tratados oralmente com OVA 4 mg/mL por 7 sete dias consecutivos e desafiados com o antígeno por via i.p. A Figura 5 mostra que os camundongos BALB/c de todas as idades avaliadas tornaram-se tolerantes à OVA após a ingestão voluntária da proteína (Figura 5A, barras pretas), enquanto que

os camundongos DO11.10 não foram tolerizados (Figura 5B, barras pretas). De fato, a ingestão de OVA por camundongos transgênicos de qualquer das idades testadas resultou em produção aumentada de anticorpos específicos para a OVA. Entre esses animais transgênicos, também se observa uma drástica redução dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA com o envelhecimento, que ocorre tanto nos animais que ingeriram OVA como nos grupos que receberam apenas o desafio i.p. Ainda assim, a ingestão de OVA resultou invariavelmente em indução e não supressão da resposta imune.

Para investigar o efeito de transferência adotiva de linfócitos *naive* em uma resposta imune previamente estabelecida, cada camundongo BALB/c e DO11.10 que havia ingerido a OVA recebeu uma injeção contendo 2×10^6 células esplênicas de camundongos BALB/c jovens, um mês após o último desafio antigênico pela via i.p. As injeções de células esplênicas foram repetidas por mais duas vezes, em dias alternados. Como mostrado na Figura 5, a transferência adotiva de células esplênicas *naive* foi eficiente em abolir a tolerância previamente estabelecida em camundongos BALB/c, uma vez que eles responderam à OVA após uma nova injeção i.p. do antígeno (Figura 5, Painel A, barras brancas). A transferência adotiva não alterou a maneira como camundongos transgênicos respondem a OVA, mesmo após uma segunda tentativa de indução de tolerância por administração oral do antígeno (figura 5, Painel A, barras brancas).

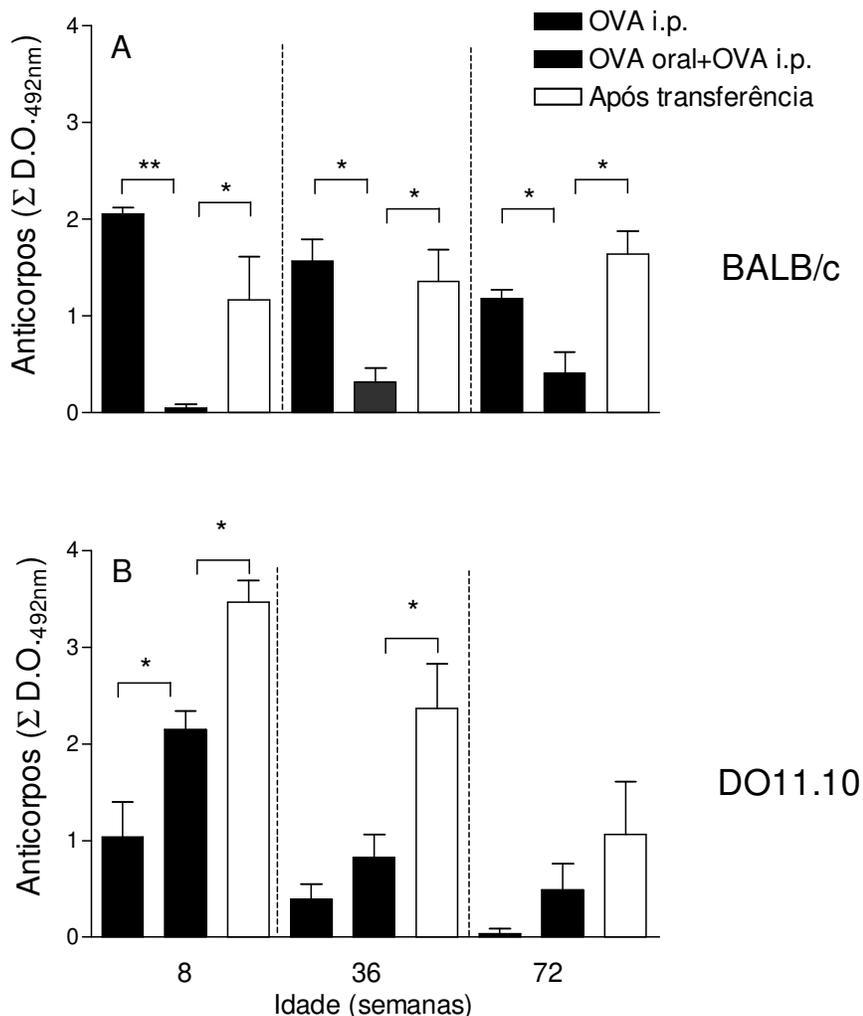


Figura 5: Efeito da transferência adotiva de células esplênicas *naive* de camundongos com o avanço da idade. Painel A: Camundongos BALB/c. Painel B: Camundongos transgênicos DO11.10. Os camundongos tinham 8, 36 e 72 semanas de idade no início dos ensaios. As barras representam os níveis de anticorpos anti-OVA nos soros de camundongos que ingeriram (barras sólidas) ou não ingeriram (barras brancas) uma solução de OVA (4 mg/mL) por sete dias consecutivos. Os camundongos de todos os grupos experimentais foram desafiados com OVA (duas doses) por via i.p. e os níveis de anticorpos nos soros, coletados sete dias após o último desafio antigênico, foram medidos por ELISA. Um mês após o último desafio, os camundongos receberam injeções de 2×10^6 células de baço de camundongos BALB/c jovens, por três dias alternados. Subseqüentemente, camundongos BALB/c foram desafiados com o antígeno por via i.p., e os soros foram coletados sete dias após a segunda dose do antígeno (barras brancas). Os camundongos DO11.10 foram novamente tratados com OVA por via oral e então desafiados com o antígeno por via i.p. e os soros foram coletados sete dias após a segunda dose do antígeno (barras brancas). Os níveis de anticorpos nos soros foram medidos por ELISA. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da somatória das densidades ópticas (D.O.) encontradas quando os soros foram diluídos de 1:100 até 1:12.800. Cada grupo foi constituído por 5 camundongos e os dados apresentados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

4. SUBCLASSES DE IMUNOGLOBULINAS PRODUZIDAS POR CAMUNDONGOS TRATADOS OU NÃO COM OVA

As subclasses de imunoglobulina associadas com os eixos de resposta Th1 e Th2 (IgG2a e IgG1, respectivamente) foram analisadas nos soros dos mesmos camundongos cujos experimentos foram descritos na figura 6. Os anticorpos específicos para OVA da subclasse IgG1 foram encontrados em quantidades significativamente reduzidas nos soros de camundongos BALB/c que haviam ingerido OVA, independentemente da idade (Figura 6, Painel A). Anticorpos específicos da subclasse IgG2a, entretanto, não foram detectados em quaisquer dos grupos de camundongos BALB/c (Figura 6, Painel B). Em camundongos transgênicos DO11.10 jovens e adultos, anticorpos específicos das subclasses IgG1 e IgG2a foram encontrados nos soros de camundongos que consumiram ou não a OVA (Figura 6, painéis C e D). Camundongos transgênicos idosos produziram quantidades detectáveis de anticorpos IgG1, e não IgG2a, específicos para OVA (Figura 6, Painel C).

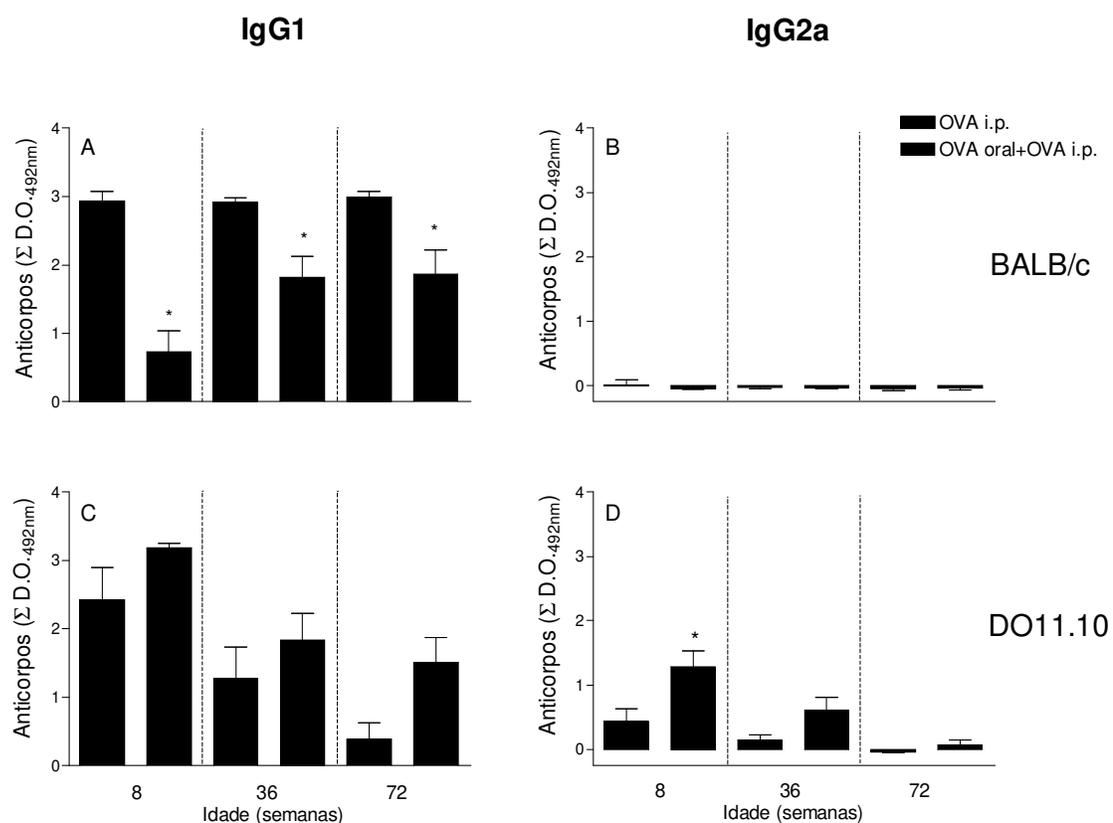


Figura 6: Determinação das subclasses de anticorpos séricos de camundongos BALB/c e transgênicos DO11.10 tratados com OVA pela via oral. Os dados representam os níveis de anticorpos específicos, das subclasses IgG1 (Painéis A e C) e IgG2a (Painéis B e D) nos soros de camundongos de 8, 36 e 72 semanas de idade, que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA (4 mg/mL) por sete dias consecutivos e subseqüentemente desafiados por via i.p. Painéis A e B: Camundongos BALB/c. Painéis C e D: Camundongos transgênicos DO11.10. Os níveis de anticorpos nos soros foram medidos por ELISA. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da somatória das densidades ópticas (D.O.) encontradas quando os soros foram diluídos de 1:100 até 1:12.800. Cada grupo foi constituído por 5 camundongos e os dados apresentados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$).

5. MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS T DE CAMUNDONGOS

DO11.10 TRATADOS COM OVA

Preparações de células esplênicas e sanguíneas de camundongos DO11.10 *naive* e imunizados com OVA por via i.p e/ou via oral foram analisadas por citometria de fluxo para a presença das moléculas CD3, CD4 e o clonotipo KJ1-26. Os resultados desses ensaios estão resumidos na figura 7. Nas preparações de células esplênicas de animais *naive*, cerca de 30% foram marcadas com o anticorpo para o clonotipo KJ1-26. No animal imunizado com OVA por via i.p. (duas doses de 10 µg por animal), a proporção de células definidas pelo anticorpo monoclonal KJ1-26 não se alterou significativamente (25%). Entretanto, é possível observar que a ingestão de OVA (140mg por camundongo) levou à redução significativa de células T CD4⁺ do clonotipo KJ1-26, que passou a representar cerca de 15% do total de células esplênicas. Dados semelhantes foram obtidos nos ensaios realizados com células do sangue periférico. Entre as células esplênicas com fenótipo CD3⁺, a proporção de células marcadas com anti-KJ1-26 caiu de 80% nos camundongos *naive* para 59% nos camundongos tratados oralmente com OVA. O mesmo resultado foi encontrado quando se analisou a proporção de células KJ1-26⁺/ CD4⁺.

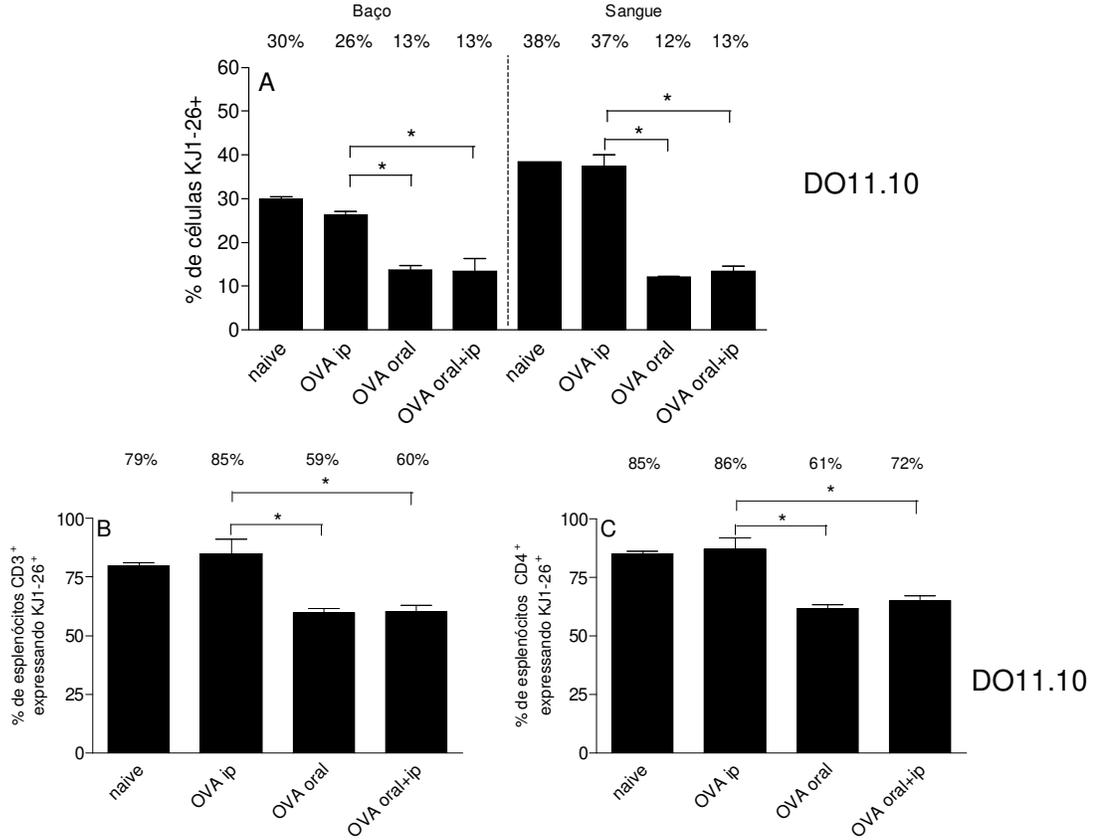


Figura 7: Expressão do marcador de superfície anti clonotipo KJ1-26 nos linfócitos de camundongos DO11.10. A porcentagem de células esplênicas e sanguíneas totais (Painel A), células esplênicas CD3⁺ (Painel B) e células esplênicas CD4⁺ (Painel C) expressando o marcador do TCR-OVA específico foi analisada utilizando-se o anticorpo KJ1-26. As células foram isoladas de camundongos jovens DO11.10 *naive* (naive), que ingeriram OVA (OVA oral), que ingeriram OVA e foram desafiados por via i.p. (OVA oral+OVA i.p.) ou que foram apenas imunizados pela via i.p. (OVA i.p.). As suspensões celulares, livre de hemácias, foram marcadas com os anticorpos específicos KJ1-26-PE, (clone DO11.10) anti-CD3- FITC (clone 145-2C11) e anti CD4 FITC (clone GK1.5) e, em seguida, as proporções foram determinadas através de ensaio de citometria de fluxo. Cada grupo foi constituído por 5 camundongos (* p<0,05).

6. PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T ATIVADOS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS

Nos experimentos descritos a seguir, analisamos a capacidade de células dendríticas, isoladas de camundongos BALB/c normais imunizados, em sustentar a proliferação *in vitro* de células T *naive* antígeno-específicas.

Preparações de células esplênicas enriquecidas em DCs foram obtidas empregando-se dois protocolos de separação. No primeiro, as células esplênicas foram semeadas sobre superfície plástica e incubadas por 90 minutos para adesão. Após a remoção das células não aderentes, as células que permaneceram adsorvidas à superfície do plástico foram incubadas por mais 18 horas para permitir que as DCs se soltassem espontaneamente e fossem coletadas. No segundo protocolo, as células esplênicas de baixa densidade foram previamente separadas através de gradiente de BSA ($d = 1,08$) e então submetidas aos procedimentos de aderência e descolamento do plástico descritos acima (Anexo 2).

Para a preparação das suspensões enriquecidas em células T, células esplênicas foram passadas através de coluna contendo lã de nylon e as células T foram coletadas na fração de eluição livre. As células T foram cultivadas na presença de DCs e 1mg/mL do antígeno, visando-se estabelecer as condições ótimas para os ensaios de apresentação antigênica.

Na figura 8, painel A, é possível observar que a adição de células dendríticas às preparações de linfócitos T resultou em proliferação significativamente mais elevada das células OVA-específicas do que a observada nas culturas nas quais as células T foram incubadas apenas na presença do antígeno. Além disso, o enriquecimento de DCs através do uso do gradiente de BSA associado à aderência e descolamento do plástico resultou em apresentação mais eficiente do

antígeno às células T. Somente quantidades iguais ou superiores a 2×10^5 DCs/mL foram eficientes em induzir a proliferação antígeno-específica (dados não mostrados). Utilizaram-se preparações de células T contendo 0,5 a $1,0 \times 10^7$ células/mL, faixa de concentração celular para a ocorrência de proliferação antígeno-específica, analisada pelo método do MTT (Figura 8, Painel B e Anexos 2, 3 e 4).

Como estimulador inespecífico dos linfócitos T foi utilizada a Concanavalina A (ConA). As culturas estimuladas com ConA apresentaram índices de proliferação elevados quando comparados às culturas de células T estimuladas apenas com OVA e foram utilizadas como um controle positivo da capacidade proliferativa dos linfócitos T.

6.1 EFEITO DA INGESTÃO DE OVA SOBRE A CAPACIDADE DE APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA E EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

A capacidade das DCs de apresentar o antígeno a linfócitos T *naive* foi investigada em ensaios de proliferação celular. Como fonte de DCs foram utilizadas células esplênicas de camundongos BALB/c e DO11.10 de diferentes faixas etárias que ingeriram OVA (4mg/mL, durante 7 dias consecutivos) e/ou foram imunizados por via i.p. Preparações de células T foram obtidas por enriquecimento por adesão à lã de nylon, a partir de células esplênicas de camundongos BALB/c ou DO11.10 *naive* jovens.

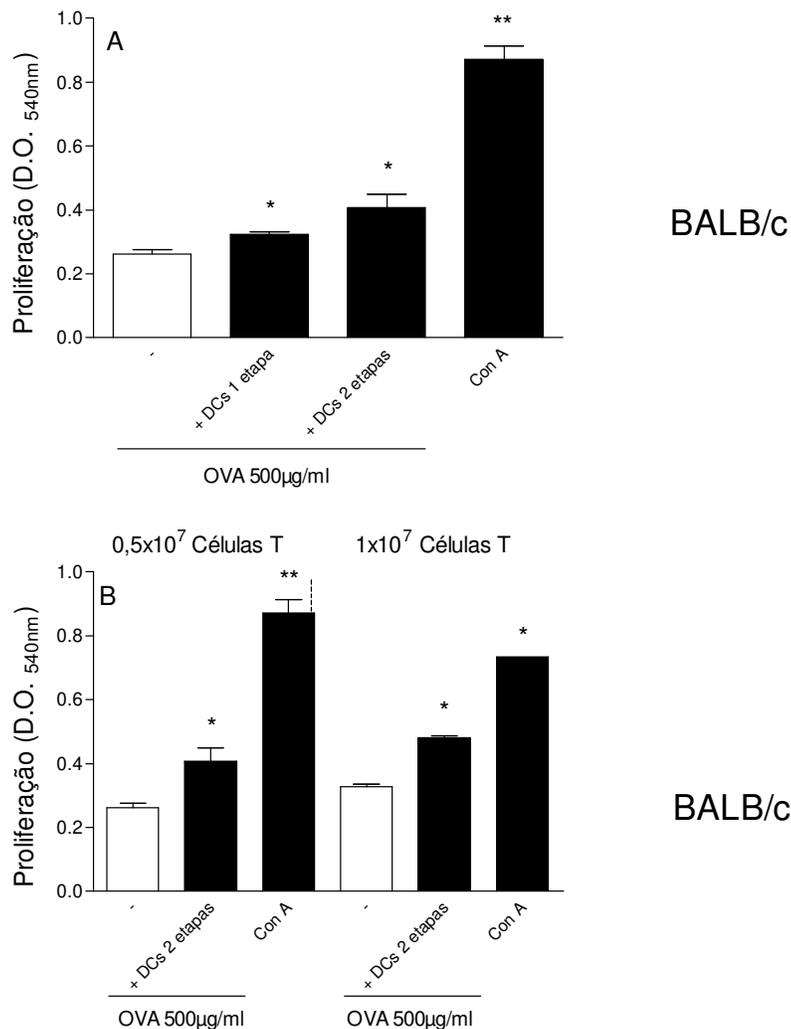


Figura 8: Ativação de células T *naive* por preparações enriquecidas de DCs de camundongos BALB/c. Painel A: As barras representam as médias \pm E.P.M. das absorbâncias obtidas nas culturas de células T de camundongos BALB/c ($0,5 \times 10^7$ células/mL), separadas em lã de nylon, na presença de uma fração enriquecida com DCs (2×10^5 células/mL) através de um protocolo de adesão à superfície plástica, seguido por descolamento e incubação com o antígeno (OVA 500 μ g/mL) por 18 horas (DCs 1 etapa) ou de uma fração enriquecida através de um protocolo de separação em gradiente de BSA ($d = 1,08$) combinado com o de adesão ao plástico e descolamento (DCs 2 etapas). Painel B: As barras representam as médias das absorbâncias \pm E.P.M. obtidas nas culturas de células T *naive* ($0,5 \times 10^7$ e 1×10^7 células/mL) de camundongos BALB/c jovens na presença de uma fração enriquecida de DCs (2×10^5 células/mL), obtida pela separação em gradiente de BSA combinada com adesão ao plástico. As DCs foram obtidas de camundongos BALB/c desafiados com OVA por via i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. As barras brancas representam a proliferação de células T na ausência de DCs. As culturas de linfócitos T estimuladas inespecificamente por ConA estão representadas pelas barras sólidas. A proliferação foi medida pela incorporação do corante MTT e expressa como D.O._{540nm}. Os ensaios foram realizados em triplicata, com DCs reunidas a partir de baços de cinco camundongos. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ vs OVA).

A figura 9 mostra que as DCs coletadas de camundongos BALB/c jovens que ingeriram OVA antes da imunização por via i.p. foram menos eficientes em promover a proliferação de células T obtidas de camundongos BALB/c normais (Painel A) ou transgênicos DO11.10 (Painel B) em comparação a células dendríticas obtidas de camundongos BALB/c que foram apenas imunizados. As DCs obtidas de camundongos DO11.10 que ingeriram ou não OVA foram igualmente eficientes em induzir a proliferação de células T obtidas de ambas as linhagens de camundongos, BALB/c (Painel C) e DO11.10 (Painel D).

A figura 10 resume os resultados obtidos quando as culturas de linfócitos T foram realizadas na presença de DCs provenientes de camundongos BALB/c adultos (20 e 40 semanas de idade) e velhos (60 ou mais semanas de idade), tratados ou não com OVA pela via oral. É possível observar que as DCs coletadas de camundongos BALB/c adultos que ingeriram a OVA antes da imunização tiveram menor capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T de camundongos BALB/c (Painel A) e de transgênicos DO11.10 (Painel B) do que as DCs provenientes dos camundongos não tratados oralmente com OVA. Por outro lado, a proliferação de células T OVA-específicas não foi significativamente afetada pela adição de DCs coletadas de camundongos velhos que ingeriram OVA antes do desafio i.p. quando comparada com a induzida por DCs provenientes dos camundongos apenas imunizados. Em resumo, DCs obtidas de camundongos BALB/c jovens e adultos, que ingeriram OVA, foram menos eficientes em promover a proliferação de células T que as DCs de camundongos imunizados pela via i.p.

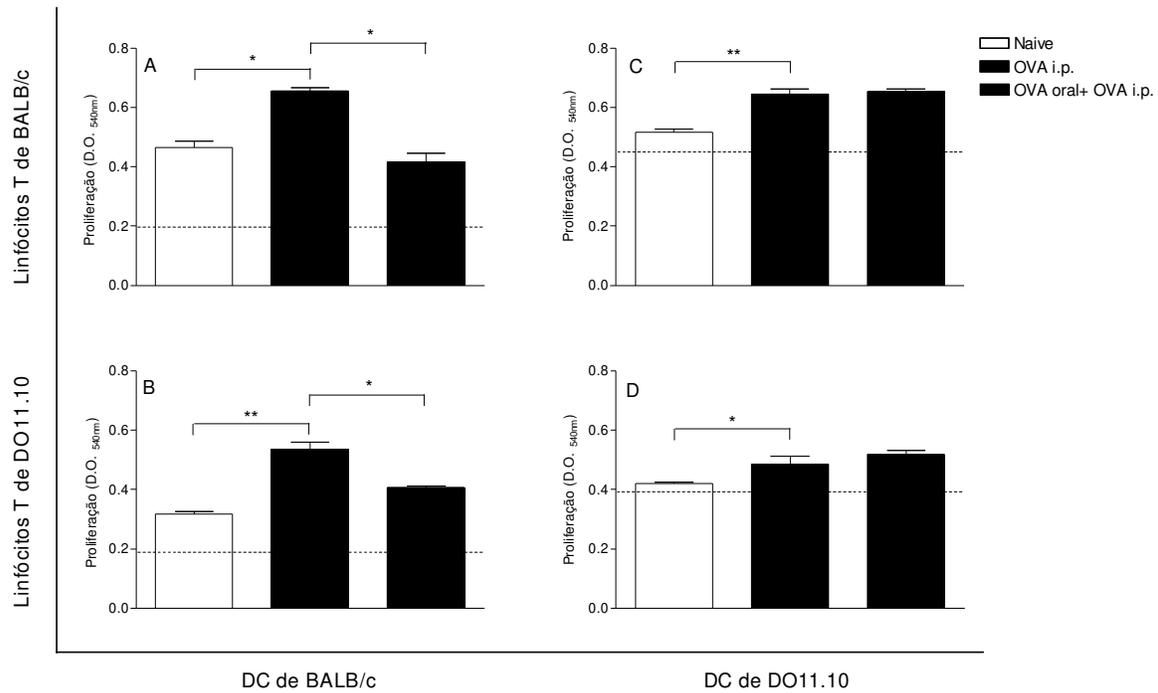


Figura 9: Influência do status imunológico das DCs sobre a proliferação de células T. As barras representam as médias \pm E.P.M. das absorbâncias obtidas nas culturas de células T *naive* ($0,5 \times 10^7$ células/mL) de camundongos BALB/c (Painéis A e C) ou transgênicos DO11.10 (Painéis B e D) realizadas na presença de DCs (2×10^5 células/mL) de camundongos BALB/c (Painéis A e B) ou DO11.10 (Painéis C e D) que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA (4mg/mL) e foram desafiados com OVA i.p. As barras brancas representam a proliferação de células T cultivadas na presença de DCs de camundongos não imunizados. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa as absorbâncias obtidas quando as células T foram cultivadas na ausência de DCs. A proliferação foi medida pela incorporação do corante MTT. Os ensaios foram realizados em triplicata, com DCs reunidas a partir de baços de cinco camundongos. Os dados são representativos de três ensaios separados. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

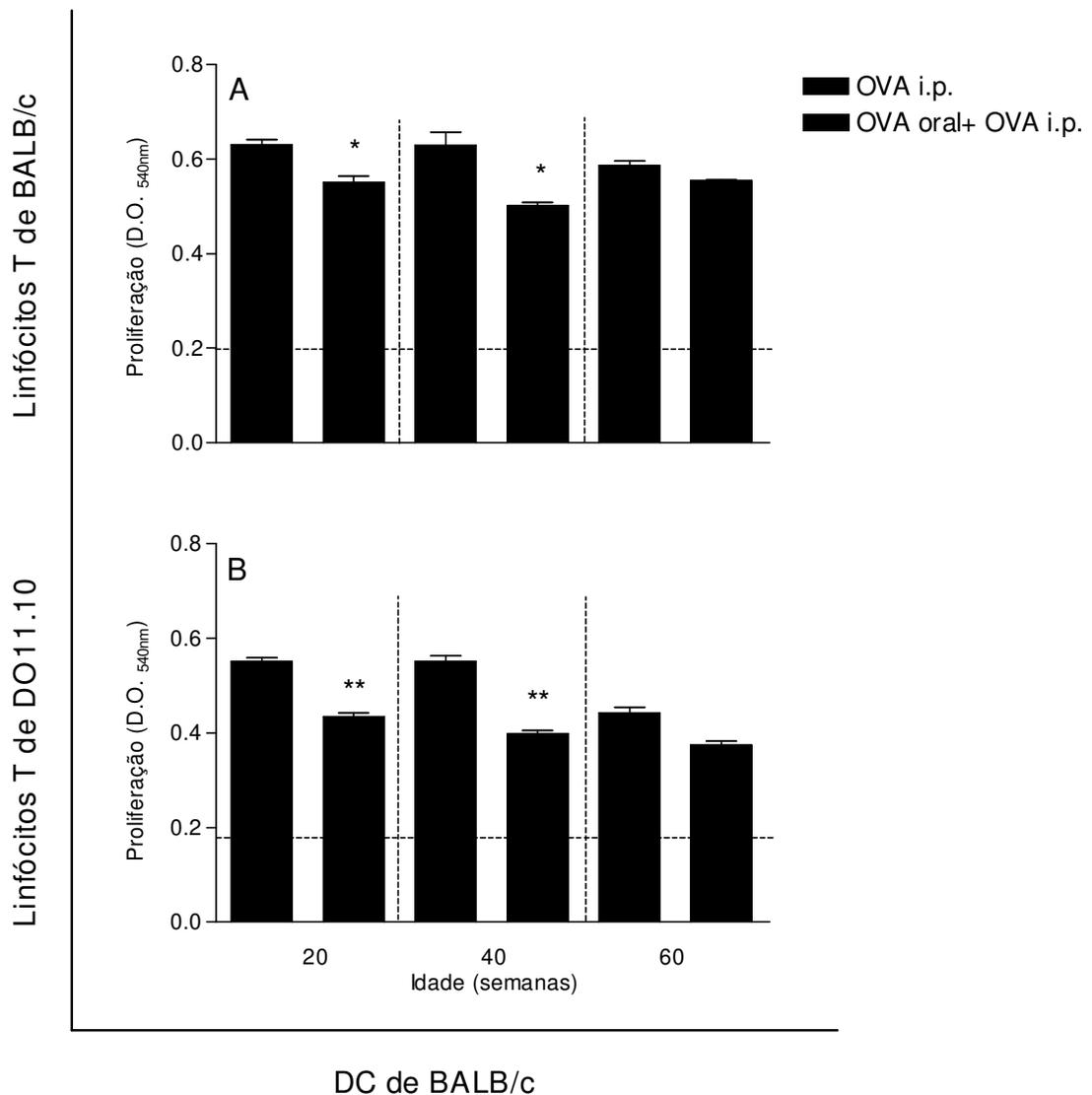


Figura 10: Influência da idade sobre a capacidade apresentadora de antígeno das DCs. As barras representam as médias \pm E.P.M. das absorbâncias obtidas nas culturas de células T *naive* ($0,5 \times 10^7$ células/mL) de camundongos jovens BALB/c (Painel A) ou transgênicos DO11.10 (Painel B) na presença de DCs de camundongos BALB/c com 20, 40 e 60 semanas de idade que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA (4mg/mL) e foram desafiados com OVA i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa as absorbâncias obtidas quando as células T foram cultivadas na ausência de DCs. A proliferação foi medida pela incorporação do corante MTT. Os ensaios foram realizados em triplicata, com DCs reunidas a partir de baços de cinco camundongos. (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ vs OVA i.p.).

As análises por citometria de fluxo dos marcadores CD80 e CD86 das DCs estão resumidas na Figura 11 e 12, respectivamente. As DCs obtidas de camundongos BALB/c tornados tolerantes pela ingestão de OVA apresentaram expressão reduzida de CD86, mas não do marcador CD80. No entanto, as DCs obtidas de camundongos transgênicos DO11.10 que ingeriram OVA, mas que não se tornaram tolerantes, apresentaram uma redução na expressão de ambas as moléculas, CD80 e CD86, em comparação com as DCs de camundongos apenas imunizados por via i.p. Resultados similares foram obtidos quando utilizadas células esplênicas obtidas de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias (Anexo 5 e 6).

7. A SECREÇÃO DE CITOCINAS EM CO-CULTURAS DE LINFÓCITOS T E DCs

Os níveis das citocinas IL-2 (Figura 13, Painéis A e B), IFN- γ (Figura 13, Painéis C e D), IL-4 (Figura 14, Painéis A e B), IL-10 (Figura 14, Painéis C e D) e TGF- β (Figura 15) foram medidos nos sobrenadantes de cultura de células T, obtidas de camundongos BALB/c ou transgênicos DO11.10 jovens, estimuladas com DCs obtidas de camundongos BALB/c ou transgênicos DO11.10 jovens, que ingeriram ou não ovalbumina (OVA 4mg/mL, durante 7 dias). A liberação de IL-1 nos sobrenadantes das co-culturas também foi acompanhada (dados não mostrados).

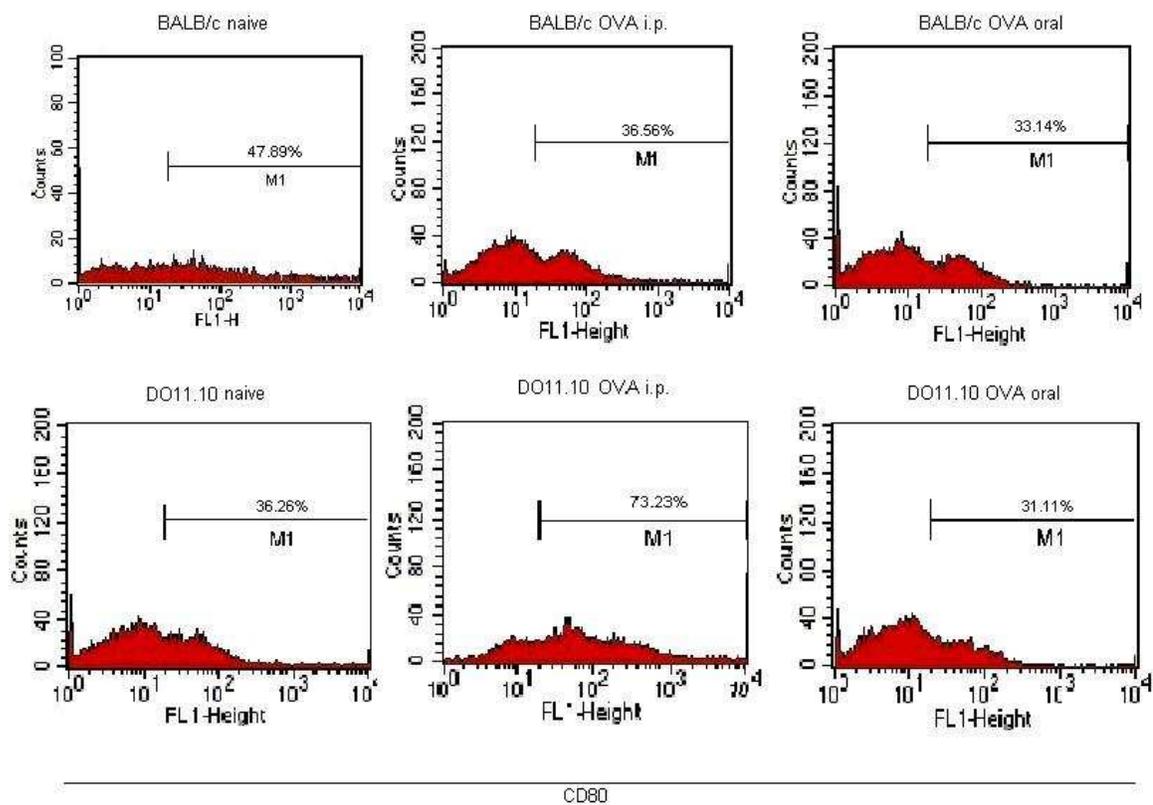


Figura 11: Frequência do marcador de ativação CD80 nas DCs de camundongos BALB/c e DO11.10. A porcentagem de DCs expressando o marcador CD80 foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo específico (clone 16-10A1) marcado com FITC. As DCs foram enriquecidas, através de protocolo de gradiente de BSA combinado com o de adesão e descolamento, a partir do *pool* de células esplênicas de camundongos jovens BALB/c e DO11.10 (n=5) *naive* (Naive), que ingeriram OVA e foram desafiados por via i.p. (OVA oral) ou foram apenas imunizados pela via i.p. (OVA i.p.). Com exceção das células não viáveis, as demais foram incluídas na análise.

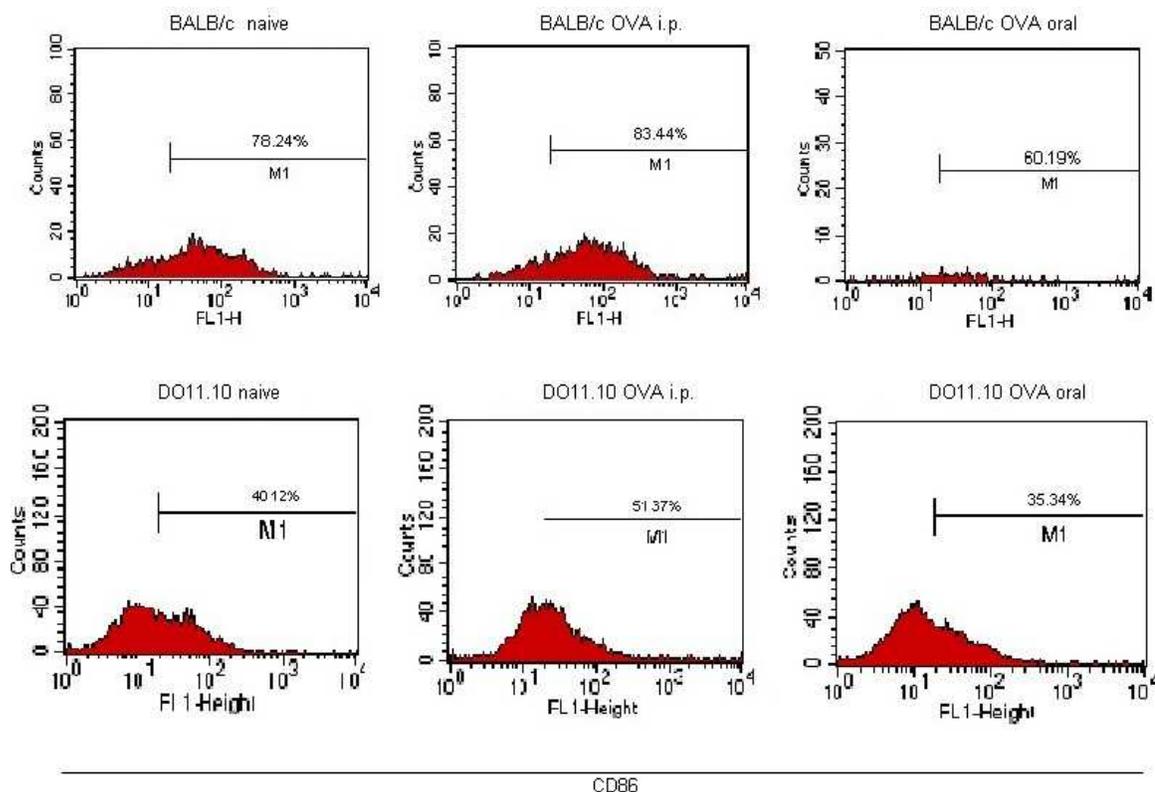


Figura 12: Frequência do marcador de ativação CD86 nas DCs de camundongos BALB/c e DO11.10. A porcentagem de DCs expressando o marcador CD86 foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo específico (clone GL1) marcado com FITC. As DCs foram enriquecidas, através de protocolo de gradiente de BSA combinado com o de adesão e descolamento, a partir do *pool* de células esplênicas de camundongos jovens BALB/c e DO11.10 (n=5) *naive* (Naive), que ingeriram OVA e foram desafiados por via i.p. (OVA oral) ou foram apenas imunizados pela via i.p. (OVA i.p.). Com exceção das células não viáveis, as demais foram incluídas na análise.

A produção de IL-1 não variou significativamente nas culturas, qualquer que tenha sido a fonte de DCs empregada, isto é, se as células esplênicas eram provenientes de camundongos tolerantes ou não-tolerantes (dados não mostrados). Os níveis de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ foram significativamente mais reduzidos nos sobrenadantes das culturas de T *naive* que foram co-cultivadas com DCs de camundongos BALB/c tolerantes, em comparação com DCs de camundongos imunizados por via intraperitoneal. As DCs de camundongos transgênicos, que ingeriram ou não OVA, foram igualmente eficientes em induzir a secreção de citocinas Th1 e Th2 em culturas de célula T. Por outro lado, a secreção de TFG- β foi reduzida nos sobrenadantes de cultura de células T estimuladas por DCs de camundongos transgênicos DO11.10 tratados com OVA e foi aumentada nos sobrenadantes de cultura de célula T cultivadas na presença de DCs de camundongos BALB/c tolerantes.

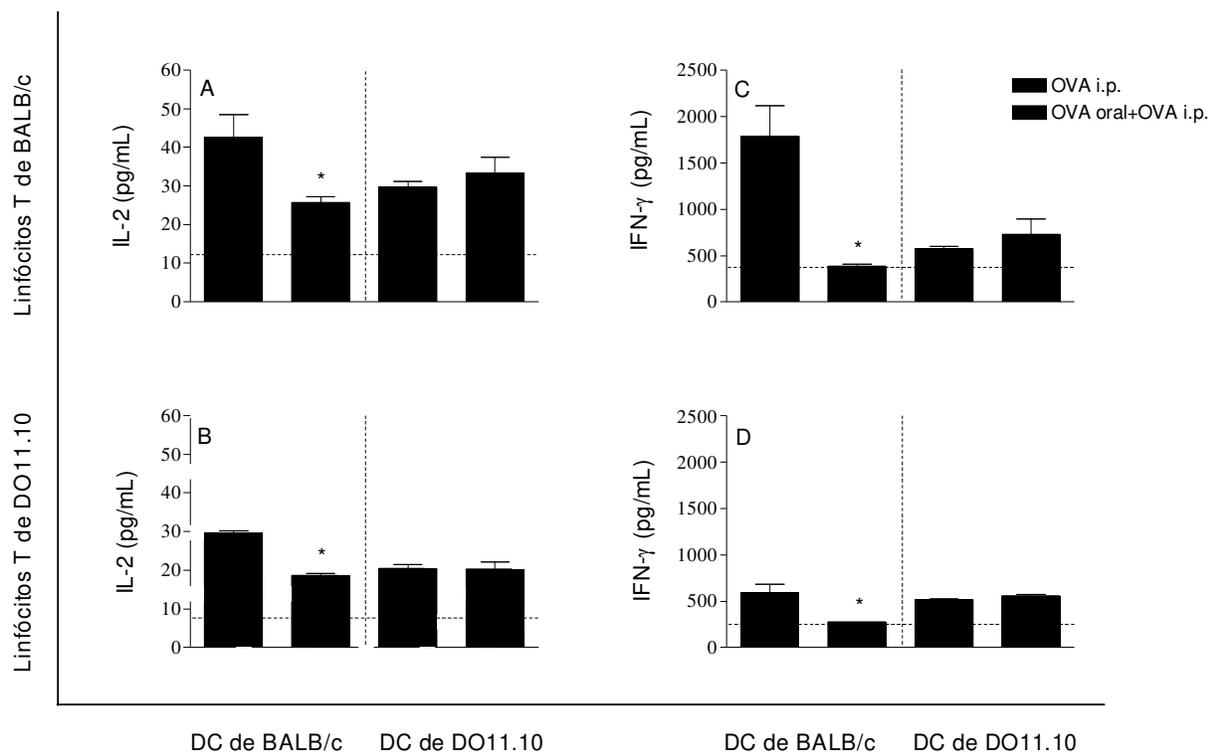


Figura 13: Perfil de citocinas Th1 em sobrenadantes de culturas de células T estimuladas por DCs de camundongos jovens BALB/c ou transgênicos DO11.10. Os níveis de IL-2 (Painéis A e B) e IFN- γ (Painéis C e D) foram medidos nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos T de camundongos BALB/c (Painéis A e C) ou transgênicos DO11.10 (Painéis B e D) e DCs obtidas de camundongos jovens BALB/c ou DO11.10 que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA a 4 mg/mL antes do desafio i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa a produção de citocinas por células T cultivadas na ausência de DCs. Os ensaios foram realizados em triplicata, a partir de DCs e células T isoladas dos baços de cinco camundongos. As barras representam médias \pm E.P.M. das leituras das absorbâncias a 540nm. Os dados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$).

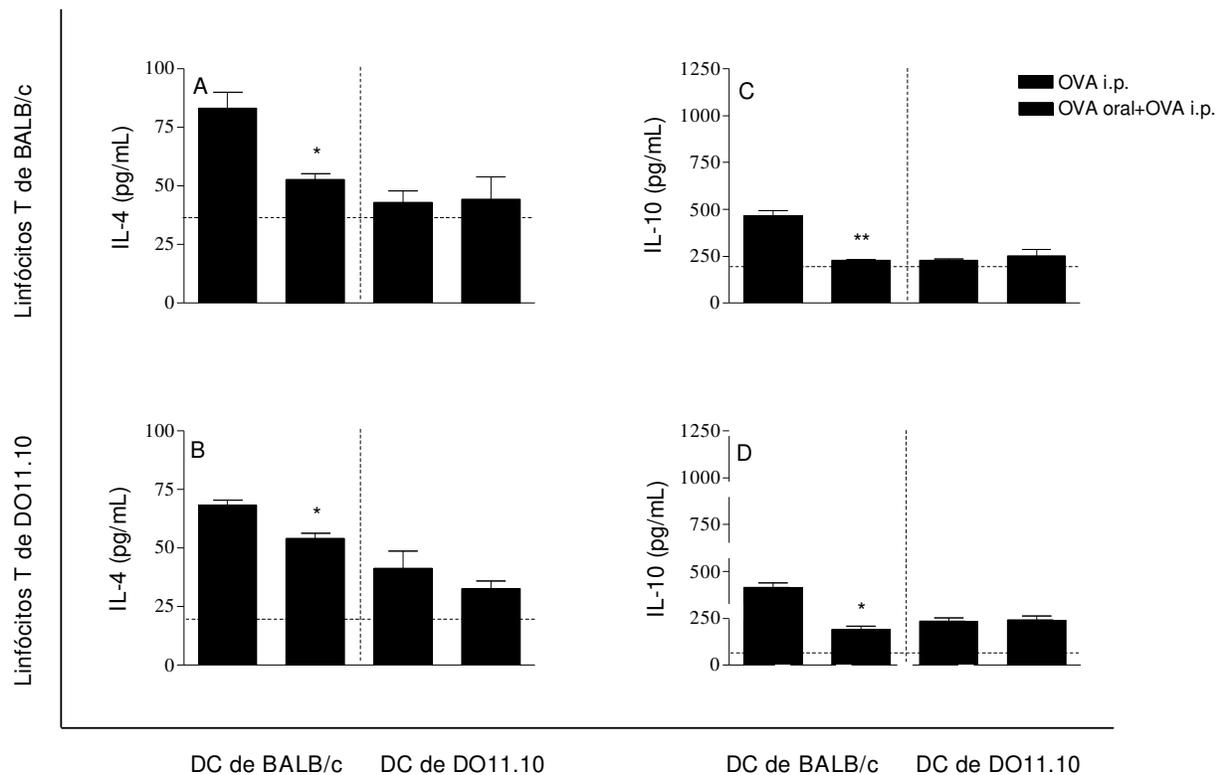


Figura 14: Perfil de citocinas Th2 em sobrenadantes de culturas de células T estimuladas por DCs de camundongos jovens BALB/c ou transgênicos DO11.10. Os níveis de IL-4 (Painéis A e B) e IL-10 (Painéis C e D) foram medidos nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos T de camundongos BALB/c (Painéis A e C) ou transgênicos DO11.10 (Painéis B e D) e DCs obtidas de camundongos jovens BALB/c ou DO11.10 que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA a 4 mg/mL antes do desafio i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa a produção de citocinas por células T cultivadas na ausência de DCs. As barras representam médias \pm E.P.M. das leituras das absorbâncias a 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, a partir de DCs e células T isoladas dos baços de cinco camundongos. Os dados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$).

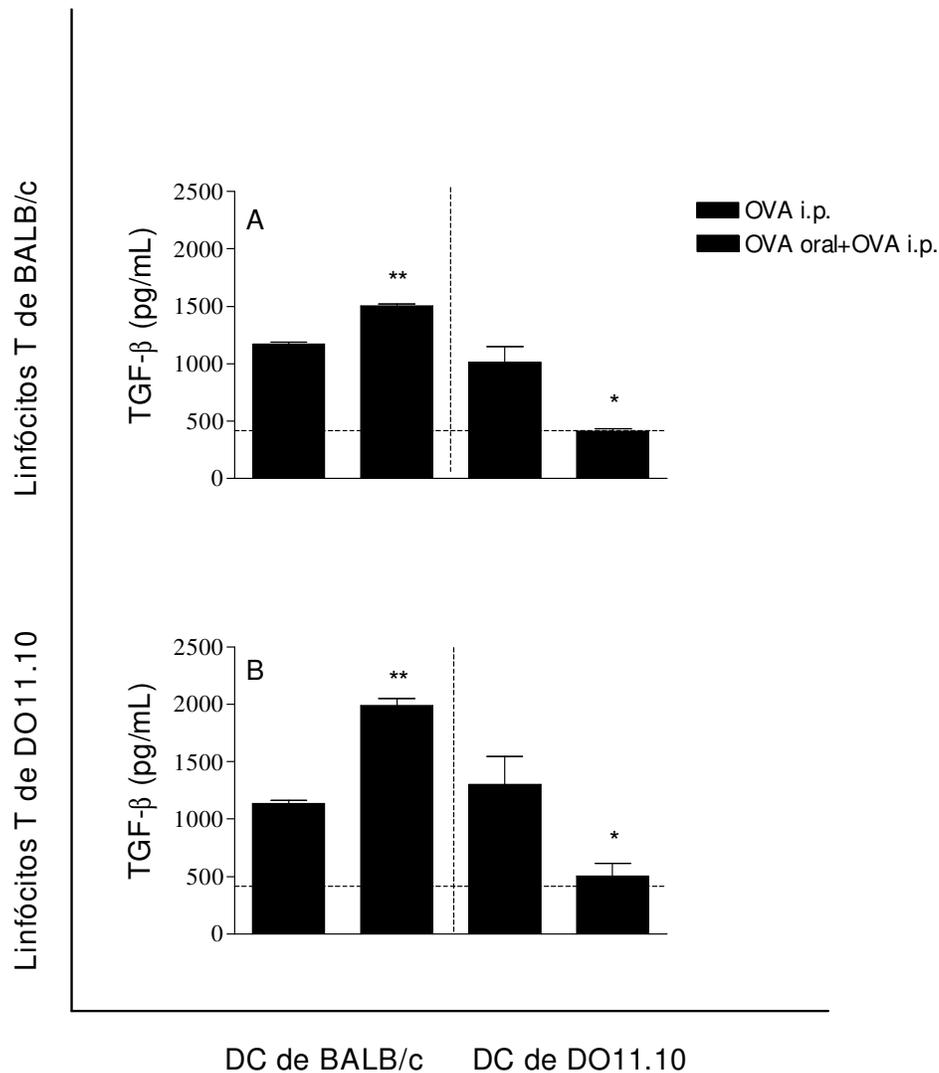


Figura 15: Produção de TGF-beta em sobrenadantes de culturas de células T estimuladas por DCs de camundongos jovens BALB/c ou transgênicos DO11.10. Os níveis de TGF-β foram medidos nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos T de camundongos BALB/c (Painel A) ou transgênicos DO11.10 (Painel B) e DCs obtidas de camundongos jovens BALB/c ou DO11.10 que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA a 4 mg/mL antes do desafio i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa a produção de TGF-β por células T cultivadas na ausência de DCs. As barras representam médias ± E.P.M. das leituras das absorbâncias a 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, a partir de DCs e células T isoladas dos baços de cinco camundongos. Os dados são representativos de três ensaios separados (* p<0,05 e **p<0,001).

Os níveis de IL-1, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β liberados nos sobrenadantes de linfócitos T cultivados na presença de DCs obtidas de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias, tolerantes ou não à OVA estão ilustrados nas Figuras 16 a 19.

Um aumento idade-dependente pode ser observado com relação aos níveis de IL-1 nas culturas de células T e DCs, sendo as DCs provenientes de camundongos tratados ou não tratados com OVA por via oral (Figura 16).

Pode ser observada uma redução nos níveis de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) nos sobrenadantes de cultura de células T co-cultivadas com células dendríticas de camundongos BALB/c adultos jovens (20 semanas) que ingeriram OVA, em comparação às culturas estimuladas por DCs de camundongos apenas imunizados. Entretanto, os níveis de citocinas Th1 não foram significativamente diferentes nos sobrenadantes de cultura de células T cultivadas com DCs obtidas de camundongos mais velhos (idade igual ou superior a 40 semanas), tratados ou não com OVA (Figura 17). Os níveis das citocinas de Th2 (IL-4 e IL-10) foram significativamente mais reduzidos nos sobrenadantes de células T co-cultivadas com DCs de camundongos BALB/c, de todas as faixas etárias ensaiadas, que ingeriram OVA, do que nos sobrenadantes das culturas de células T com DCs de camundongos apenas imunizados (Figura 18).

A secreção de TFG- β foi aumentada nos sobrenadantes de cultura de células T estimuladas por DCs de camundongos BALB/c tolerantes, jovens (Figura 15) e adultos jovens (Figura 19), mas não nas culturas realizadas na presença de DCs coletadas de camundongos mais velhos (Figura 19).

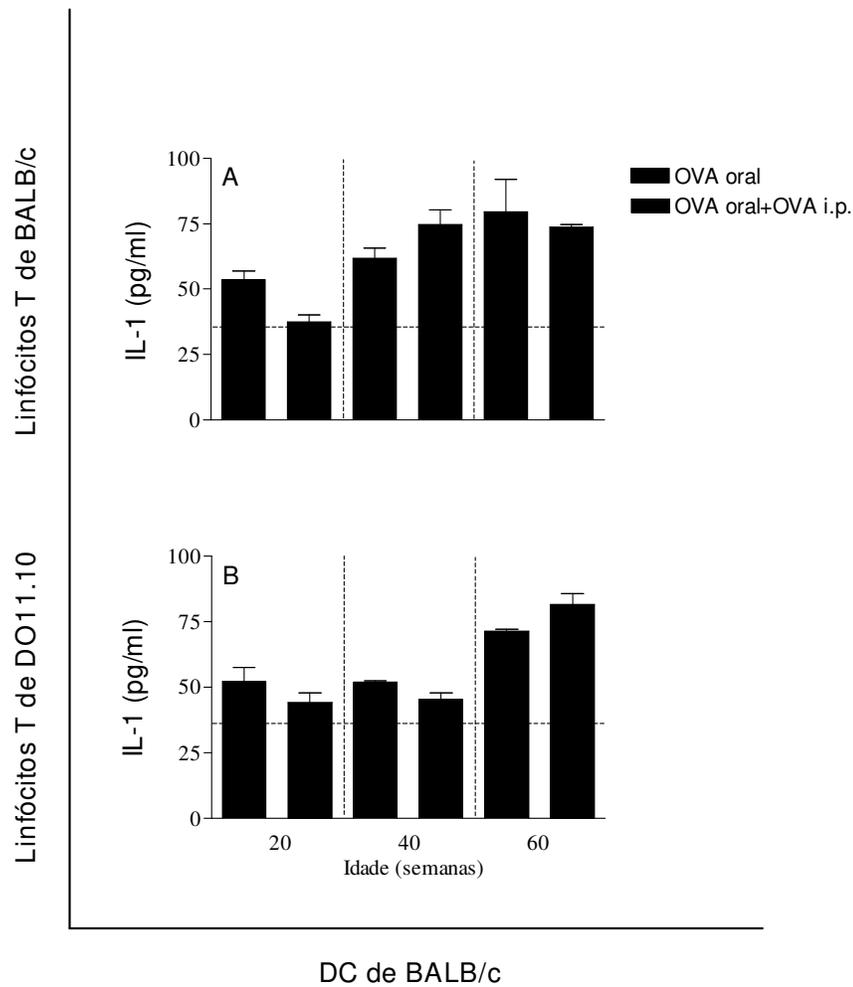


Figura 16: Produção de IL-1 em co-culturas de células T e DCs. Os níveis de IL-1 foram medidos nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos T *naive* de camundongos jovens BALB/c (Painel A) ou transgênicos DO11.10 (Painel B) e DCs obtidas de camundongos BALB/c de 20, 40 e 60 semanas de idade que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA a 4 mg/mL antes do desafio i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa a produção de IL-1 nos sobrenadantes de células T cultivadas na ausência de DCs. As barras representam médias \pm E.P.M. das leituras das absorbâncias a 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, a partir de DCs e células T isoladas dos baços de cinco camundongos. Os dados são representativos de três ensaios separados.

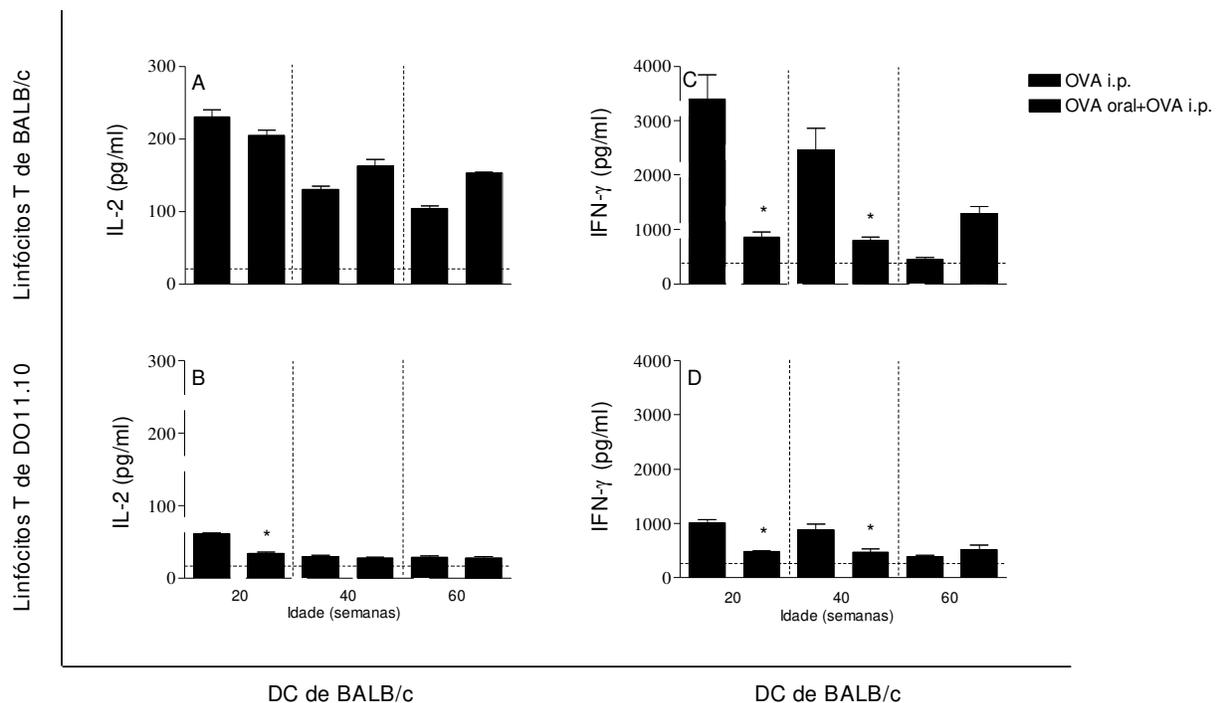


Figura 17: Produção de citocinas Th1 em culturas de células T estimuladas por DCs de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias. Os níveis de IL-2 (Painéis A e B) e IFN- γ (Painéis C e D) foram medidos nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos T de camundongos BALB/c (Painéis A e C) ou transgênicos DO11.10 (Painéis B e D) e DCs obtidas de camundongos jovens BALB/c de 20, 40 e 60 semanas de idade que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA a 4mg/mL antes do desafio i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa a produção das citocinas por células T cultivadas na ausência de DCs. As barras representam médias \pm E.P.M. das leituras das absorbâncias a 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, a partir de DCs e células T isoladas dos baços de cinco camundongos. Os dados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$).

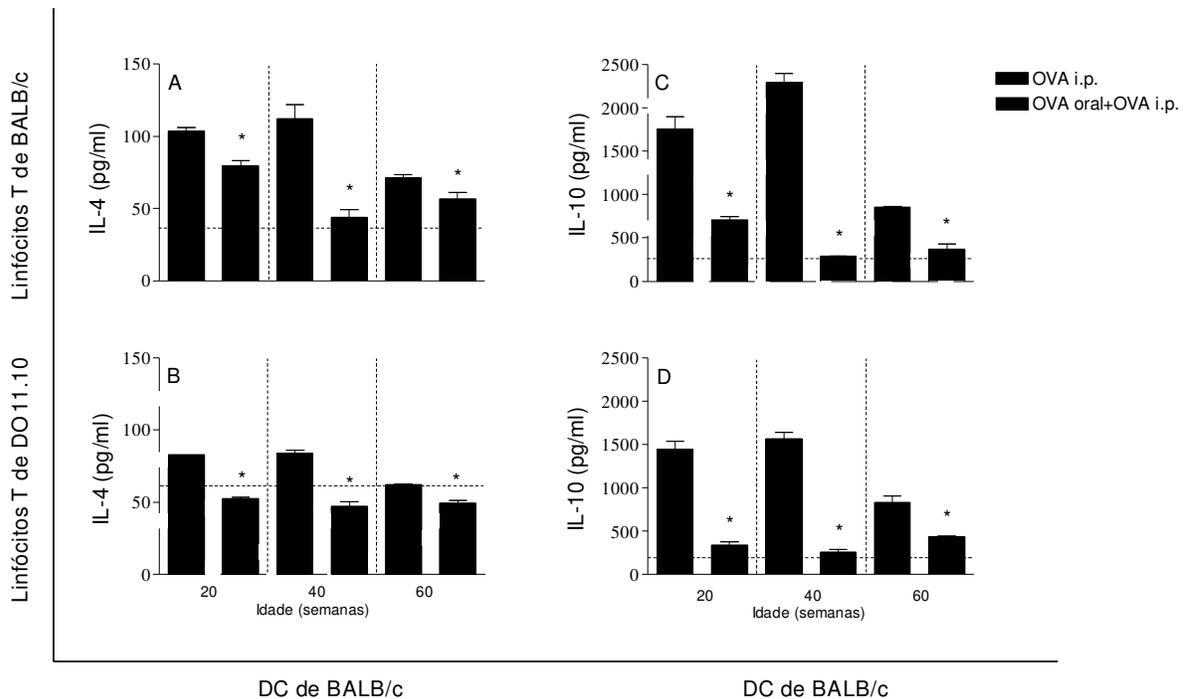


Figura 18: Produção de citocinas Th2 em culturas de células T estimuladas por DCs de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias. Os níveis de IL-4 (Painéis A e B) e IL-10 (Painéis C e D) foram medidos nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos T de camundongos BALB/c (Painéis A e C) ou transgênicos DO11.10 (Painéis B e D) e DCs obtidas de camundongos jovens BALB/c de 20, 40 e 60 semanas de idade que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA a 4 mg/mL antes do desafio i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa a produção das citocinas por células T cultivadas na ausência de DCs. As barras representam médias \pm E.P.M. das leituras das absorbâncias a 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, a partir de DCs e células T isoladas dos baços de cinco camundongos. Os dados são representativos de três ensaios separados (* p<0,05).

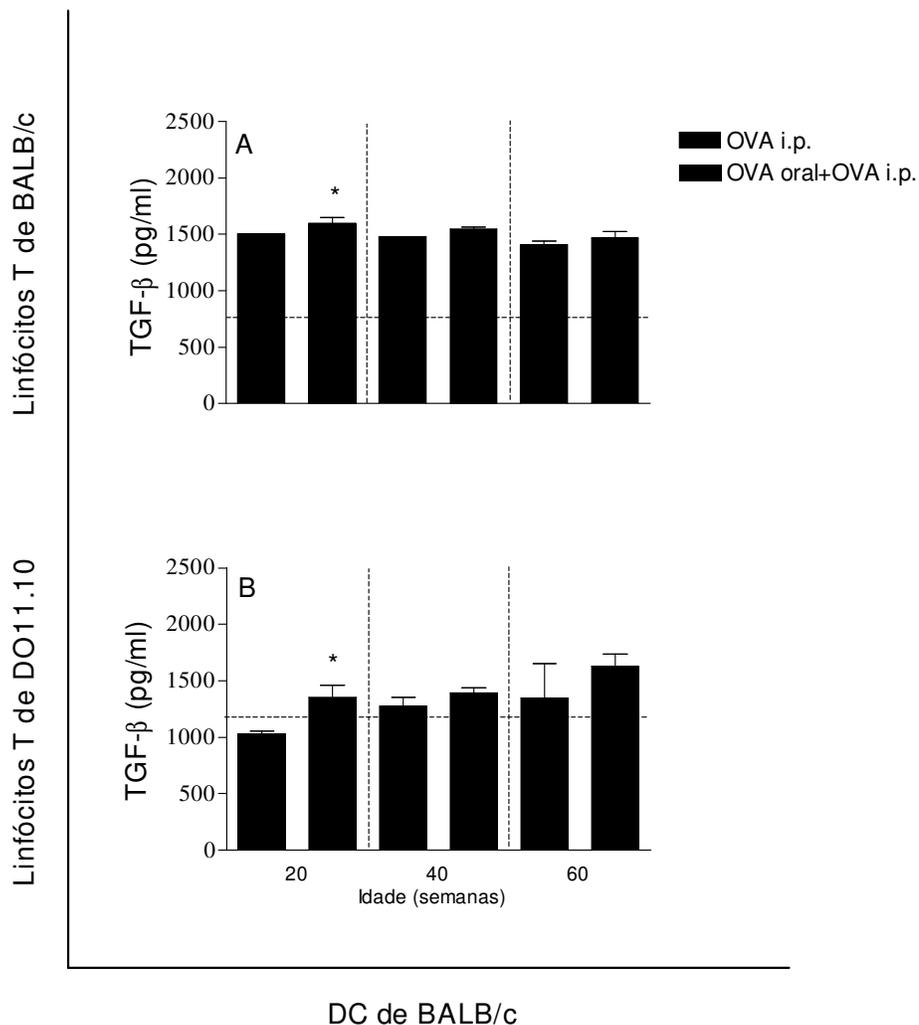


Figura 19: Produção de TGF-beta em culturas de células T estimuladas por DCs de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias. Os níveis de TGF- β foram medidos nos sobrenadantes de co-culturas de linfócitos T de camundongos BALB/c (Painel A) ou transgênicos DO11.10 (Painel B) e DCs obtidas de camundongos jovens BALB/c de 20, 40 e 60 semanas de idade que ingeriram (barras sólidas) ou não (barras achuriadas) uma solução de OVA a 4 mg/mL antes do desafio i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. A linha basal representa a produção do TGF- β por células T cultivadas na ausência de DCs. As barras representam médias \pm E.P.M. das leituras das absorbâncias a 540nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, a partir de DCs e células T isoladas dos baços de cinco camundongos. Os dados são representativos de três ensaios separados (* $p < 0,05$).

VII- DISCUSSÃO

O contato do aparelho digestivo com antígenos é um meio importante de prevenir reações de hipersensibilidade a proteínas da dieta. Este estado, conhecido como tolerância oral, é de grande relevância para o desenvolvimento de vacinas administradas através das mucosas, assim como para o tratamento de doenças inflamatórias autoimunes [revisado em WEINER, 1997, RUSSO *et al.*, 2001, CHUNG *et al.*, 2002, FARIA *et al.*, 2003, JONULEIT *et al.*, 2001].

A deleção clonal de linfócitos expressando receptores de alta afinidade parece ser o mecanismo principal de tolerância central no sistema imune adaptativo e pode explicar a prevenção de linfócitos auto-reativos [MURPHY *et al.*, 1990].

A deleção clonal é também um mecanismo importante para explicar a indução de tolerância periférica. A deleção clonal extensa de linfócitos T em órgãos linfóides periféricos foi observada em camundongos transgênicos DO11.10 tratados com OVA por via i.p., tanto com a proteína nativa ou com o peptídeo OVA323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) [MARTH *et al.*, 1996, MURPHY *et al.*, 1990]. Entretanto, os efeitos da administração oral da proteína nativa ou seu peptídeo na produção de anticorpos em camundongos transgênicos permanecem pouco explorados.

Dessa forma, foi objetivo desse estudo avaliar se a ingestão voluntária de OVA nativa ou a sua administração por gavagem modificava a resposta imune de camundongos transgênicos e não-transgênicos, de diferentes faixas etárias, como medido pela produção de anticorpos, pela atividade apresentadora de antígeno de APCs e pela secreção de citocinas.

Vários protocolos de indução de tolerância foram inicialmente testados, variando-se dose, tempo e modo de administração oral de OVA aos camundongos BALB/c (selvagem e transgênicos). Doses de OVA totais superiores a 35 mg, ingeridas com a água de beber ao longo de 7 a 30 dias, foram suficientes para induzir um estado duradouro de tolerância sistêmica à

proteína em camundongos BALB/c normais, conforme observado pelos níveis reduzidos de anticorpos séricos específicos. Entretanto, a administração de OVA por gavagem só foi eficiente em induzir tolerância nos camundongos dessa linhagem quando a proteína foi oferecida em doses mais elevadas (doses totais acima de 70 mg, durante 14 dias), como previamente descrito por outros autores [FARIA *et al.*, 2003, WABABAYASHI *et al.*, 1999]. A gavagem com doses baixas de OVA, particularmente a dose de 0,7mg totais, parece ter favorecido a produção de anticorpos, que se seguiu a administração intraperitoneal do antígeno, indicando um processo de *priming*. Em camundongos BALB/c, a administração intraperitoneal de OVA e hidróxido de alumínio levou à produção preferencial de imunoglobulinas da classe IgG1 (Th2), cujos níveis foram reduzidos significativamente nos camundongos pré-tratados oralmente com OVA.

Por outro lado, camundongos transgênicos DO11.10 não apresentaram redução dos níveis de anticorpos específicos quando quaisquer dos diferentes protocolos de administração oral de OVA foram aplicados previamente ao desafio antigênico. Ao contrário, a administração oral da proteína resultou em elevação dos níveis de anticorpos séricos OVA-específicos, mesmo antes do desafio intraperitoneal com o antígeno. A administração oral e/ou i.p de OVA aos camundongos DO11.10 gerou a produção de níveis elevados de anticorpos específicos IgG1 e IgG2a, ainda que níveis mais baixos dessa última classe tenham sido observados.

A literatura traz poucas informações sobre a resposta imune humoral de camundongos DO11.10 tratados por via oral com OVA e desafiados subsequentemente com o antígeno por rotas clássicas de imunização. Os únicos dados disponíveis são aqueles de WU *et al.* [1998] que observaram uma produção sustentada de anticorpos IgG totais anti-OVA, mas níveis reduzidos de IgE antígeno-específica em camundongos DO11.10 que ingeriram OVA. Com relação à produção de IgG pelos camundongos DO.11.10 que ingeriram OVA, nossos dados se assemelham aos

obtidos por esses autores. Entretanto, com relação à produção de IgE, os diversos esquemas de imunização empregados no presente trabalho não resultaram na produção dessa subclasse de Ig pelos camundongos BALB/c normais ou transgênicos, de modo que a comparação com os resultados desses autores fica prejudicada.

A utilização de camundongos transgênicos em estudos de tolerância apresenta certas desvantagens, uma vez que doses orais extremamente altas de antígeno (1750 mg/animal) são necessárias para gerar uma redução detectável da resposta imune destes camundongos, avaliada pela proliferação celular e produção de citocinas. Provavelmente isso se deve ao maior número de células T antígeno-específicas que precisam ser tolerizadas, em comparação ao encontrado em camundongos normais. Outra desvantagem mencionada por esses autores é a ausência de resposta imune anamnésica nos camundongos transgênicos DO11.10 após o desafio com o antígeno [MARTH *et al.*, 1996]. Entretanto, na presente investigação, não foi observado tal efeito sobre a resposta imune humoral de camundongos DO11.10, desde que os níveis de anticorpos aumentaram progressivamente após cada nova dose de OVA administrada, tanto por via i.p. quanto por via oral.

Dados da literatura mostram que a administração de OVA por via intraperitoneal nos camundongos transgênicos DO11.10 leva a uma redução significativa, pelo mecanismo de deleção, das células de fenótipo imaturo e maduro, presentes no timo. A análise das populações de células T específicas para TCR OVA na periferia, após a administração da proteína ovalbumina por via intraperitoneal, também revelou uma redução significativa das células expressando o clonotipo KJ1-26 [MURPHY *et al.*, 1990]. Além da administração i.p., o tratamento oral de camundongos DO11.10 com OVA também resulta na deleção do clonotipo KJ1-26 [MARTH *et al.*, 1996]. No presente trabalho, os protocolos de administração oral de OVA empregados

resultaram em redução significativa das células T CD3⁺ e T CD4⁺, portando TCR do clonotipo KJ1-26, conforme observado por citometria de fluxo. Entretanto, as células T TCR-OVA específicas restantes parecem ter sido suficientes para manter uma resposta imune humoral à OVA nos transgênicos.

Camundongos C57BL/6 (H2K^b) também foram empregados em experimentos de indução da tolerância oral, em condições idênticas às testadas nos camundongos com *background* H2K^d (BALB/c normal e transgênicos). Em concordância com os dados da literatura [WEINER, 1997, FARIA *et al.*, 1998-B, FARIA *et al.*, 2003], também foi possível induzir um estado duradouro (mais de 44 semanas) de tolerância nos camundongos C57BL/6 que ingeriram a proteína misturada à água de beber previamente ao desafio antigênico pela via intraperitoneal.

Dessa forma, nos experimentos subseqüentes adotamos o protocolo de indução de tolerância constituído pelo oferecimento aos camundongos da ovalbumina misturada à água de beber (4mg/mL), durante 7 dias consecutivos, tendo em vista a sua praticidade. Apesar da aparente simplicidade desse protocolo, o sucesso no estabelecimento da tolerância oral depende de uma cuidadosa manipulação do animal e de condições ambientais favoráveis, isto é, ambiente livre de patógenos específicos com fotoperíodo e temperatura controlados. Essas condições permitiram, inclusive, abordar a tolerância ao longo de várias etapas da vida desses camundongos.

Assim, a tolerância oral foi estudada em camundongos BALB/c normais e transgênicos jovens (entre 6 e 12 semanas), adultos (20 semanas), de meia-idade (40 semanas) e velhos (acima de 60 semanas). Como a literatura especializada é pobre em dados sobre marcadores do envelhecimento de camundongos de experimentação, a divisão dos grupos nas faixas etárias adotadas no presente trabalho foi baseada em resultados anteriormente obtidos em nosso laboratório, que mostraram um declínio na produção de anticorpos e de citocinas dependente da

idade em camundongos imunizados [UCELLI, 1998]. Um trabalho recente mostrou que a expressão da proteína SMP30 em células do alvéolo pulmonar, em hepatócitos e nos rins pode ser considerada um marcador adequado de envelhecimento em murinos [MORI *et al.*, 2004]. Coincidentemente, as faixas etárias dos camundongos definidas por esses autores - jovens, adultos, de meia-idade e velhos - foram semelhantes às que adotamos para a formação dos grupos experimentais, visando estudar a indução de tolerância em camundongos mais velhos.

Os resultados obtidos nos ensaios com camundongos BALB/c acima de 40 semanas de idade corroboram os dados da literatura [FARIA *et al.*, 1998-B, WAKABAIASHI *et al.*, 1999, MOREAU & GABORIAU-ROUTHIAU, 1996, LAHMANN *et al.*, 1992] mostrando que camundongos mais velhos são menos susceptíveis, mas não refratários, à indução de tolerância e à imunização do que camundongos mais jovens. Os camundongos transgênicos DO11.10 adultos, de meia-idade e velhos também não se tornaram tolerantes a OVA pela ingestão da proteína. Como observado com os camundongos jovens, a ingestão de OVA pelos camundongos DO11.10 mais velhos resultou na produção aumentada de anticorpos anti-OVA ao invés de tolerância.

A literatura mostra que a tolerância induzida pela administração sistêmica de proteína altamente purificada pode ser quebrada pela administração de leucócitos de animais normais, coletados do timo e da medula óssea (*Appud.* VAZ, 1973; KITAMURA *et al.*, 1987). No presente trabalho, mostramos que a transferência adotiva de linfócitos esplênicos de animais *naive* para camundongos BALB/c foi eficiente na quebra da tolerância previamente estabelecida, provavelmente devido à restauração das proporções normais de células no circuito imune fisiológico. Entre as células *naive* transferidas, as células apresentadoras podem ter representado uma nova chance de interações celulares, favorável ao desenvolvimento de resposta imune humoral após a administração parenteral do antígeno. Entretanto, a transferência de células

esplênicas de camundongos BALB/c *naive* para camundongos DO11.10, mesmo acompanhada por um novo tratamento oral com OVA, não reduziu a produção de anticorpos específicos nos transgênicos. Ao contrário, os níveis de anticorpos séricos aumentaram nos transgênicos, provavelmente devido ao tamanho do *pool* restante de células T específicas para OVA no sistema imune desses camundongos, após o tratamento oral .

Células T regulatórias e supressoras são capazes de regular as funções de outras células T CD4⁺ e CD8⁺, resultando em redução da resposta imune. As células T regulatórias e supressoras se caracterizam pela expressão de CD25 na superfície e pela produção de citocinas inibitórias. As células T supressoras adquirem a expressão de CD25 no timo e as T regulatórias parecem adquirir esse marcador na periferia. As células T regulatórias produzem as citocinas IL-10 e TGF- β , que atuam inibindo as respostas das células efetoras em modelos experimentais distintos daqueles onde há envolvimento de células T supressoras. Enquanto as células T regulatórias inibem as respostas imunes em alotransplante e certos processos infecciosos, as células T supressoras regulam as funções de células envolvidas em modelos de doenças autoimunes. O comportamento diferenciado das duas populações de células T reguladoras é provavelmente determinado por fatores do microambiente onde se desenvolvem, cabendo um papel importante às células apresentadoras de antígeno, em particular às DCs [STEINMAN *et al.*, 2003]. As DCs maduras desempenham um papel crucial na imunidade adaptativa contra antígenos externos, estimulando células T *naive* antígeno-específicas e favorecendo a geração de células de memória [LEVIN *et al.*, 1993, FINKELMAN *et al.*, 1996, CRAWFORD *et al.*, 2003, KAPSENBERG, 2003]. No entanto, inúmeras evidências apontam o envolvimento de DCs imaturas no estabelecimento da tolerância a antígenos estranhos, particularmente os de natureza protéica, como os da dieta [STEINMAN *et al.*, 2003]. Por outro lado, há evidências de que mesmo DCs maduras podem

estar envolvidas na tolerância periférica a antígenos próprios, para os quais células T específicas tenham escapado da seleção negativa. No estado de equilíbrio, as DCs capturam, processam e apresentam antígenos próprios às células imunocompetentes, que proliferam e subsequentemente sofrem deleção, sem gerar uma resposta imune detectável [HAWIGER *et al.*, 2001]. Além da deleção clonal, mecanismos de regulação das funções de células T podem ser dirigidos por células dendríticas. Nesse sentido, tem sido demonstrado que DCs imaturas de medula óssea diferenciadas *in vitro* podem se tornar tolerogênicas após tratamento com IL-10, inibindo assim a proliferação de linfócitos T obtidos de camundongos *naive* ou imunizados, bem como reações de hipersensibilidade tardia *in vivo* [STEINBRINK, 1997, MULLER *et al.*, 2002].

Os sinais de reconhecimento molecular de patógenos potenciais via TLR (*Toll-like receptor*) também ativam de modo eficiente as DCs, levando a iniciação da resposta imune adaptativa. A sinalização de DCs através de TLR pode causar aumento da apresentação via MHC de classe II-peptídeos para células T, aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias importantes para a expansão clonal de células T e da secreção de citocinas imunomodulatórias, que direcionam a diferenciação de células T em células efetoras. A ligação de TLR distintos em um certo tipo de DCs pode iniciar a produção diferencial de citocinas, ou diferentes citocinas podem ser produzidas por distintos subtipos de DCs [REIS E SOUZA, 2004].

O desenvolvimento de respostas do tipo Th1 e Th2 parece ser dependente da dose de antígeno, do estado de maturação das DCs, tipo de adjuvante utilizado, bem como da estimulação das DCs por produtos derivados de patógenos. Em geral, altas doses do antígeno induzem o desenvolvimento de células Th1, enquanto baixas doses induzem o desenvolvimento de Th2. Nesse sentido, DCs diferenciadas de medula óssea ou de células esplênicas, induziram fortemente a proliferação antígeno específica de células T CD4, com perfil de citocinas de células Th1,

quando tratadas concomitantemente com CpG (seqüência citosina-guanina não metilada de DNA bacteriano), um ligante do TLR9, mas não com o lipopolissacarídeo LPS, ligante de TLR4. A alta expressão de TLR9 correlacionou-se a capacidade de resposta à CpG das DCs de origem plasmocitóide. De forma oposta, as DCs mielóides geradas pela estimulação de precursores da medula óssea com GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos) apresentaram elevada expressão de TLR4 e propiciaram o desenvolvimento de células Th1 quando estimuladas com LPS [BOONSTRA *et al.*, 2003].

No presente trabalho, o hidróxido de alumínio foi utilizado como adjuvante nas imunizações parenterais dos camundongos com a OVA. O uso de adjuvantes contendo hidróxido de alumínio é apropriado por conferir proteção pela indução de anticorpos, via o eixo de resposta Th2. Esses adjuvantes podem aumentar a resposta imune pela estimulação direta ou indireta de células dendríticas, ativação do complemento ou indução de citocinas. Entretanto, não induzem células T citotóxicas ou imunidade mediada por células [HOGENESCH, 2002].

No presente trabalho, investigamos o envolvimento das células dendríticas na tolerância oral à ovalbumina, medindo a capacidade dessas células em sustentar a proliferação antígeno-específica de células T e a produção de citocinas nas co-culturas T/DCs. As DCs obtidas de camundongos BALB/c tolerizados foram menos eficientes em estimular a proliferação *in vitro* de células T antígeno-específicas do que as DCs dos camundongos imunizados, efeito que foi mais pronunciado quando as DCs eram provenientes de camundongos jovens. Os níveis das citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-10) também foram mais reduzidos nas culturas realizadas na presença DCs de camundongos tolerantes. Ainda, as DCs isoladas de camundongos tratados ou não com OVA expressaram de forma diferenciada a molécula CD86 (B7-2), como corroborado pelo anexo 6, sendo a expressão desta molécula reduzida em DCs obtidas de camundongos que

ingeriram a OVA, que se tornaram (BALB/c) ou não (DO11.10) tolerantes à proteína. Como é amplamente conhecido, a ligação da molécula CD86 com a molécula CD28 de linfócitos T é essencial para a indução de IL-4, que direciona a diferenciação de células Th0 para o fenótipo Th2 [KUCHROO *et al.*, 1995, FREEMAN *et al.*, 1995, LUI *et al.*, 1999]. Assim, a redução dos níveis de anticorpos, após a ingestão de OVA, pelos camundongos BALB/c normais pode, em parte, ser atribuível à redução da expressão da molécula co-estimuladora CD86 nas DCs, que resulta em menor resposta das células T *helper* ao estímulo com o antígeno. Já a expressão do marcador CD80 não apresentou alterações que pudessem ser correlacionadas ao estado tolerogênico ou imunogênico das células dendríticas ensaiadas.

A literatura tem mostrado que a ingestão de OVA intacta, voluntariamente ou por gavagem, pode levar à redução da resposta proliferativa dos linfócitos T OVA-específicos de linfonodos de drenagem ou dos baços de camundongos DO11.10 [BELZ *et al.*, 2002, MARTH *et al.* 2000]. Além disso, uma produção diminuída de citocinas tais como IL-2, e IFN- γ e aumentada de IL-10 e TGF- β tem sido demonstrada em cultura de células esplênicas de camundongos DO11.10 oralmente tratados com OVA intacta [FARIA *et al.*, 2003, MARTH *et al.*, 2000]. No entanto, no presente trabalho, observamos que as DCs dos camundongos DO11.10 que ingeriram e/ou foram imunizados intraperitonealmente com OVA foram igualmente capazes de sustentar a proliferação induzida pelo antígeno de células T *naive* de BALB/c normais ou transgênicos, bem como de estimular a produção das citocinas de Th1 e Th2. Por outro lado, a produção de TGF- β foi reduzida nas culturas de células T *naive* realizadas na presença de DCs obtidas dos camundongos transgênicos que ingeriram OVA. Esse conjunto de resultados poderia explicar a produção mais elevada de anticorpos pelos camundongos transgênicos que ingeriram OVA comparada à observada nos camundongos imunizados por via i.p.

De forma semelhante ao visto no presente trabalho, MARTH *et al.* [2000] mostraram altos índices de proliferação de células T quando células de baço de camundongos DO11.10 que ingeriram doses baixas de OVA (<100 mg) foram cultivadas na presença do antígeno. Entretanto, nessas culturas, a secreção de TGF- β não foi significativamente diferente do controle. Esses autores mostraram ainda que altas doses de OVA (>750 mg) suprimiram ativamente as respostas proliferativas de células T de camundongos transgênicos DO11.10, supressão que se associou à produção de grandes quantidades de TGF- β e IL-10 nas culturas de célula derivadas de baço e placas de Peyer [MARTH *et al.*, 2000].

A investigação dos parâmetros proliferação celular e produção de citocinas em co-culturas de linfócitos T *naive* de camundongos jovens com DCs de camundongos adultos, de meia idade e velhos mostrou que o avanço da idade afeta de modo discreto, mas significativo, a capacidade de sustentar a proliferação de células T. De forma semelhante, observamos que a secreção de citocinas Th1 e Th2 em sobrenadantes de cultura de células T estimuladas por DCs parece sofrer uma redução relacionada ao avanço da idade do animal utilizado como fonte de DCs.

Assim, os resultados obtidos nos ensaios de proliferação de células T, usando como APCs as DCs do baço de camundongos BALB/c normais que ingeriram ou não a OVA, revelaram dois aspectos importantes. O primeiro deles refere-se ao fato de que a ingestão de proteína modifica a capacidade das DCs de proporcionar plenamente a proliferação de células T *naive*. O segundo, de que a idade do animal afeta a função apresentadora das DCs.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho mostram que a administração oral de OVA induz um estado de tolerância permanente em camundongos BALB/c normais, como medido pela

produção de anticorpos, proliferação de célula T, e produção de citocinas Th1 e Th2, não observados em camundongos transgênicos DO11.10. A tolerância observada nos camundongos BALB/c que ingeriram OVA associa-se a secreção elevada de TGF- β .

V – CONCLUSÕES

- A ingestão de OVA pelos camundongos transgênicos DO11.10 alterou significativamente o número de células T do clonotipo KJ1-26⁺, presentes tanto no baço quanto no sangue, provavelmente por deleção das células T portando o TCR específico para OVA.

Ao contrário do observado nos BALB/c, os camundongos DO11.10 que ingeriram OVA não apresentaram redução nos níveis de anticorpos circulantes específicos, após o desafio antigênico por via parenteral, sugerindo que a redução no número de células KJ1.26⁺ parece não ser suficiente para levar a redução dos anticorpos específicos.

A ingestão de OVA alterou significativamente a função apresentadora de antígenos de DCs de camundongos BALB/c que se tornaram tolerantes, como demonstrado pela estimulação de linfócitos, produção de citocinas e frequência de células expressando molécula CD86, mas não das DCs dos DO11.10, indicando um papel importante dessas células no fenômeno da tolerância.

O envelhecimento afetou de modo importante tanto a produção de anticorpos em animais desafiados quanto a susceptibilidade a indução de tolerância, como demonstrado pela estimulação de linfócitos e produção de citocinas

A redução da atividade das células dendríticas dos animais tolerantes à OVA pode ser atribuída em parte à produção aumentada de TGF- β .

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alpan O. Oral Tolerance and Gut-Oriented Immune Response to Dietary Proteins. *Current Allergy and Asthma Reports* 2001; 1:572–577.

Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells *Nature Review Immunology* 2003; 3(7): 582-590.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392 (19): 245-252.

Barone KS, Reilly MR, Flanagan MP, Michael JG. Abrogation of Oral Tolerance by Feeding Encapsulated Antigen. *Cellular Immunology* 2000;199(2):65–72.

Belz BT, Heath WR, Carbone FR. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunology and Cell Biology* 2002; 80:463-468.

Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *Journal of Experimental Medicine* 2003; 197(1):101-109.

Callard RE, Basten A, Walters LK. Immune function in aged mice. II. B-cell function. *Cellular Immunology* 1977, 31: 26-36.

Carvalho CR, Verdolin BA, de Souza AV, Vaz NM. Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 1994; 39(6):533-538.

Chen Y, Inobe J, Weiner HL. Inductive events in oral tolerance in the TCR transgenic adoptive transfer model. *Cellular Immunology* 1997; 178:62-68.

Chen Y, Ma Y. Roles of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 in the inductive phase of oral tolerance. *Immunology* 2002; 105(2): 171-180.

Chung Y, Cho J, Chang YS, Cho SH, Kang CY Preventive and therapeutic effects of oral tolerance in a murine model of asthma. *Immunobiology*. 2002 Oct;206(4):408-23.

Crawford K, Stark A, Kitchens B, Sternheim K, Pantazopoulos V, Triantafellow E, Wang Z, Vasir B, Larsen CE, Gabuzda D Reinherz E, Alper CA. CD2 engagement induces dendritic cell activation: implications for immune surveillance and T-cell activation. *Blood* 2003; 102:1745-1752.

Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman, RM. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cellular Immunology* 1989; 118:108-125.

Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JF, Kaiserlian D. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 2003; 102(9): 3295-3301.

Faria AM, Ficker SM, Speziali E, Menezes JS, Stransky B, Verdolin BA, Lahmann WM, Rodrigues VS, Vaz NM. Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.31: 35-48,1998 –a.

Faria AM, Ficker SM, Speziali E, Menezes JS, Stransky B, Silva Rodrigues V, Vaz NM. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mechanism of Ageing and Development* 1998; 102:67-80. –b.

Faria AMC, Maron R, Ficker SM, Slavin AJ, Spahn T, Weiner HL. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor- β /interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity* 2003; 20:135-145.

Fazekas de St Groth B, Cook MC, Smith AL. The role of T cells in the regulation of B cell tolerance. *International Review in Immunology* 1997,15(1-2):73-99.

Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris S. Dendritic cells can present antigen *in vivo* in a tolerogenic or immunogenic fashion. *Journal of Immunology* 1996; 157:1406-1414.

Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM. B7-1 and B7-2 do not deliver identical co stimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially co stimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995; 2(5):523-32.

Fulcher DA, Basten A. B-cell activation versus tolerance--the central role of immunoglobulin receptor engagement and T-cell help. *Int Rev Immunol*. 1997, 15(1-2):33-52.

Gonnella P A, Chen Y, Inobe J, Komagata Y, Quartulli M, Weiner HL. In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *Journal of Immunology*; 1998; 160:4708–4718.

Hanson DG, Vaz NM, Maia LC, Hornbrook MM, Lynch JM, Roy CA. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 1977; 55(1-6):526-32.

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig, MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194 (6):769-780.

Hayday A, Viney JL. The ins and outs of body surface immunology. *Science* 2000; 290:97-100.

Henry C, Chen YU, Stout R, Swain SL. Cell Separation: Nylon Wool. In: Mishell BB and Shiigi SM eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco. WH Freeman and Company, 1980:182-185.

Hunt SV. Preparation of lymphocytes and accessory cells, In: Klaus GGB, ed. *Lymphocytes: a practical approach*. Oxford. IRL Press, 1987:1-34.

Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. *Journal of Experimental Medicine*

1990;172(2):631-40.

Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK. *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 185 (12):2133-2141.

Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type 1 interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19:225–234.

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cell as toll to induce anergic and regulatory T cells. *Trends in Immunology* 2001; 22(7):394-400.

Kalinski P, Hilgens MU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology Today* 1999; 20(12):561-567.

Kapssenberg KL. Dendritic-cell control of pathogen-driven-cell polarization. *Nature Reviews in Immunology* 2003; 3:984-992.

Kawahata K, Misaki Y, Yamauchi M, Tsunekawa S, Setoguchi K, Miyazaki J, Yamamoto K. Generation of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells from Autoreactive T Cells Simultaneously with Their Negative Selection in the Thymus and from Nonautoreactive T Cells by Endogenous TCR Expression. *Journal of Immunology* 2002; 168: 4399-4405.

Kishimoto S, Takahama T, Mizumachi H. *In vitro* immune response to the 2,4,6-trinitrophenyl determinant in aged C57Bl/6J mice: changes in the humoral immune response to, avidity for the TNP determinant and responsiveness to LPS affect with aging. *The Journal of Immunology* 1976, 116(2): 294-300.

Kitamura K, Kiyono H, Fujihashi K, Eldridge JH, Green DR, McGhee JR. Contrasuppressor cells that break oral tolerance are antigen-specific T cells distinct from T helper (L3T4+), T suppressor (Lyt-2+), and B cells. *The Journal of Immunology* 1987, 15;139(10):3251-9.

Kjaer TM, Frokiaer H. Induction of oral tolerance with micro-doses of ovomucoid depends on the length of the feeding period. *Scandinavian Journal of Immunology* 2002; 55(4):359-365.

Koch F, Trockenbacher B, Kämpgen E, Grauer O, Stössel H, Livingstone AM, Schuler G, Romani N. Antigen processing in populations of mature murine dendritic cells is caused by subsets of incompletely matured cells. *Journal of Immunology* 1995; 155:93-100.

Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. B7-1 and B7-2 co stimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995; 80(5):707-18.

Lahmann W, Menezes JS, Verdolin BA, Vaz NM. Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 1992; 25:813-821.

Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, Li L, Caprio JC, Moser M, Zaghouani H. On the role of

dendritic cells in peripheral tolerance and modulation of autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196(2):217-227.

Levin D, Constant S, Pasqualini, T, Flavell R, Bottomly, K. Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen *in vivo*. *Journal of Immunology* 1993; 151:6742-6750.

Liu L, Kuchroo VK, Weiner HL. B7.2 (CD86) but not B7.1 (CD80) costimulation is required for the induction of low dose oral tolerance. *Journal of Immunology* 1999; 163:2284-2290.

Marth T, Ring S, Schulte D, Klensch N, Strober W, Kelsall BL, Stallmach A, Zeitz M. Antigen-induced mucosal T cell activation is followed by Th1 T cell suppression in continuously fed ovalbumin TCR-transgenic mice. *European Journal of Immunology* 2000; 30:3478-3486.

Marth T, Strober W, Kelsall BL. High doses oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: Systemic neutralization of IL-12 augments TGF- β and T cell apoptosis. *Journal of Immunology* 1996; 157:2348-2357.

Mason DW, Penhale WJ, Sedgwick JD. Preparation of lymphocyte subpopulation. In: Klaus, G.G.B. *Lymphocytes: a practical approach*. Oxford IRL Press, 1987:35-54.

Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance *Nature Reviews in Immunology* 2004; 4:407-419.

Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 1990; 171:1753-1771.

Miller C, Ragheb JA, Schwartz RH. Anergy and cytokine-mediated suppression as distinct superantigen-induced tolerance mechanisms *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*. 1999; 5;190(1):53-64.

Miller, J.A.P., Morahan, G. Peripheral T cell tolerance. *Annual Review of Immunology* 1992; 10:51-69.

Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Research in Immunology* 1996; 147:49-59.

Mori T, Ishigami A, Seyama K, Onai R, Kubo S, Shimizu K, Maruyama N, Fukuchi Y. Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of senile lung Pathology *International*, 2004; 54: 167-173.

Muller G, Muller A, Tuting T, Steinbrink K, Saloga J, Szalma C, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 119(4):836-41.

Murphy MK, Heimberger BA, Loh YD. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺ CD8⁺ TCR^{lo} thymocytes *in vivo*. *Science* 1990; 250:1720-1723.

Nagler-Anderson C, Terhorst C, Bhan AK, Podolsky DK. Mucosal antigen presentation and the control of tolerance and immunity. *Trends in Immunology* 2001; 22(3):120-122.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4 (+)CD25(+) regulatory T cells is modified by cell surface-bound transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194(5):629-644.

Nunez R. Revision of the functional analysis and structural features of immortalized cell lines derived from mice lacking both type I and type II interferon receptors. *Immunology Letters* 1999; 68:173-186.

Nussenzweig MC, Steinman RM, Witmer MD, Gutchinov B. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982; 79:161-165.

Ramsdell F. Foxp3 and Natural Regulatory T Cells: Key to a Cell Lineage? *Immunity* 2003; 19:165–168.

Reis e Souza C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Seminars in Immunology* 2004; 16: 27–34.

Richman LK, Chiller JM, Brown WR, Hanson DG, Vaz NM. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *Journal of Immunology*. 1978, 121(6):2429-34.

Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, Ribeiro OG, Adriouch S, Gallois V, de Faria AM, Vargaftig BB. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2001, 24(5):518-26.

Schuler G, Lutz M, Bender A, Thurner B, Röder C, Young JW, Romani N. A guide to the isolation and propagation of dendritic cells. In: Lotze MT and Thomson AW, eds. *Dendritic cells*. San Diego. Academic Press, 1999:515-533.

Segre M, Segre D. Humoral immunity in aged mice. I. Age-related decline in the secondary response to DNP of spleen cells propagated in diffusion chambers. *The Journal of Immunology* 1976, 116:731-734.-A

Segre D, Segre M. Humoral immunity in aged mice. II. Increased suppressor T cell activity in immunologically deficient old mice *The Journal of Immunology* 1976, 116:735-738.-B.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews in Immunology* 2002; 2: 151-161.

Smith KM, McAskill F, Garside P. Orally tolerized T cells are only able to enter B cell follicles following challenge with antigen in adjuvant, but they remain unable to provide B cell help. *Journal of Immunology* 2002; 168:4318–4325-a.

Smith KM, Davidson JM, Garside P. T-cell activation occurs simultaneously in local tissue following oral administration of a range of doses of immunogenic or tolerogenic antigen although tolerized T cells display a defect in cell division. *Immunology* 2002; 106:144-158, -b.

Steger MM, Maczek C, Grubeck-Loebensteins B. Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. *Clinical and Experimental Immunology* 1996; 105:544-550.

Steinbrink K Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *Journal of Immunology* 1997; 159 (10):4772-4780.

Steinman RM, Hawiger D, Nusenweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2003; 21:685-711.

Steinman, RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review Immunology* 1991; 9:271-296.

Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Journal Experimental Medicine* 1983; 157:613-627.

Sun J, Dirden-Kramer B, Ito K, Ernst PB, Houten NV. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 1999; 162:5868–5875.

Sun J, Van Houten N. CD40 stimulation *in vivo* does not inhibit CD4⁺ T cell tolerance to soluble antigens. *Immunology Letters* 2002; 84:125-132.

Suss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligant-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183:1789-1796.

Thorstenson KM, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25⁺CD4⁺ T cells *in vivo* after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *Journal of Immunology* 2001; 167:188-195.

Trexler PC. The use of plastic in the design of an isolator system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1959; 79:29-36.

Ucelli, P. Estudo das alterações celulares e humorais relacionadas com a idade em camundongos BALB/c. Dissertação de Mestrado. -DMI-IB-UNICAMP 1998.

Van Houten N, Blake SF. Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 1996; 157:1337–1341.

Vaz NM, Imunotolerância, In: Fundamentos da Imunobiologia, eds. Bier O G, Mota I, Dias da Silva W, Vaz NM, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 1973:83-89.

Vaz NM, Maia LC, Hanson DG, Lynch JM. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1977;

60(2):110-115.

Vaz NM, Varela FJ. Self and non-sense: an organism-centered approach to immunology. *Medical Hypotheses*. 1978; 4(3):231-267.

Verdolin BA, Ficker SM, Faria AMC, Vaz NM, Carvalho CR. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001; 34:211-219.

Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells *in vivo* enhances the induction of oral tolerance. *Journal of Immunology* 1998; 160:5815-5825.

Wakabayashi A, Utsuyama M, Hosoda T, Sato K, Hirokawa K. Differential age effect of oral administration of an antigen on antibody response: an induction of tolerance in young mice but enhancement of immune response in old mice. *Mechanisms of Ageing Development* 1999; 109:191-201.

Walker LSK, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells *in vivo*. *Journal Experimental Medicine* 2003; 198:249-25.

Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FKM, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 1999; 98:47-58.

Weiner HL. Oral Tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunology Today* 1997; 18(7):335-343.

Weiner HL, Rees van EP. Mucosal Tolerance (short communication). *Immunology Letters* 1999; 69:3-4.

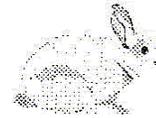
Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Reviews in Immunology* 2003; 3:199-210.

Wu XM, Nakashima M, Watanabe T. Selective suppression of antigen-specific Th2 cells by continuous micro-dose oral tolerance. *European Journal of Immunology* 1998; 28:134-142.

Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25⁺CD4⁺ Regulatory T cells by oral antigen administration. *Journal of Immunology* 2001; 167:4245-4253.

ANEXOS

1. Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal
2. Prancha n.º 1: Microscopia óptica de preparações enriquecidas de DCs de camundongos BALB/c.
3. Prancha n.º 2: Microscopia óptica de co-culturas de células T naive e DCs de camundongos BALB/c.
4. Prancha n.º 3: Microscopia eletrônica de varredura de co-culturas de células T naive e DCs de camundongos BALB/c.
5. Prancha n.º 4: Frequência do marcador de ativação CD80 nas DCs de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias.
6. Prancha n.º 5: Frequência do marcador de ativação CD86 nas DCs de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias.
7. Artigo publicado: *Scandinavian Journal of Immunology*, 60: 257-266, 2004.



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 594-1, sobre "O PAPEL DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA ORAL AO LONGO DA VIDA DE CAMUNDONGOS: ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E FENOTÍPICAS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro/Patricia Ucelli Simioni está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05 de Setembro de 2003.

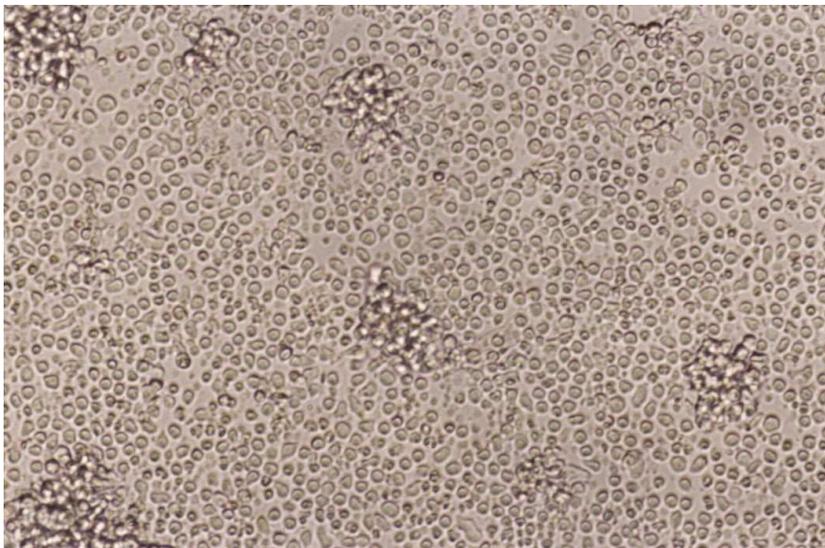
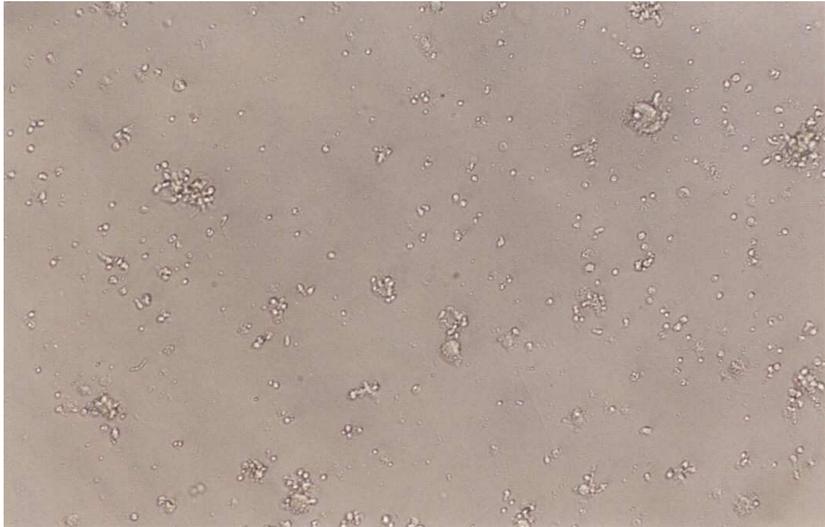
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 594-1, entitled "DENDRITIC CELL IN ORAL TOLERANCE INDUCTION DURING MICE LIFETIME", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 5, 2003.

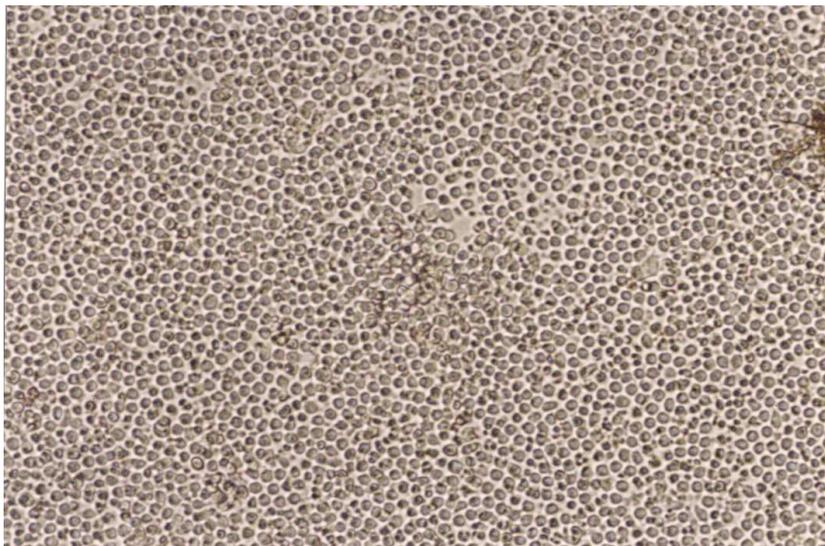
Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 05 de Setembro de 2003.

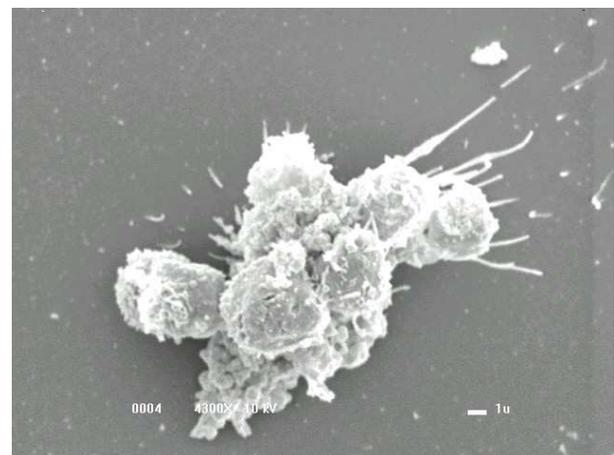
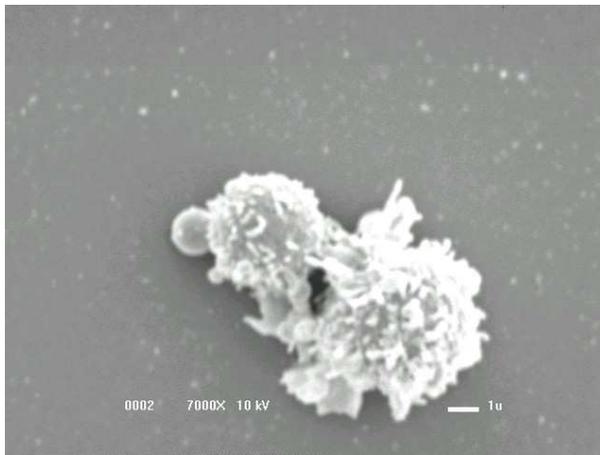
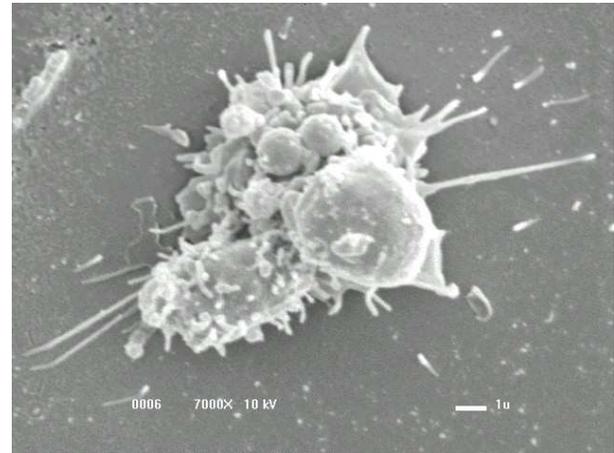
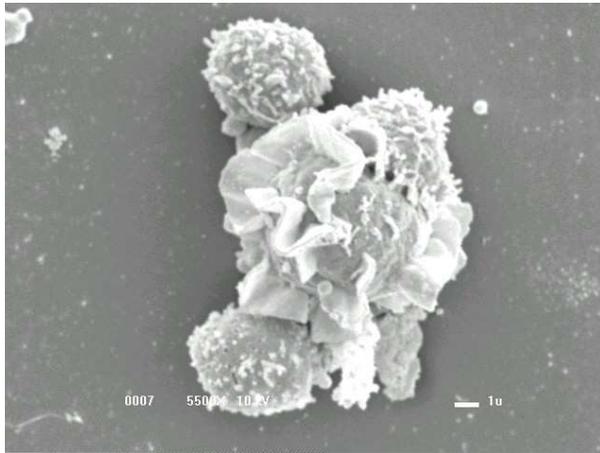
Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



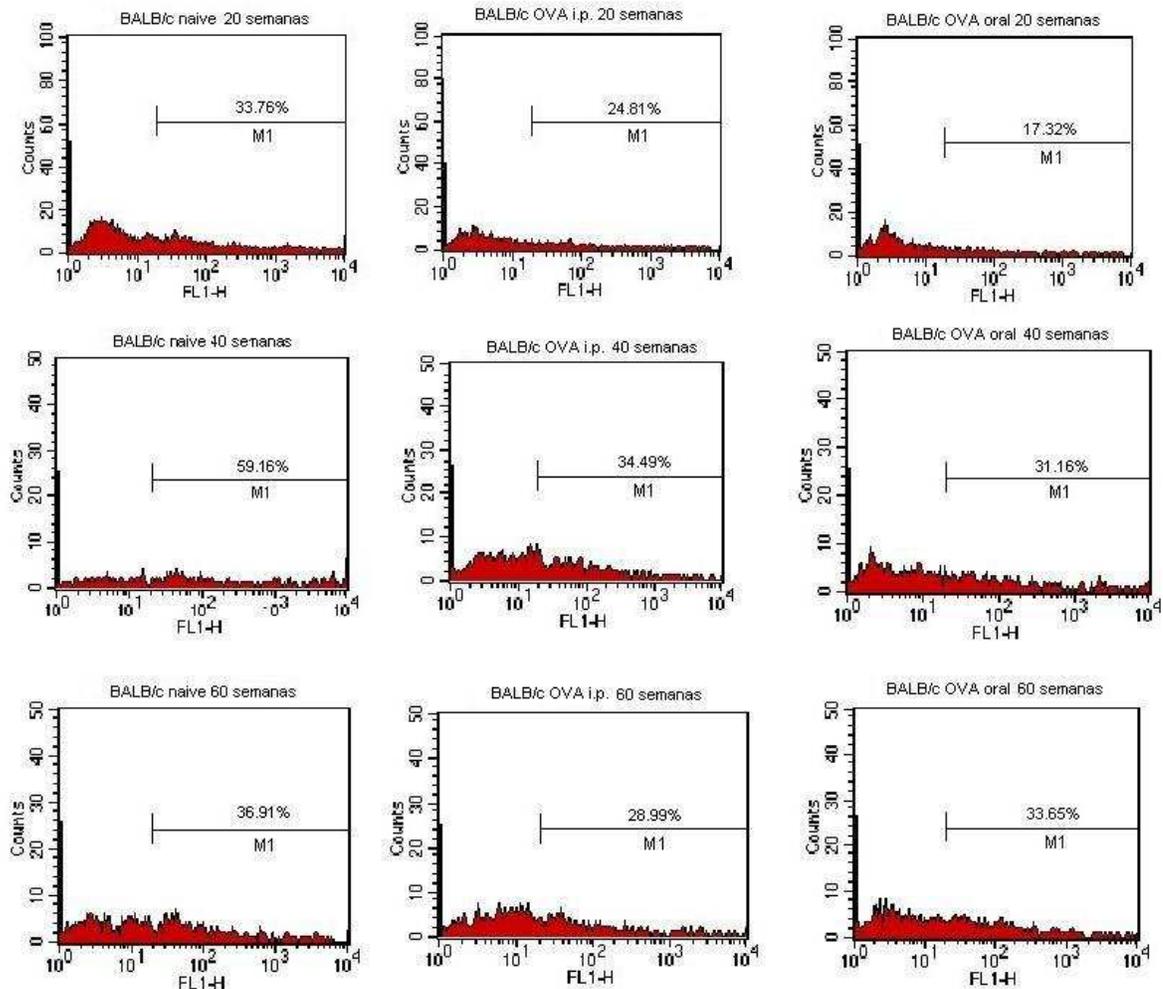
Prancha nº. 1: Microscopia óptica de preparações enriquecidas de DCs de camundongos BALB/c. Culturas de células esplênicas de camundongos BALB/c desafiados com OVA i.p. foram enriquecidas de DCs através de um protocolo de separação em gradiente de BSA ($d = 1,08$) combinado com adesão à superfície plástica, seguida por descolamento e incubação com o antígeno (OVA 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 18 horas. As culturas foram fotografadas após a incubação.



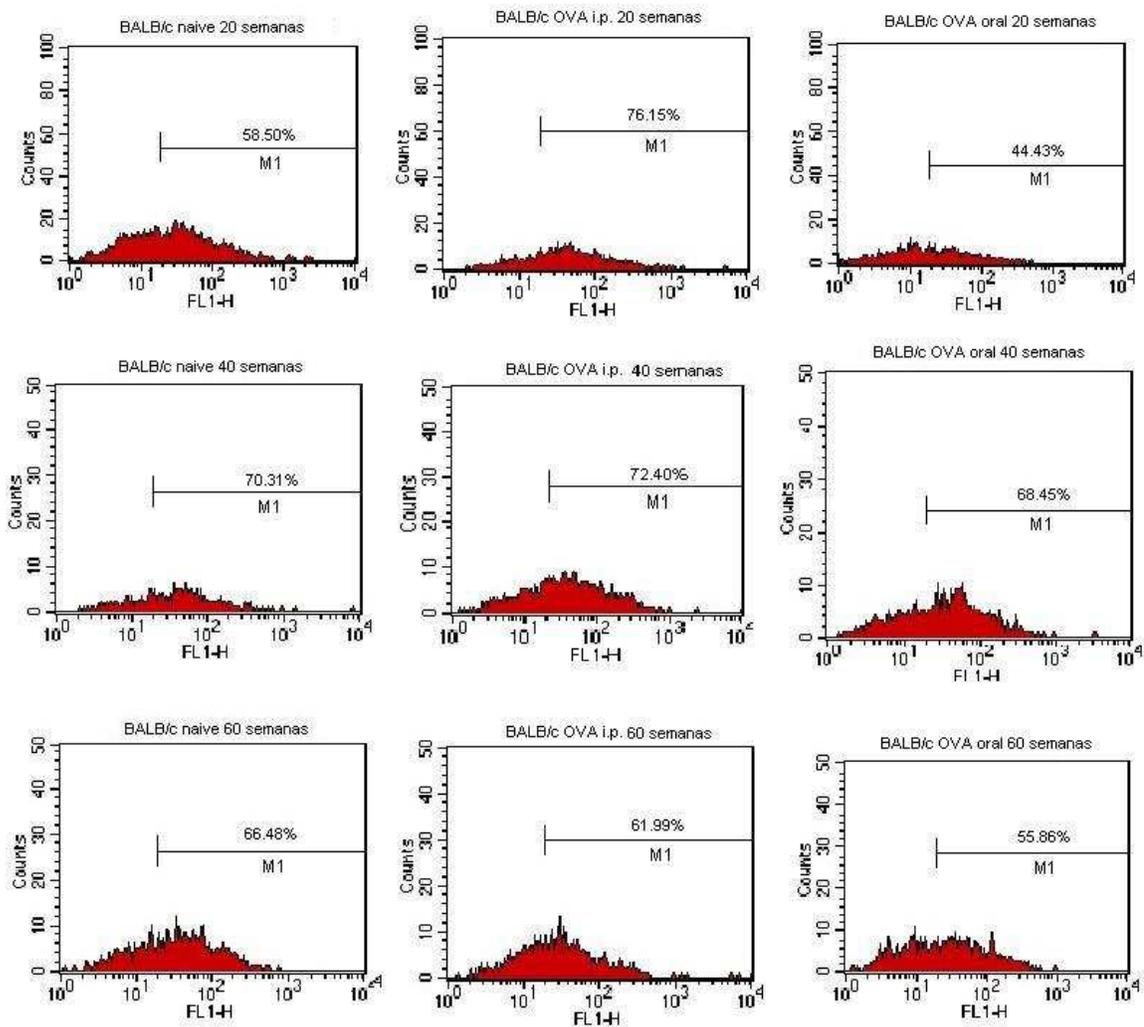
Prancha nº. 2: Microscopia óptica de co-culturas de células T naive e DCs de camundongos BALB/c. As culturas de células T de camundongos BALB/c naive ($0,5 \times 10^7$ células/mL), separadas em lâ de nylon, foram realizadas na presença de uma fração enriquecida com DCs (2×10^5 células/mL) através de um protocolo de separação em gradiente de BSA ($d = 1,08$) combinado com o de adesão ao plástico e descolamento. As DCs foram obtidas de camundongos BALB/c desafiados com OVA por via i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. As culturas foram fotografadas 24 horas após o início das co-culturas de DC e células T.



Prancha nº. 3: Microscopia eletrônica de varredura de co-culturas de células T naive e DCs de camundongos BALB/c. As culturas de células T de camundongos BALB/c naive ($0,5 \times 10^7$ células/mL), separadas em lã de nylon, foram realizadas na presença de uma fração enriquecida com DCs (2×10^5 células/mL) através de um protocolo de separação em gradiente de BSA ($d = 1,08$) combinado com o de adesão ao plástico e descolamento. As DCs foram obtidas de camundongos BALB/c desafiados com OVA por via i.p. As culturas foram estimuladas com 1 mg/mL de OVA. As culturas foram fixadas com ouro 48 horas após o início das co-culturas de DC e células T.



Prancha nº. 4: Frequência do marcador de ativação CD80 nas DCs de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias. A porcentagem de DCs expressando o marcador CD80 foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo específico (clone 16-10A1) marcado com FITC. As DCs foram enriquecidas a partir do pool de células esplênicas de camundongos BALB/c (n=5) naive (Naive) de 20, 40 e 60 semanas de idade, que ingeriram OVA e foram desafiados por via i.p. (OVA oral) ou foram apenas imunizados pela via i.p. (OVA i.p.), através de protocolo de gradiente de BSA combinado com o de adesão e descolamento. Com exceção das células não viáveis, as demais foram incluídas na análise.



Prancha nº. 5: Frequência do marcador de ativação CD86 nas DCs de camundongos BALB/c de diferentes faixas etárias. A porcentagem de DCs expressando o marcador CD86 foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo específico (clone GL1) marcado com FITC. As DCs foram enriquecidas a partir do pool de células esplênicas de camundongos BALB/c (n=5) naive (Naive) de 20, 40 e 60 semanas de idade, que ingeriram OVA e foram desafiados por via i.p. (OVA oral) ou foram apenas imunizados pela via i.p. (OVA i.p.), através de protocolo de gradiente de BSA combinado com o de adesão e descolamento. Com exceção das células não viáveis, as demais foram incluídas na análise.