

**LUIZ ANTONIO DE GENNARO**

**PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS B-1 NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção de Título de Doutor em Ciências.**

SÃO PAULO

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LUIZ ANTONIO DE GENNARO**

**PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS B-1 NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção de Título de Doutor em Ciências.**

SÃO PAULO

2007

**LUIZ ANTONIO DE GENNARO**

**PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS B-1 NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção de Título de Doutor em Ciências.**

**Orientador: Prof. Dr. Mario Mariano**

**Co-Orientador: Sandro Rogério de Almeida**

**SÃO PAULO**

**2007**

De-Gennaro, Luiz Antonio

**Participação de células B-1 na indução de tolerância oral.**/ Luiz Antonio De Gennaro. – São Paulo, 2007. xxiv 79f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia

Título em inglês: **Participation of B-1 cell in the induction of oral tolerance**

1. Células B-1a e B-1b , Indução de tolerância oral.

LUIZ ANTONIO DE GENNARO

**PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS B-1 NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL**

Presidente da Banca: Prof. Dr. Mário Mariano

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ana Flávia Popi \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Momtchilo Russo \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Ana Maria Caetano Faria \_\_\_\_\_

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Daniel Lopes

Coordenador do Programa de Pós-Graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

À minha querida esposa Sevim Deniz, confirmação de que (1+1) beira o infinito e raramente resulta somente “dois”. Grande companheira e estimuladora das minhas frenéticas aventuras acadêmicas.

Ao meu filho André pelo apoio, carinho e acima de tudo por estar sempre ao meu lado, de corpo e alma e por garantir-me a continuação nesse planeta.



Aos meus queridos pais, Luiz (*in memorium*) e Patrocinia, que com humildade e amor souberam orientar os primeiros passos da minha vida e à minha irmã Maria Cristina pelo carinho.

***Não escrevo somente com a mão:  
O pé também dá sua contribuição.***

***Firme, livre e valente ele vai  
Pelos campos e pela página.***

***Friedrich Nietzsche***

A Deus cuja presença sinto para onde quer que eu  
dirijo meu olhar.

Haverá sempre um ensinamento a cada fotograma  
da vida.

Cabe-nos, além de contemplá-los, entendê-los na  
sua plenitude.

Ao Professor Doutor Mario Mariano, exemplo a ser seguido – como mestre e principalmente como pessoa. Mostrou-me que além das palavras o “silêncio” também aponta uma direção.

Ao Professor Doutor José Daniel Lopes, exemplo de liderança, caráter e amizade. Mostrou-me que as portas sempre devem estar abertas e os ouvidos sempre atentos, pois ciência também se faz com informalidade.

Ao Professor Doutor Sandro Rogério de Almeida,  
exemplo de pessoa e grande amigo. Mostrou-me que  
simplicidade iguala as pessoas e as coloca sempre mais  
próximas.

***Mestres são aquelas pessoas crédulas que além de ensinar, despertam a curiosidade investigativa, estimulam o raciocínio reflexivo e num piscar de olhos transformam o discípulo em Mestre.***

***.... Disseminam conhecimento***

*Aos professores da Disciplina de Imunologia,*

Prof. Dr. José Daniel Lopes,

Prof. Dr. Mario Mariano,

Profa. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro,

Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri,

Profa. Dra. Zulma Fernandes Peixinho,

Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis,

Prof. Dr. Joel Machado Júnior

*Muito obrigado!*

***Amigos “sorte de quem os têm”***

***Moeda intangível que não se guarda no cofre, mas no coração.***

***Quando bem investido resulta em conselhos, companhia, lágrimas e risos, críticas,***

***longas conversas...***

***Mas, por mais simples que seja o resultado, lá estará***

***a mão estendida, “A oportunidade do carinho”***

***Amo meus amigos.***



*Ah! Quanto me ajudaram nas  
dificuldades laboratoriais.  
quantas dicas!  
quantos conselhos!  
quantas risadas!  
quantos seminários!*

Ana Flávia Popi  
Helena Cruz Oliveira  
Ricardo Toledo Russo  
Mauro Fantini  
Maiko da Cruz Palos  
Felipe Thies  
Maria Fernanda Laurindo  
Beatriz Helena Pizzaro De Lorenzo  
Ronni Rômulo Novaes e Brito  
Luiz Wanderley Mendonça Junior  
Maria Carolina Andrade de Azevedo  
Carla Cristina Squaiella  
Juliana Sekeres Mussalem  
André Bachi  
Lívia Pugliesi  
Rebecca Midory M Mendonça  
Maria da Glória Teixeira de Sousa  
Sílvia Vanessa Lourenço

*Obrigado, sinceramente!*

*Ah! ...*

*Como seria o Laboratório sem vocês?*

*....Não quero nem pensar!*

Aparecido Mendes de Oliveira

Maria Gisélia dos Santos Lopes

Creuza Rosa de Oliveira

Creusa Marina Anacleto Vieira

Geová Pereira dos Santos

Eraldina Barbosa do Nascimento

Ivone Mozat

Zélia Lordelo Pereira

Severina Antonia Neta

Kelly Carolina de Oliveira

*Muito obrigado!*

*À turma do consultório, que não só torceram por mim todo esse tempo, como também compreendeu minha “quase” infinita ausência.*

Lucilene da Silva

Fabiana Pelassa Caetano Pires de Oliveira

Daniela Seno

Claudinéia Oliveira Patrícia

Luana Beltrão de Oliveira

Rosana Pereira do Nascimento

Regina Célia Escribano Cavalcanti

Cristina Aslan Nissan Michelin

Daniella Reggiane

Kátia Terume Tanaka

Vicente Peres Infante

*Muito obrigado!*

*Aos colegas de docência, que embora carreguem  
o tributo de ensinar, nunca estão satisfeitos com o  
que sabem.*

Luciana Maltagliati

Ariana Soares Rodrigues

Alice Natsue Nishimoto

Eduardo Saba-Chujfi

Silvio Antônio S. Pereira

Fábio Sartorato

Marcus Vinícius Yamazato Kanashiro

Karina Zoppi Cunha Milani

*Muito obrigado!*

*Àqueles pequenos seres que permitem que nossas descobertas sejam  
frutíferas para a humanidade.*

***Meu mais profundo respeito!***

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O tratamento por via oral com OVA modula em, BALB/c, mas não em BALB/Xid, a reação local de hipersensibilidade. .... 23
- Figura 2:** Secções histológicas da região do coxim plantar de camundongos BALB/c controle..... 24
- Figura 3:** Secções histológicas da região do coxim plantar 30 minutos após o desafio com OVA agregada. .... 26
- Figura 4:** Secções histológicas da região do coxim plantar 6 horas após o desafio com OVA agregada. .... 27
- Figura 5:** Secções histológicas da região do coxim plantar 24 horas após o desafio com OVA agregada. .... 28
- Figura 6:** Secções histológicas da região do coxim plantar 48 horas após o desafio com OVA agregada. .... 29
- Figura 7:** O efeito do tratamento oral com OVA sobre a produção de anticorpos específicos (IgG total, IgG1 e IgG2a) em BALB/c e BALB/Xid. .... 32
- Figura 8:** O tratamento por via oral com OVA prévio à imunização suprime a resposta linfoproliferativa em camundongos BALB/c. .... 33
- Figura 9:** O efeito do tratamento com OVA por via oral sobre os níveis séricos de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4..... 35
- Figura 10:** Análise da expressão de marcadores de superfície em células de lavado peritoneal total de camundongos BALB/c doadores ..... 37

<b>Figura 11:</b> Número absoluto de células com fenótipo CD19 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> (B-1a) e CD19 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> (B-1b) que expressam IL-10 intracelular de lavado de peritônio total de camundongos BALB/c tratados ou não com OVA por via oral. ....	39
<b>Figura 12:</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de CD25 em esplenócitos de camundongos BALB/c doadores .....	41
<b>Figura 13:</b> Expressão de Foxp3 e GATA-3 em esplenócitos de camundongos BALB/c doadores .....	43
<b>Figura 14:</b> Separação eletrônica por tamanho e granulosidade de regiões correspondentes às populações de linfócitos e fagócitos.....	45
<b>Figura 15:</b> Aspecto fenotípico de células de sobrenadante de cultura de peritônio de camundongos BALB/c transferidas adotivamente para camundongos BALB/Xid .....	46
<b>Figura 16:</b> Determinação por ELISA de IL-10, TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ em sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c submetidos ou não ao tratamento oral com OVA.....	48
<b>Figura 17:</b> Células B-1 de sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c transferem tolerância a camundongos BALB/Xid .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Primers utilizados na reação de Real Time.....	19
<b>Tabela 2</b> Número absoluto de células B-1a e B-1b de peritônio total de camundongos BALB/c doadores, tratados ou não com OVA por via oral. ....	38
<b>Tabela 3.</b> Número absoluto de células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> obtidas de baço de camundongos BALB/c tratados ou não por via oral com OVA e a expressão relativa de Foxp3 e GATA-3.....	42
<b>Tabela 4.</b> Número absoluto de células com fenótipo CD19 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD23 <sup>-</sup> e CD19 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup> , obtidas de lavado peritoneal de camundongos BALB/Xid, após o 3 <sup>o</sup> e o 8 <sup>o</sup> dias da transferência adotiva de células de sobrenadante de cultura de peritônio de camundongo BALB/c.....	50



## LISTA DE ABREVEATURAS

ACF .....	Adjuvante Completo de Freund
B/c-N .....	BALB/c naive
B/c-T .....	BALB/c submetido a tratamento oral com OVA “Tolerizado”
B/c-I .....	BALB/c Imunizado com OVA
B/x-N .....	BALB/Xid naive
B/x-T.....	BALB/Xid submetido a tratamento oral com OVA “Tolerizado”
B/x-I.....	BALB/Xid Imunizado
B/x-RecN.....	BALB/Xid reconstituído com células B-1b de BALB/c naive
B/x-RecT .....	BALB/Xid reconstituído com células B-1b de BALB/c tolerizado
B/x-Recl.....	BALB/Xid reconstituído com células B-1b de BALB/c imunizado
BSA .....	Bovine Serum Albumin
CFDA-SF .....	Carboxifluoresceína diacetato, succimidil Ester
ConA .....	Concanavalina A
D.O.....	Densidade óptica
ELISA .....	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS.....	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC .....	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3 .....	Forkhead box transcription factor
IFN- $\gamma$ .....	Interferon gama
IgG total.....	Imunoglobulina G total
IgG1 .....	Imunoglobulina G1
IgG2a .....	Imunoglobulina G2a
IL-2 .....	Interleucina 2
IL-4 .....	Interleucina 4
IL-5 .....	Interleucina 5
IL-10 .....	Interleucina 10
OPD .....	Ortho phenyl enediamine
OVA.....	Ovoalbumina
PBS .....	Tampão Fosfato Salina
PE .....	Ficoeritina
RPMI .....	Meio de cultura para leucócitos. Tampão bicarbonato, suplementado com aminoácidos

R-10 ..... Meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino  
SFB ..... Soro fetal bovino  
TGF- $\beta$  ..... Fator transformador de crescimento beta

## RESUMO

**Objetivo:** Investigar a possível participação de células B-1 na indução de tolerância oral em camundongos submetidos a um regime de alimentação contínua com OVA.

**Métodos:** Camundongos fêmeos das linhagens BALB/c e BALB/xid, entre 6 e 8 semanas, foram utilizados na formação de 9 grupos experimentais, composto respectivamente pelos grupos de animais tratados previamente com OVA por via oral, (**B/c-T** e **Bx-T**); grupo de animais que não receberam tratamento oral com OVA mas foram imunizados, por via s.c. com OVA emulsificada (1:1) em Adjuvante completo de Freund (**B/c-I** e **B/x-I**); grupo de animais que foram somente desafiados com OVA agregada (**B/c-N** e **B/x-N**); grupos **B/x-recN**, **B/x-recT** e **B/x-recI** compostos por camundongos BALB/Xid reconstituídos por transferência adotiva com células B-1 do sobrenadante de cultura de células aderentes peritoneais de camundongos BALB/c *naive*; tolerizados e imunes, respectivamente. Esses animais receberam transferência adotiva de células B-1 três dias antes da imunização. A resposta foi avaliada por: a) reação inflamatória local; b) linfoproliferação pela incorporação de <sup>3</sup>[H]Timidina e c) determinação por ELISA de imunoglobulinas anti-OVA das subclasses (IgG total, IgG1 e IgG2a).

**Resultados:** Em camundongos BALB/c o tratamento oral com OVA previamente à imunização foi capaz de suprimir reação local de hipersensibilidade e resposta celular muito embora esse efeito não tenha sido observado em camundongos BALB/Xid submetidos ao mesmo tipo de tratamento. No entanto, quando camundongos BALB/Xid foram transferidos adotivamente com células de sobrenadante de cultura celular de peritônio de camundongos BALB/c tolerizados,

que esses animais desenvolveram supressão da reação local de hipersensibilidade e supressão da resposta celular.

**Conclusão:** Células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c doadores, submetidos ao tratamento oral com OVA, foram eficazes em promover a supressão da reação de hipersensibilidade local e da resposta celular linfoproliferativa, mas não a de produção de anticorpos, quando adotivamente transferidas para camundongos BALB/Xid, refratários a indução de tolerância oral.

## **ABSTRACT**

**Purpose:** To investigate a possible participation of B-1 cells in inducing oral tolerance in mice submitted to continuous feeding with OVA.

**Methods:** Female mice of the BALB/c and BALB/Xid lineages, aged 6 to 8 weeks, were divided into 9 groups and submitted to the following conditions: previous oral treatment with OVA (B/c-T and Bx-T); without oral treatment with OVA, but with subcutaneous immunization with OVA emulsion (1:1) in complete Freund's adjuvant (B/c-I and B/x-I); challenge with aggregated OVA only (B/c-N and B/x-N); adoptive transfer (rebuilding), to BALB/Xid mice, of B-1 cells in culture supernatant with peritoneal adherent cells from naïve BALB/c mice (B/x-recN, B/x-recT, and B/x-recI); made tolerant and immune, respectively. These animals received adoptive transfer of B-1 cells three days prior to immunization. The immune responses were evaluated by means of: a) local inflammatory response; b) lymphoproliferation by incorporation of <sup>3</sup>[H]Thymidine and c) determination of anti-OVA immunoglobulin (subclasses total IgG, IgG1, and IgG2a) by ELISA.

**Results:** Oral treatment with OVA prior to immunization suppressed the local hypersensitivity reaction and cellular response in BALB/c mice, although this effect was not observed in BALB/Xid mice in the same conditions. However, when BALB/Xid mice were reconstituted with cultured cells from tolerized peritoneal BALB/c mice, the suppression of local hypersensitivity and cellular response were observed.

**Conclusion:** B-1 cells from BALB/c mice orally treated with OVA caused phenotypic and functional changes and suppression of cellular response local and

linfoproliferative and local hypersensitivity reaction when adoptively transferred to BALB/Xid mice refractory to induction of oral tolerance.

## SUMÁRIO

Dedicatória .....	ii
Agradecimentos.....	v
Lista de figuras .....	xvi
Lista de tabelas .....	xviii
Lista de abreviaturas .....	xix
Resumo .....	xxi
Abstract .....	xxiii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 Objetivos.....	6
3 MÉTODOS .....	7
3.1 Animais.....	7
3.2 Reagentes .....	7
3.3 Indução de tolerância oral .....	8
3.4 Imunização .....	8
3.5 Desafio .....	9
3.6 Reação de hipersensibilidade.....	9
3.7 Histologia.....	9
3.8 Células.....	10
3.8.1 Cultura de células aderentes de peritônio. ....	10
3.8.2 Esplenócitos .....	10
3.9 Ensaio proliferativo de células linfóides .....	11
3.10 Ensaio de detecção de anticorpos específicos para OVA .....	12
3.11 Citometria de Fluxo .....	13
3.11.1 Análise da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo .....	13
3.11.2 Análise de citocinas séricas (IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ).....	14
3.11.3 Análise de IL-10 intracelular de células totais de peritônio de camundongos BALB/c .....	15

3.12	Determinação por ELISA de IL-10, TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ presentes no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes.....	16
3.13	Análise da expressão de Foxp3 e GATA 3 em células de baço .....	17
3.14	Análise estatística.....	20
3.15	<i>Rationale</i> do modelo experimental .....	21
4	RESULTADOS .....	22
4.1	Camundongos BALB/c e BALB/Xid respondem diferentemente quando tratados com OVA por via oral previamente à imunização.....	22
4.2	Características fenotípicas e funcionais de células de lavado de peritônio total de camundongos BALB/c doadores .....	36
4.3	Características fenotípicas e funcionais de células de sobrenadante de cultura de células aderentes de peritônio de camundongos BALB/c doadores .....	44
4.4	Camundongos BALB/Xid, quando reconstituídos com células B-1 de BALB/c, adquirem capacidade de suprimir reação local de hipersensibilidade e resposta celular linfoproliferativa, mas não a de produção de anticorpos específicos. ....	49
5	DISCUSSÃO .....	54
6	CONCLUSÕES .....	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
8	PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA.....	79





## 1. INTRODUÇÃO

Está definido na literatura que populações de linfócitos, a partir de seus precursores na medula óssea, passam por processos complexos de amadurecimento. Proliferação das linhagens precursoras, recombinação e expressão dos genes do receptor, seleção positiva e negativa do repertório celular são processos que garantirão aos linfócitos adquirirem aspectos fenotípicos e funcionais que os caracterizam como células maduras distintas, as quais irão habitar, entre outros tecidos do organismo, os órgãos linfóides secundários (Mackay, 2000; Starr et al., 2003).

Por um lado, a tolerância central é o principal mecanismo responsável pela eliminação de linfócitos auto-reativos nos órgãos linfóides primários e a tolerância periférica desempenha um importante papel na manutenção de um estado de não resposta imune aos antígenos próprios expressos em tecidos periféricos (Mackay, 2000). Por outro lado, tolerância oral é uma forma de tolerância periférica em que linfócitos maduros em órgãos linfóides secundários tornam-se suprimidos a um determinado antígeno exógeno quando este é previamente administrado por via oral (Mowat et al., 2004; Strobel, 2001). Assim a captação do antígeno pela mucosa intestinal desempenha papel fundamental na fisiologia e homeostase desse tecido, prevenindo-o de reações de hipersensibilidade (Mowat, Parker et al., 2004); (Nagler-Anderson et al., 2001).

Tolerância oral foi referida pela primeira vez por Besredka em 1909 num estudo de sensibilização anafilática a proteínas do leite e mais tarde intensamente estudada por Well e Osborne em 1911, citado por Mowat, Parker et al., (2004). No entanto, os mecanismos pelos quais ocorre a supressão sistêmica da resposta imune a um antígeno, seja ele de natureza microbiana ou alimentar, quando ofertado por via oral,

ainda são pouco compreendidos. Admite-se que tolerância oral seja de natureza antígeno-específica, e a indução de linfócitos reguladores, que pode tanto suprimir a resposta imune, como induzir anergia ou deleção clonal de células reativas àquele determinado antígeno, está na dependência da natureza, solubilidade e dose do antígeno administrado por via oral (Faria et al., 2005; Kagnoff, 1982; Mowat, Parker et al., 2004).

Muito embora, estudos mostrem que a administração por via oral ou nasal de antígeno seja capaz de induzir células reguladoras a suprimir doenças auto-imunes e não auto-imunes em modelos animais, nada é conhecido sobre a participação de células B-1 no processo de indução de tolerância oral, uma vez que inúmeros trabalhos têm relacionado a atividade dessas células com doenças auto-imunes (Duan et al., 2006; Hardy, 2006; Murakami et al., 1995a; Murakami et al., 1995c).

Células B convencionais (B-2) e células B-1 são derivadas de precursores distintos que surgem na fase fetal e neonatal de camundongos. Progenitores distintos para células B-1a, B-1b e B-2 foram identificados em estágios precoces da linfopoese. Células progenitoras com fenótipo  $\text{Lin}^- \text{CD45}^{\text{lo-neg}} \text{CD19}^+$  isoladas do fígado fetal originam células B-1a, enquanto progenitores de mesmo fenótipo, isolados da medula óssea de animais adultos, originam células B-1b, as quais são raras no fígado fetal mas podem ser facilmente isoladas da medula óssea. Já, células precursoras com fenótipo  $\text{CD45}^+ \text{CD19}^-$  isoladas de medula óssea de animais adultos originam células B convencionais. No entanto, na vida pós-natal, células B convencionais são produzidas intensamente a partir destes precursores da medula óssea, ao passo que o maior desenvolvimento de células B-1 se dá na vida fetal e imediatamente pós-natal (Kantor et al., 1993; Montecino-Rodriguez et al., 2006a; Montecino-Rodriguez et al., 2006b).

As células B-1 foram encontradas primeiramente em cavidades serosas como o peritônio e foram identificadas pela expressão de altos níveis de IgM e baixos níveis de CD45/B220 e IgD, além de expressarem o marcador mielóide CD11b/Mac-1 (Herzenberg et al., 1986). Estas células estão subdivididas em três sub-populações e se caracterizam pela expressão ou não de CD5 e CD11b. Células B-1a e B-1b expressam CD11b, mas somente células B-1a expressam CD5 de superfície, ao passo que células B-1b não o fazem (Hayakawa et al., 2000). Já, células B-1c são CD11b<sup>-</sup> CD5<sup>+</sup> (Hastings et al., 2006). Entretanto, CD11b/Mac1 e CD5 deixam de ser expressos quando essas células migram da cavidade peritoneal para outros tecidos e somente células B-1 do baço expressam CD21 (Tung et al., 2007).

A subpopulação de células B-1 representa 1 a 5% da população de células B, constituindo-se numa pequena fração das células B do baço, Linfonodos e lâmina própria do intestino, mas é a principal população de células B nas cavidades pleural e peritoneal. Funcionalmente estas células participam da resposta inata por produzir a maioria dos anticorpos IgM do soro (Duan & Morel, 2006; Hardy, 2006; Hayakawa & Hardy, 2000; Tung & Herzenberg, 2007) Muito embora células B-1a e B-1b apresentem características funcionais diferentes, são complementares. As células B-1a produzem anticorpos naturais com a propriedade de reconhecer antígenos próprios e são críticas no reconhecimento de bactérias extracelulares na resposta imune inata. Por outro lado, anticorpos produzidos por células B-1b são induzidos após exposição antigênica e são importantes na imunidade duradoura, pois são capazes de se diferenciar em células de memórias secretoras de IgM, o que mostra sua importância na produção de anticorpos tanto na infecção como também na re-infecção. Dessa maneira a rápida resposta contra antígenos exógenos e endógenos, assegurada pela produção de anticorpos polirreativos, além de prevenir a disseminação de patógenos no organismo, remove

rapidamente da circulação auto-antígenos, diminuindo o nível sérico destes, na forma livre (Alugupalli et al., 2004; Haas et al., 2005; Zhou et al., 2004)

A par dos dados apresentados acima e do fato de populações de células B polirreativas se distribuírem amplamente em diversos órgãos linfóides, apresentarem-se em alto número em adultos (Zhou & Notkins, 2004), predominarem em recém nascidos (Chen et al., 1998) e ainda possuírem capacidade de apresentar antígenos às células T, sem a ativação de moléculas co-estimulatórias B7-1, B7-2 (Wang et al., 2001), foi sugerido que células B polirreativas possam desempenhar um papel importante na indução e manutenção da tolerância imunológica periférica. No entanto, como ficou demonstrado que células B-1 peritoneais constituem o maior percentual de células B polirreativas (Zhou & Notkins, 2004) e, que estas células saem da cavidade peritoneal e migram para sítios inespecíficos de inflamação (Almeida et al., 2001), muito provavelmente estas células participem no processo de indução e manutenção da tolerância periférica. Realça essa hipótese o fato que em nosso laboratório, recentemente, foi demonstrado que células B-1 primadas, quando adotivamente transferidas para camundongos BALB/Xid, depletados de células B-1, foram capazes de suprimir resposta imune em modelo de hipersensibilidade (De Lorenzo et al., 2007), (*in-press*).

Partindo do pressuposto que células B-1 migram para sítios inflamatórios, participam da tolerância periférica e são capazes de suprimir resposta de hipersensibilidade, restava saber se camundongos BALB/Xid, que apresentam uma mutação pontual no gene *btk*, (Rawlings et al., 1993; Thomas et al., 1993), o que leva à redução de aproximadamente 50% no número de células B-2 e severa redução da população de células B-1, mantêm as mesmas características apresentadas pelos animais selvagens BALB/c (Kerner et al., 1995; Khan et al., 1995). Com base nessas

informações, o objetivo do presente trabalho foi o de estudar a eventual participação de células B-1 na indução de tolerância oral.

## **2. OBJETIVOS**

Muito embora a literatura científica nas duas últimas décadas tenha se empenhado em explicar os diversos aspectos relacionados a células B-1, estudos ainda são necessários para se compreender de forma definitiva a origem e fisiologia dessas células.

O objetivo deste trabalho foi investigar a possível participação de células B-1 na indução de tolerância oral em camundongos submetidos ao regime de alimentação contínua com OVA, previamente a imunização.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos fêmeos das linhagens BALB/c e BALB/Xid – de 6 a 8 semanas de idade - fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME), da UNIFESP e pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP, respectivamente. Esses animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Imunologia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da UNIFESP em ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados, em microisoladores, com água e ração autoclavados em livre demanda, até o momento dos ensaios.

Os grupos utilizados nos experimentos foram constituídos por um número mínimo de 5 camundongos.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – UNIFESP (CEP n° 0096/05).

#### **3.2 - REAGENTES BIOLÓGICOS**

Ovalbumina (OVA) “grau II” (*Sigma Chemical, ST. Louis, MO, USA*) foi utilizada nos protocolos de indução de tolerância oral, imunização, desafio e estimulação de células *in-vitro*.

Concanavalina A (ConA) (*Sigma Chemical, ST. Louis, MO, USA*) foi utilizada como mitógeno para linfócitos de baço em cultura.



Adjuvante completo de Freund (ACF - *Sigma Chemical, ST. Louis, MO, USA*) associado ao antígeno OVA, foi utilizado na imunização dos animais sob forma de emulsão

### **3.3 - INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL**

Para indução de tolerância oral, uma solução de OVA a 4mg/mL foi oferecida *ad-libitum* aos camundongos BALB/c e BALB/Xid por 5 dias consecutivos, cuja a ingestão total média nesse período foi estimada em 100 mg/mL de OVA (Faria et al., 2003). Os camundongos BALB/c e BALB/Xid não submetidos à indução de tolerância oral com OVA receberam somente água nesse período. Sete dias após a interrupção do tratamento oral, todos os animais foram imunizados.

### **3.4 - IMUNIZAÇÃO**

Camundongos BALB/c e BALB/Xid submetidos ou não ao tratamento oral com OVA, foram imunizados 7 dias após o último dia da tolerização, por via subcutânea (s.c.) na base da cauda, com 40 µL de OVA a 2,5% emulsificada 1:1 em ACF, correspondendo a 100 µg de OVA por animal (Faria, Maron et al., 2003; Jacysyn et al., 2001).

Camundongos BALB/Xid, 3 dias após a reconstituição com células de sobrenadante de cultura de células peritoneais de animais BALB/c previamente tratados ou não com OVA por via oral foram imunizados de acordo com o mesmo protocolo.

### **3.5 - DESAFIO**

Para o desafio antigênico, OVA grau II foi diluída em uma solução salina a 0,9% e transferida para tubo de fundo cônico tipo *Falcon*. A OVA na concentração de 25 mg/mL foi agregada durante 2 minutos a 100°C. No final desse período, foram adicionados 5 vezes o volume inicial de solução salina e a suspensão homogeneizada. O tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C, sendo esse procedimento repetido por 5 vezes. Finalmente, o sobrenadante foi removido e a OVA agregada ressuspendida no volume original. Tendo em vista que a quantidade de OVA solúvel (não agregada) no sobrenadante era de cerca de 20%, a concentração final de OVA agregada foi considerada 20 mg/mL.

### **3.6 - REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE**

Para provocar reação de hipersensibilidade a OVA, os animais que receberam ou não tratamento por via oral com OVA, após 14 dias da imunização foram desafiados no coxim plantar (pata esquerda), com 30 µL de uma suspensão de 600 µg/mL de OVA agregada e 30 µL de solução salina estéril na pata contralateral. As patas foram medidas nos intervalos de 0,5; 3; 6; 9; 24; 48 e 72 horas após o desafio com o auxílio de um “paquímetro” (*Mitutoyo Mfg. Co. Ltd. Tokyo, Japan*). O aumento da espessura da pata foi obtido pela diferença entre as medidas da pata esquerda e direita (Jacysyn, Abrahamsohn et al., 2001).

### **3.7 - HISTOLOGIA**

Nos intervalos de tempo: 0; 0,5; 6; 24 e 48 horas, as patas foram removidas e acondicionadas em tubos *Falcon* de 15 mL contendo formol a 10% em volume de aproximadamente 5 vezes o da peça a ser fixada. O material foi mantido em formol

durante 24 horas. Após esse período, o formol foi desprezado e as patas mantidas em álcool a 70%. O material foi então incluído em parafina e cortes com 7 micras de espessura, depositados em laminas de vidro, foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E).

### **3.8 – CÉLULAS**

#### **3.8.1 - Cultura de células aderentes de peritônio**

Células B-1 foram obtidas segundo protocolo descrito por (Almeida, Aroeira et al., 2001). Células da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c foram coletadas por lavagem com 5 mL de meio de cultura RPMI – 1640 (*Sigma St Louis, MO*). A suspensão celular foi colocada em placas de vidro ou plástico de 15 cm de diâmetro que foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 40 minutos. Após incubação, o sobrenadante das culturas foi descartado para a remoção de células não aderentes. Em seguida, adicionou-se meio de cultura R10 (RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino). As células aderentes foram mantidas em cultura por 5 dias nas mesmas condições mencionadas. Após esse período as células do sobrenadante (93% de células B-1) foram colhidas, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e ressuspensas em RPMI 1640 cuja concentração celular foi previamente ajustada para 1x10<sup>6</sup> células para cada 200 µL do meio. Posteriormente, estas células foram inoculadas por via intra-peritoneal em camundongos BALB/Xid para a reconstituição dos mesmos com células B-1.

#### **3.8.2 - Esplenócitos**

Quatorze dias após a imunização, o baço dos animais BALB/c e BALB/Xid, tratados ou não com OVA por via oral foram retirados em condições assépticas e

macerados em meio RPMI 1640. As células foram ressuspensas em tampão hemolítico estéril e centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm para lise das hemácias. O botão celular foi lavado duas vezes em meio RPMI e ressuspenso em meio R10 (RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino). A concentração celular foi definida com auxílio de câmara de Neubauer e o teste de viabilidade foi feito utilizando azul de Trypan a 0,2%.

Baços de camundongos BALB/Xid reconstituídos com células de sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c tolerizados ou não, foram retirados 5 dias após a imunização e o protocolo experimental foi executado conforme acima descrito.

### **3.9 - ENSAIO PROLIFERATIVO DE CÉLULAS LINFÓIDES**

A suspensão celular obtida de baço, conforme descrito acima foi ajustada de modo a conter  $5 \times 10^5$  células por poço em placas de 96 poços, de fundo chato (*Costar Cambridge, MA*) em volume de 150  $\mu$ L. Suspensões de células de baço de animais dos diversos grupos foram cultivadas em meio R10 (RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino) ou em concentrações pré-determinadas de OVA (100  $\mu$ g/mL) ou ConA (20  $\mu$ g/mL), respectivamente, por 96 horas em estufa a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>.

As culturas foram pulsadas 18 horas antes da leitura com 1,0  $\mu$ Ci/poço de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-TdR, *methyl-<sup>3</sup>H-Thymidine – Amershan International, USA*) e coletadas em “cell harvester” (*Cambridge Technology Inc., Wabtown, MA, USA*). Depois da secagem dos filtros, estes foram colocados em líquido de cintilação e contados em aparelho de radiação (*Beckman L S 100 C*). Os resultados foram expressos como “Índice de Estimulação” (IE), isto é, razão das contagens/minuto de cada amostra/poço pela

média aritmética das contagens/minutos das amostras controles, acompanhadas de desvio padrão.

### **3.10 - ENSAIO DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA OVA**

O sangue de camundongos BALB/c e BALB/Xid imunizados, submetidos ou não a tratamento oral com OVA e BALB/Xid reconstituídos e seus controles foram coletados do plexo retro-orbital 1 dia antes e 7 dias após o desafio com OVA agregada. O soro de 2 a 4 camundongos, obtido por centrifugação, foi armazenado em *pools* a -20°C até o momento do uso, quando os níveis de anticorpos específicos para OVA das subclasses IgG total, IgG1 e IgG2a foram determinados por ELISA (Simioni et al., 2004)

Para a reação de ELISA, as placas (*Costar Cambridge, MA*) foram sensibilizadas com 4 µg de OVA por poço, diluídos em 100 µL de PBS. A placa sensibilizada permaneceu na estufa a 37°C por um período de 2 horas, seguido de incubação *overnight* a 4°C.

Após a retirada da solução de sensibilização, realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos, incubando-se as placas por 1 hora à temperatura ambiente (TA) com 100 µL/poço de PBS-BSA a 1%. Os orifícios foram então submetidos a 3 etapas de lavagem com 200 µL de PBS-Tween 20 a 0,05%, acrescentando-se em seguida 100 µL/poço das amostras de soro em duplicatas, diluídas em PBS de 1:100 até 1:12.800. Após a incubação por 30 minutos em estufa a 37°C, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL de PBS-Tween 20 a 0,05% e acrescidas de 100 µL/poço dos seguintes anticorpos monoclonais diluídos em PBS: anti-IgG conjugado a peroxidase (1:2.000), anti-IgG1 e anti-IgG2a biotinilados (1:4.000). As placas permaneceram em estufa a 37°C por mais 1 hora, e os poços foram novamente lavados 3 vezes com 200 µL de PBS-Tween 20 a 0,05%. As reações para dosagem de IgG total, nas quais foi utilizado

anticorpo conjugado a peroxidase, foram em seguida reveladas como descrito abaixo. Já, nas placas em que foram utilizados anticorpos biotinizados, foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$ /poço de estreptoavidina conjugada a peroxidase, diluída a 1:4.000 em PBS, incubando-se por 30 minutos à TA e lavando-se em seguida por 3 vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS-Tween 20 a 0,05%. Todas as reações foram reveladas pela adição de 100  $\mu\text{L}$ /poço de substrato Ortho phenyl enediamine (*OPD* - *Sigma*), incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

As reações foram então interrompidas com 50  $\mu\text{L}$ /poço de solução de parada,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 4N, e a densidade óptica (D.O.) das mesmas foi determinada em espectrofotômetro (*Titertek Multiskan MCC/340*) em comprimento de onda de 492 nanômetros ( $A_{492\text{nm}}$ ).

### **3.11 – CITOMETRIA DE FLUXO**

#### **3.11.1 – Análise da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo**

Esplenócitos, células peritoneais recém coletadas e células de sobrenadante de cultura celular de peritônio, obtidas como descrito anteriormente, foram ajustadas para  $1 \times 10^6$  células/alíquota, centrifugadas e ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA 1%. Cada alíquota foi incubada previamente com anti CD16/CD32 (Pharmingen) para bloqueio do receptor para  $\text{Fc}\gamma$  II e III. Os tubos foram mantidos a 4°C por 30 minutos.

Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas novamente em PBS-BSA 1% e cada alíquota, incubada com anticorpos monoclonais adequados para a análise dos marcadores de superfície. Para células de lavado peritoneal bem como células de sobrenadante de cultura celular de peritônio, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais (Pharmingen): anti-CD23 de camundongo feito em rato

conjugado a fluoresceína (FITC), anti-CD19 de camundongo feito em rato conjugado a ficoeritrina (PE), anti-CD5 de camundongo feito em rato conjugado a proteína clorofil peridina (PerCP) e anti-CD11b de camundongo feito em rato conjugado a aloficocianina ( APC). Para as células de baço foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 de camundongo feito em rato conjugado a ( APC), anti-CD4 de camundongo feito em rato conjugado a (PE) e anti-CD25 de camundongo feito em rato conjugado a (FITC).

As células foram incubadas com os anticorpos marcados com os fluorocromos por 1 hora em banho de gelo. Após a incubação, foram novamente lavadas e ressuspensas em 1 mL de paraformaldeído 1% por uma hora. No momento da análise das amostras pelo citômetro, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de PBS e colocadas em tubos para FACS mantidos em banho de gelo.

Para a determinação das populações celulares, cada alíquota foi marcada com a combinação de anticorpos conjugados a fluorocromos diferentes. As células foram separadas eletronicamente em *gates* e a expressão dos marcadores foram determinados respeitando a fluorescência obtida com os isotipos controles.

### **3.11.2 Análise de citocinas séricas (IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ )**

O sangue de camundongos BALB/c, BALB/Xid imunizados, submetidos ou não a tratamento oral com OVA e BALB/Xid reconstituídos e seus controles foram coletados do plexo retro-orbital 7 dias após o desafio com OVA agregada, conforme previamente descrito.

O procedimento para determinação dos níveis séricos de interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) foi realizado pelo método CBA de acordo com o protocolo preconizado pelo fabricante do *kit BD Biosciences – Mouse Th1/Th2*

*cytokine CBA*<sup>™</sup> A análise por citometria de fluxo foi executada utilizando-se FACSCalibur<sup>™</sup>, ( *BD Biosciences, San Jose, CA - USA*).

### **3.11.3 Análise de IL-10 intracelular de células totais de peritônio de camundongos BALB/c.**

Para análise da produção intracelular de IL-10, camundongos BALB/c tratados ou não por via oral com OVA, receberam 13 dias após a imunização, um pulso de 200 µL, por via intraperitoneal (i.p.), de uma solução de OVA a 50 µg/mL. Um dia após esse procedimento, 2 a 4 animais de cada grupo foram sacrificados e as células da cavidade peritoneal coletadas com aproximadamente 5 mL de PBS. Uma alíquota de  $2 \times 10^6$  células, obtida de cada grupo, foi marcada com anticorpos (*Pharmingen*): anti-CD19 (PE), anti-CD11b (APC) e antiCD5 (PercP), conforme previamente descrito. Após incubação com os respectivos anticorpos, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 500 µL de uma solução de paraformaldeído a 1% (PFA 1%) e mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos. Findo esse período, as células foram novamente lavadas com PBS.

Para permeabilização e marcação intracelular, as células foram ressuspensas em 200 mL de TritonX-100 a 0,2% em PBS e mantidas a temperatura ambiente por 6 minutos. Um novo ciclo de lavagem com PBS precedeu a marcação intracelular com anticorpo anti-IL-10 de camundongo feito em rato conjugado a fluoresceína (FITC-*Pharmingen*). As células foram incubadas por 1 hora em banho de gelo. Finalmente as células foram lavadas e ressuspensas em 500 µL de paraformaldeído 1% por 1 hora. No momento da análise das amostras pelo citômetro, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de PBS e colocadas em tubos para FACS. Os resultados foram expressos em número absoluto de células/mL que expressaram IL-10. As células B-1a



e B-1b foram identificadas como CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>, respectivamente.

### **3.12 – DETECÇÃO POR ELISA DE IL-10, TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ PRESENTES NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS PERITONEAIS ADERENTES.**

Camundongos BALB/c submetidos ou não ao tratamento por via oral com OVA foram sacrificados 14 dias após a imunização, e células foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal com aproximadamente 5 mL/animal de RPMI 1640. Cultura de células peritoneais foi executada conforme procedimento previamente descrito. Após 5 dias de cultura, alíquotas do sobrenadante foram colhidas para ensaio imunoenzimático em que se determinou a concentração de IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ .

Para dosagem das diversas citocinas foi utilizado o mesmo protocolo, diferenciando apenas os anticorpos e suas concentrações. Para IL-10 e IFN- $\gamma$  utilizaram-se reagentes e anticorpos da Pharmingen e para TGF- $\beta$  da BD Biosciences. Placas de ELISA (*Costar Cambridge, MA, USA*) foram sensibilizadas com anticorpo de captura (50  $\mu$ L/poço), diluído em PBS e seguidamente as placas foram incubadas a 4°C *overnight*. Após esse período, as placas foram lavadas por 3 vezes com 200  $\mu$ L de uma solução PBS-Tween 20 à 0,05% e, em seguida bloqueadas com uma solução de PBS-BSA 1%, em volume de 50  $\mu$ L/poço, por 2 horas à TA. A seguir as placas foram novamente lavadas por 3 vezes. Seguidamente as amostras (50  $\mu$ L/poço) foram adicionadas e mantidas à TA por 2 horas. As curvas padrão para ensaio de IL-10 e IFN- $\gamma$  variaram de 4.000 pg/mL até 3,91 pg/mL e para TGF- $\beta$ , de 500 pg/mL até 3,91 pg/mL. Findo o período de incubação, procedeu-se um novo ciclo de lavagem e anticorpos de detecção, diluídos de acordo com instrução dos fabricantes, foram adicionados (50  $\mu$ L/poço) e mantidos à TA por mais 2 horas. Para todos os testes foi

usado conjugado enzimático estreptoavidina-peroxidase, 1:4.000 para IL-10 e IFN- $\gamma$  (Pharmingen) e 1:250 para TGF- $\beta$  (BD Biosciences), que foi adicionado (50  $\mu$ L/poço) após lavagem. As placas foram mantidas à TA por 30 minutos e lavadas seguidamente.

A reação foi revelada com a adição de 50  $\mu$ L/poço de uma solução de citrato com 0,1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Sigma) e 10  $\mu$ g de Ortho phenyl enediamine (*OPD - Sigma*) por aproximadamente 30 minutos a TA e ao abrigo da luz. Para interromper a reação, 25  $\mu$ L/poço de solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N foi dispensada em cada poço.

A densidade óptica (D.O.) foi medida em leitor de placa de ELISA (*Titertek Multiskan MCC/340*) a 492 nm e as concentrações das citocinas nas amostras testadas foram calculadas pela equação da reta, obtida com os dados da curva padrão.

### **3.13 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *Foxp3* e GATA-3 EM CÉLULAS DE BAÇO**

Análise da expressão de *Foxp3* e GATA-3 foi executado como descrito por (Pfaffl et al., 2002). Para quantificar a expressão de *Foxp3* em esplenócitos, 14 dias após a imunização de camundongos BALB/c previamente submetidos ou não ao tratamento oral com OVA, os mesmos foram pulsados intra-peritonealmente (i.p.) com 200  $\mu$ L de uma solução salina de OVA a 50  $\mu$ g/mL. Um dia após esse procedimento os animais foram sacrificados e procedeu-se à remoção do baço para posterior quantificação de *Foxp3* e GATA-3.

#### **3.13.1 Extração de RNA de baços congelados**

Em tubos de 1,5 mL foi colocado 1 mL de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) e mantidos em gelo picado. Para cada tubo foram transferidos cerca de 50 - 100 mg de tecido de baço, que foi triturado utilizando-se um mixer tipo *Polytron*<sup>®</sup>. O homogenato foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente (26°C), para completa dissociação dos complexos

de nucleoproteínas. Depois disso, foi feita a dissociação em fases, para separação de RNA, DNA e proteínas. Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (*Merck*), o tubo agitado e incubado à temperatura ambiente por 3 minutos, seguidamente centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante transparente (RNA) foi coletado em novos tubos *Eppendorf*<sup>®</sup>, e feito a precipitação do RNA, utilizando-se 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol (*Merck*). Os tubos foram novamente incubados por 10 minutos à TA e então, centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de solução de etanol a 75 %. A seguir, os tubos foram centrifugados a 10.500 rpm por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet permaneceu à temperatura ambiente por 10 minutos para secagem e, em seguida, ressuspensa em 50  $\mu\text{L}$  de água DEPC (*SIGMA*<sup>®</sup>). O RNA foi diluído (5  $\mu\text{L}$  de RNA em 495  $\mu\text{L}$  de água DEPC) e quantificado por espectrofotometria, nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm, e a sua concentração calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{Absorbância } 260 \times 4$$

A medida da absorvância a 280 nm foi feita para verificar o grau de pureza do RNA extraído, pela fórmula:  $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ .

### **3.13.2 Real Time PCR**

#### **3.13.2.1 Produção de cDNA a partir de RNA extraído do baço de camundongos BALB/c**

Para este procedimento, utilizou-se o *Ready-to-Go T Primed First Strand Kit* (*Pharmacia, USA*).

Os tubos foram agitados e colocados no termociclador (*MJ Research Inc., USA*), por 15 minutos a 25°C. Após isso, adicionou-se 1 mL de EGTA 25 mM, para inativar a DNase, agitou-se e colocou-se novamente no termociclador por 10 minutos, a 65°C e, depois disso, por mais 10 minutos a 37°C. Por fim, o conteúdo desses tubos foi passado para os tubos do kit, e estes, colocados no termociclador por 1 hora a 37°C e finalmente congelados em freezer -20 °C.

### 3.13.2.2 Reação de *Real Time PCR*

Após a determinação da melhor temperatura de anelamento para cada *primer*, foi feita a reação de PCR em tempo real com a quantificação relativa do número de cópias dos genes alvos (Foxp3 e GATA-3), com relação aos transcritos do gene controle (HPRT).

Tabela 1. Primers utilizados na reação de Real Time PCR.

Primer	Seqüência	Concentração	T °C
Forward primer HPRT	5'-CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA GGA C-3'	25 nM	58
Reverse primer HPRT	5'GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC C-3'	25 nM	58
Forward primer Foxp3	5'TCA AGT ACC ACA ATA TGC GAC CC-3'	25 nM	58
Reverse primer Foxp3	5'TTG AGT GTC CTC TGC CTC TCC-3'	25 nM	58
Forward primer GATA-3	5'-GCC TGT GCA AAA GAG ATT TCA GAT-3'	25 nM	58
Reverse primer GATA-3	5'-TGA TTC ACAGAG CAT GTA GGC C-3'	25 nM	58

Para se reduzir a variabilidade dependente de erros de pipetagem nos resultados foi feita pré-misturas contendo *primers*, *PCR Master Mix* e água Milli Q em quantidades proporcionais ao número de amostras programadas em cada experimento.

Após homogeneização em *Vórtex*<sup>®</sup>, alíquotas desta mistura foram transferidas aos tubos onde, posteriormente, as amostras de cDNA seriam depositadas. As amostras foram, então, submetidas, em duplicatas, a 40 ciclos térmicos no *ABI PRISM*<sup>®</sup> 770 *Sequence Detector*. Utilizou-se também o programa ADS v1.9 (*Applied Biosystems, USA*) para analisar as curvas de dissociação.

O número de ciclos para as reações foi determinado de acordo com a análise do gradiente de temperaturas de cada *primer*.

Nas análises foi utilizado o valor do CP (*Crossing Point*). O CP consiste no ciclo em que o número de cópias de gene de interesse amplificado alcançou um ponto inicial acima da fluorescência padrão. O CP é determinado a fim de quantificar valores a partir de um ponto inicial. A quantificação relativa da expressão de RNAm foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{CPalvo (controle-teste)}} / (E_{\text{housekeeping}})^{\Delta\text{CPhousekeeping (controle - teste)}}$$

Sendo:

**E**= eficiência do *Real Time PCR*

**CP**= *Crossing Point*

**Δ** = diferença de controle interno *versus* teste

### 3.14 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os grupos experimentais de mesma linhagem, linhagens diferentes e entre estes e o grupo controle foi feito utilizando-se análise de variância “*Teste t*” que compara as médias de uma variável numérica de dois grupos, cujos critérios de avaliação foram tempo e tratamento. Nos casos em que esta análise se

mostrou estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ), procedeu-se a análise de variância múltipla pelo método (ANOVA-Tukey).

### 3.15 - RATIONALE DO MODELO EXPERIMENTAL

Este estudo teve como objetivo investigar a possível participação de células B-1 na indução de tolerância oral em modelo animal. Nove grupos experimentais foram formados: Camundongos BALB/c e BALB/Xid, estes últimos desprovidos de células B-1, composto respectivamente pelos grupos de animais tratados previamente com OVA por via oral, ditos animais “Tolerizados” (**B/c-T** e **B/x-T**); grupo de animais que não receberam tratamento oral com OVA, “Imunes” (**B/c-I** e **B/x-I**); grupo de animais que foram somente desafiados, “Naïve” (**B/c-N** e **B/x-N**); grupos **B/x-recN**, **B/x-recT** e **B/x-recl** compostos por camundongos BALB/Xid reconstituídos por transferência adotiva com células B-1 de sobrenadante de cultura de células aderentes peritoneais de camundongos BALB/c “naïve”; tolerizado e imune, respectivamente. Esses animais receberam, 3 dias antes da imunização, transferência adotiva de células B-1.

Quadro 1. Linhagens de Camundongos BALB/c e BALB/Xid agrupados de acordo com o tratamento recebido.

GRUPOS		TRATAMENTOS
<b>B/c-N</b>	BALB/c Naïves	Submetidos somente ao desafio com OVA agregada
<b>B/c-T</b>	BALB/c Tolerizados	Submetidos alimentação contínua com OVA por via oral, previamente a imunização
<b>B/c-I</b>	BALB/c Imunizados	Não submetidos alimentação contínua com OVA por via oral, previamente a imunização
<b>B/x-N</b>	BALB/Xid Naïves	Submetidos somente ao desafio com OVA agregada
<b>B/x-T</b>	BALB/Xid Tolerizados	Submetidos alimentação contínua com OVA por via oral, previamente a imunização
<b>B/x-I</b>	BALB/Xid Imunizados	Não submetidos alimentação contínua com OVA por via oral, previamente a imunização
<b>B/x-recN</b>	BALB/Xid reconstituídos	Reconstituídos com células B-1 de BALB/c Naïves
<b>B/x-recT</b>	BALB/Xid reconstituídos	Reconstituídos com células B-1 de BALB/c Tolerizados
<b>B/x-recl</b>	BALB/Xid reconstituídos	Reconstituídos com células B-1 de BALB/c Imunizados

## 4. RESULTADOS

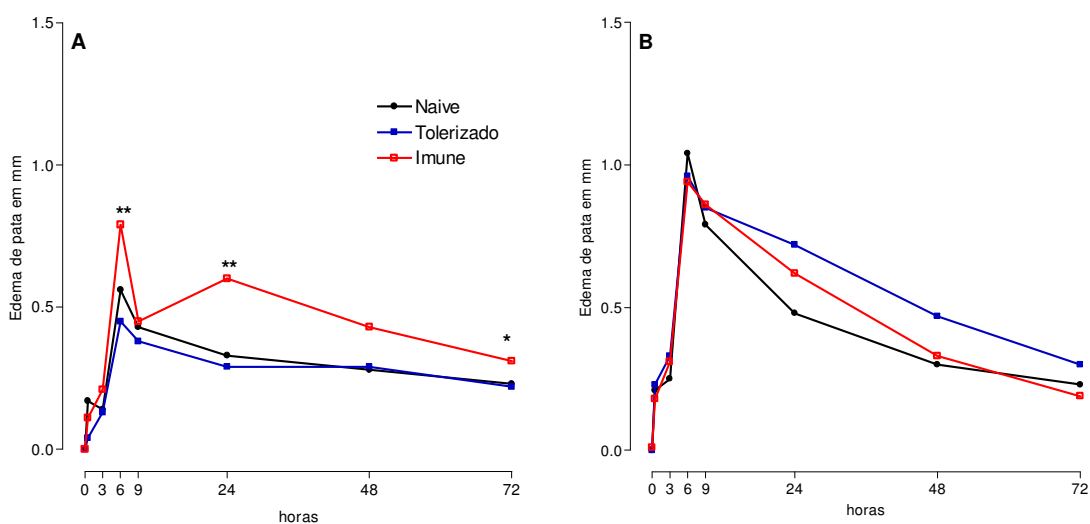
### 4.1- CAMUNDONGOS BALB/C E BALB/XID RESPONDEM DIFERENTEMENTE QUANDO TRATADOS COM OVA POR VIA ORAL PREVIAMENTE À IMUNIZAÇÃO

#### 4.1.1 - O tratamento por via oral com OVA modulou em camundongos BALB/c, mas não em BALB/Xid, a reação local de hipersensibilidade

Nesse experimento procurou-se quantificar a reação inflamatória induzida pela inoculação de solução de OVA agregada no coxim plantar dos animais, pela medida do edema de pata, expresso como espessura da pata em milímetros (mm). Os resultados encontrados são expressos como a diferença entre a pata esquerda (inoculada com solução a 2% de OVA agregada) e a pata direita (inoculada com solução salina 0,9%), como mostra a Figura 1.

O perfil da cinética do edema demonstrou que os animais BALB/c imunizados e desafiados com OVA apresentaram um quadro típico de hipersensibilidade, exibindo discreto pico de resposta em 30 minutos, seguido de uma reação tardia, com pico mais pronunciado em 6 e 24 horas após o desafio, que declinou até as 72 horas seguintes. No entanto, quando esses animais foram submetidos a um tratamento oral, com solução de OVA a 4 mg/mL *ad-libitum*, previamente à imunização, foi observada – em todos os intervalos de tempo – uma resposta local menos intensa, com uma diferença estatisticamente significativa ( $P<0.05$ ,  $P<0,0001$  e  $P<0.001$ ) em 6 e 24 e 72 horas, respectivamente, (Figura 1 A). Já, os animais da linhagem BALB/Xid, submetidos aos mesmos tratamentos, isto é, imunização e prévia indução de tolerância oral, respectivamente, apresentaram um padrão de resposta local com características peculiares, isto é, um pico de reação nas primeiras 6 horas do desafio e um declínio,

quase abrupto, da reação local até as 72 horas. Muito embora a resposta local fosse similar em camundongos da linhagem BALB/c nas primeiras 6 horas após o desafio, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todos os intervalos de tempo (Figura 1 B).



**Figura 1. O tratamento por via oral com OVA modula em camundongos BALB/c, mas não em BALB/Xid a reação local de hipersensibilidade.** Mensuração do edema de pata em diferentes tempos, após o desafio com solução a 2% de OVA agregada. Os animais foram desafiados no coxim plantar 14 dias após a imunização. **A**, camundongos da linhagem BALB/c. **B**, camundongos da linhagem BALB/Xid. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão obtido da mensuração de 5 animais.

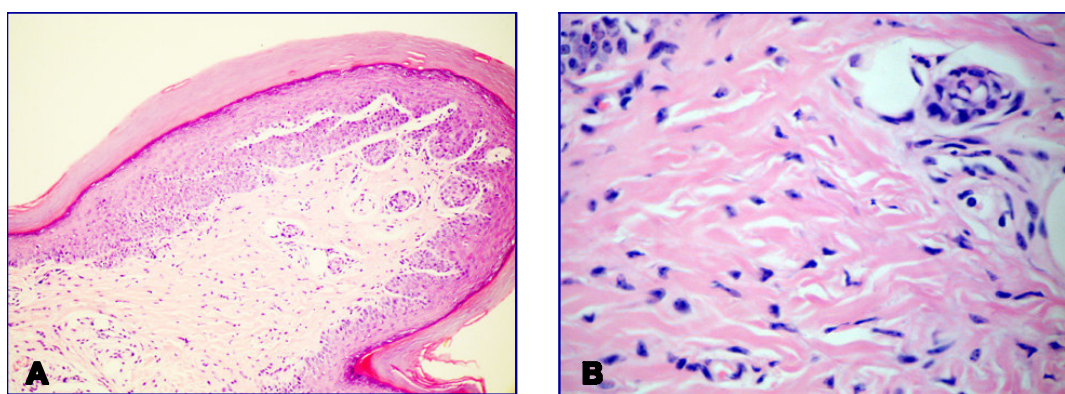
\*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  – Comparado ao grupo tolerizado



#### **4.1.2 - O tratamento por via oral com OVA previamente à imunização influencia características peculiares de infiltrado inflamatório na pata de animais BALB/c e BALB/Xid**

Com o objetivo de avaliar o tipo de infiltrado no local do desafio – coxim plantar - de acordo com o perfil da cinética do edema representado na Figura 1 A e B, realizou-se análise histológica de patas que foram removidas nos intervalos de 30 minutos, 6; 24 e 48 horas após o desafio com OVA agregada.

Na análise histopatológica das patas de animais controle – que não receberam nenhum tratamento - não se observou qualquer alteração nos diferentes planos do tecido epitelial, derme e camada muscular (Figura 2 A e B).



**Figura 2. Secções histológicas da região do coxim plantar de camundongos BALB/c controle. A, 100 x e B, 400 x. (HE )**

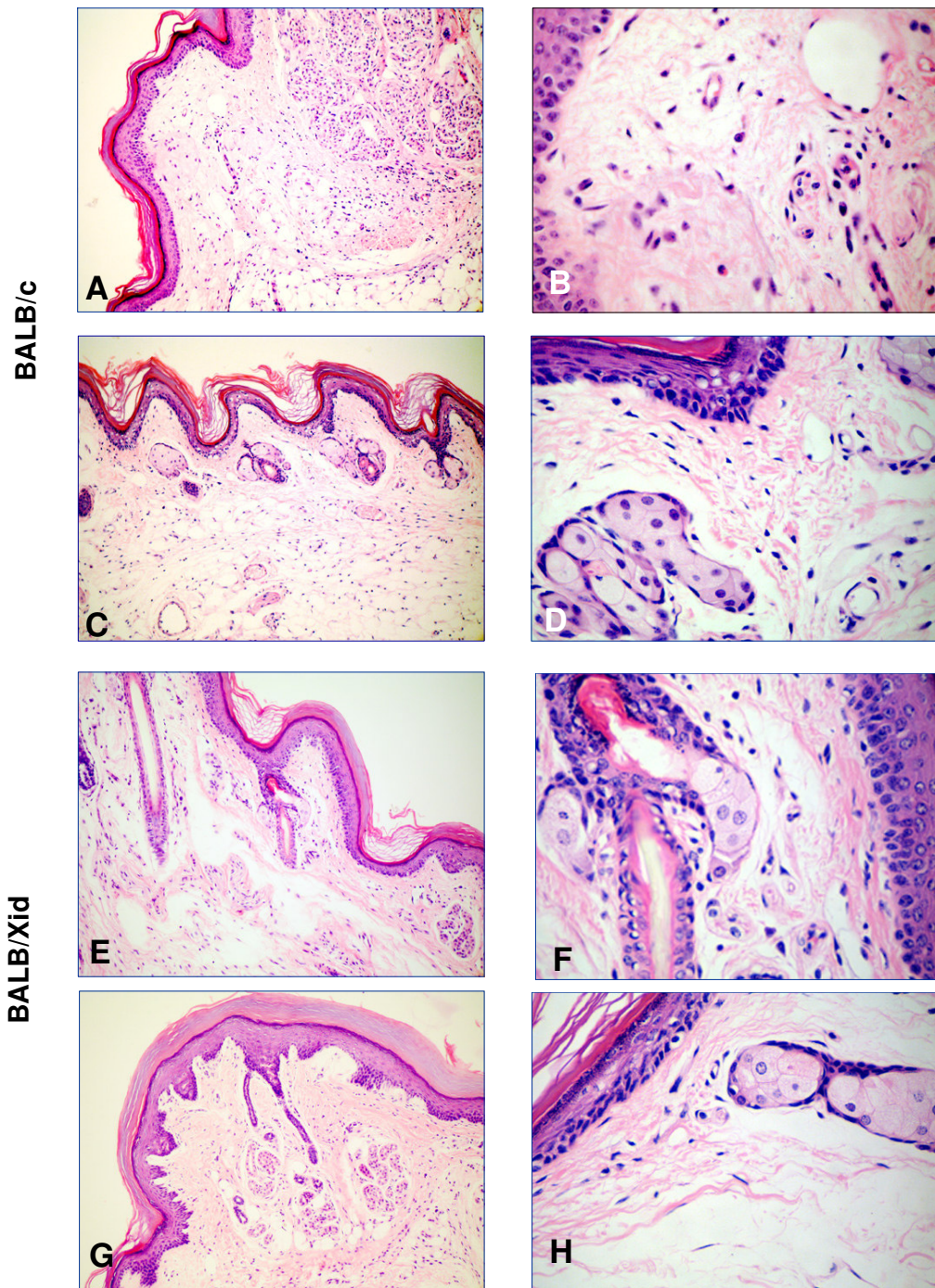
No intervalo de 30 minutos após o desafio, a análise microscópica revelou discreta reação inflamatória caracterizada por edema, dilatação de capilares da derme e leve infiltrado celular. Essas características teciduais são similares tanto em animais

BALB/c como em BALB/Xid, submetidos ou não ao tratamento oral com OVA (Figura 3).

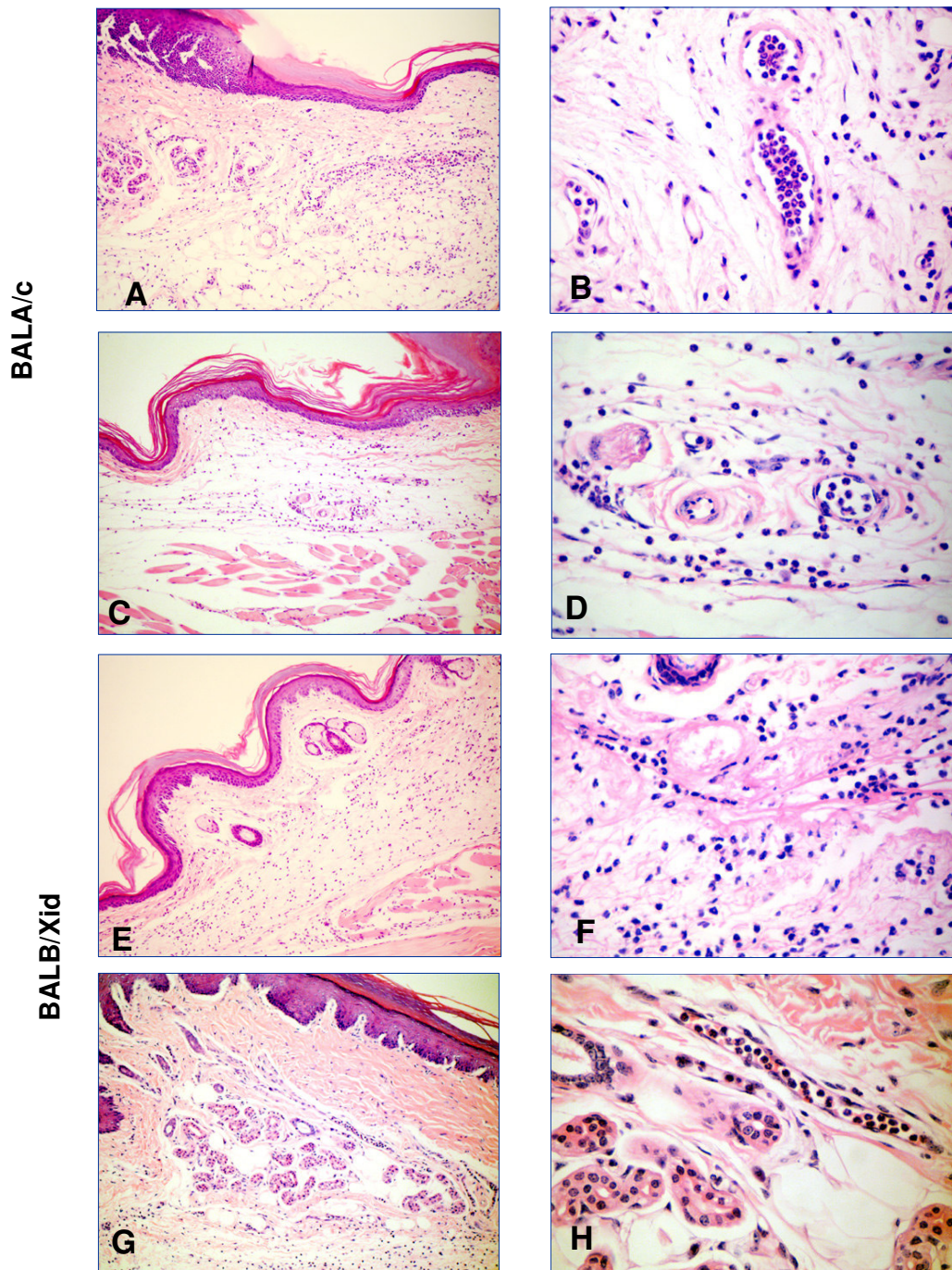
No intervalo de 6 horas após o desafio, a análise histológica revelou evolução do processo inflamatório com aumento do edema, do infiltrado de polimorfonucleares e eosinófilos e surgimento de células mononucleares na derme. Quando se comparam animais BALB/c submetidos ou não ao tratamento oral com OVA, previamente a imunização, observa-se que animais tolerantes à OVA apresentam um infiltrado com menor conteúdo celular. Embora características histológicas do infiltrado sejam semelhantes entre as duas linhagens, em camundongos da linhagem BALB/Xid, tratados ou não com OVA por via oral, não foram observadas diferenças no contingente celular (Figura 4).

No intervalo de 24 horas após o desafio, a análise microscópica exibe edema e um intenso infiltrado celular misto, com aumento de células mononucleares na derme, caracterizando a fase tardia da reação inflamatória. Pode se notar ainda a presença de infiltrado na camada muscular (Figura 5). Camundongos BALB/c e BALB/Xid, submetidos ao tratamento oral com OVA, apresentam menor contingente celular no infiltrado quando comparado com os animais que não foram submetidos ao tratamento oral com OVA (Figura 5 A, B, E e F).

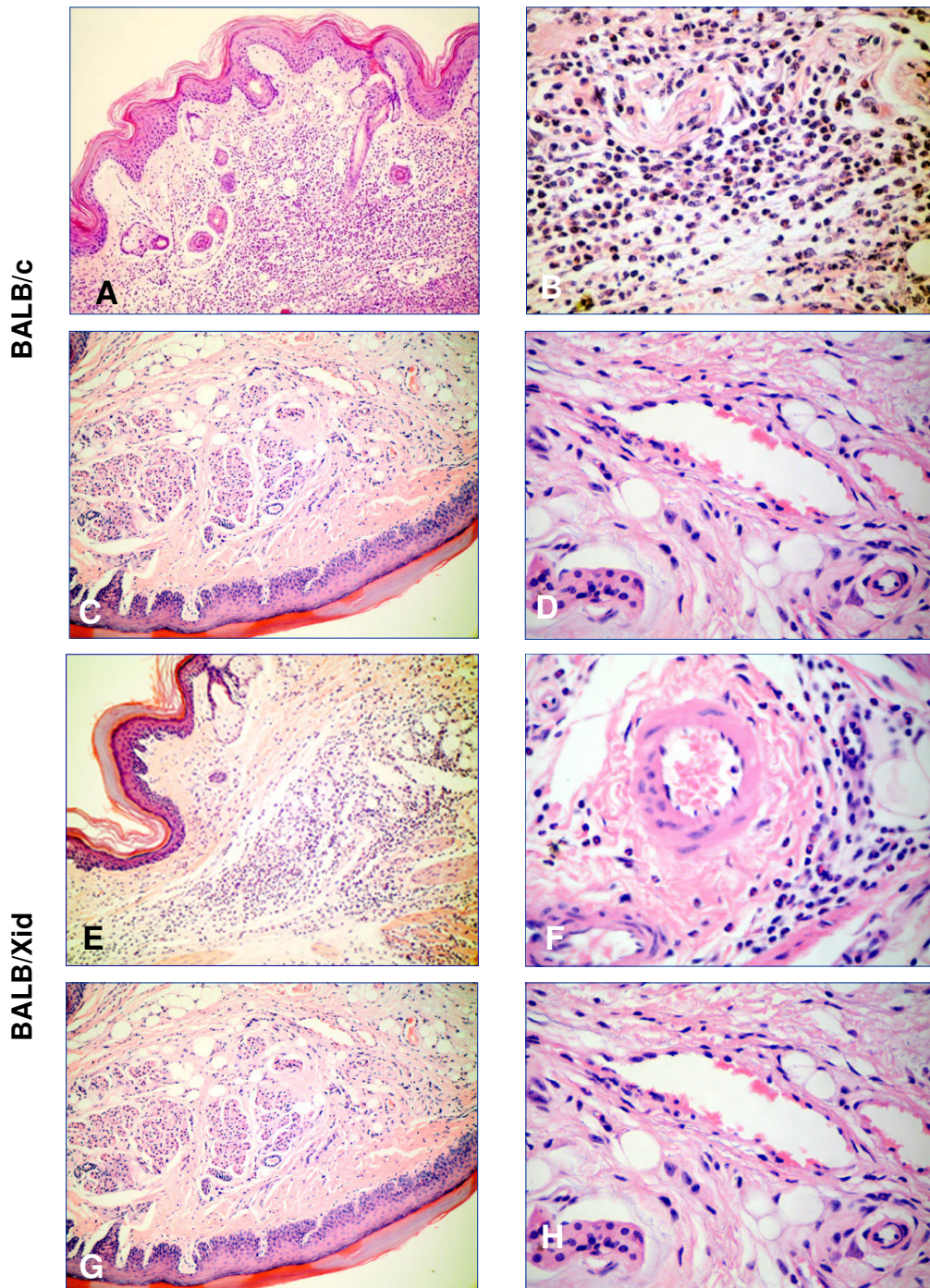
No intervalo de 48 horas após o desafio a imagem histológica é semelhante à de 24 horas para os grupos estudados (Figura 5), isto é; com predomínio de infiltrado misto e extensas áreas de necrose tecidual e debris celulares (Figura 6).



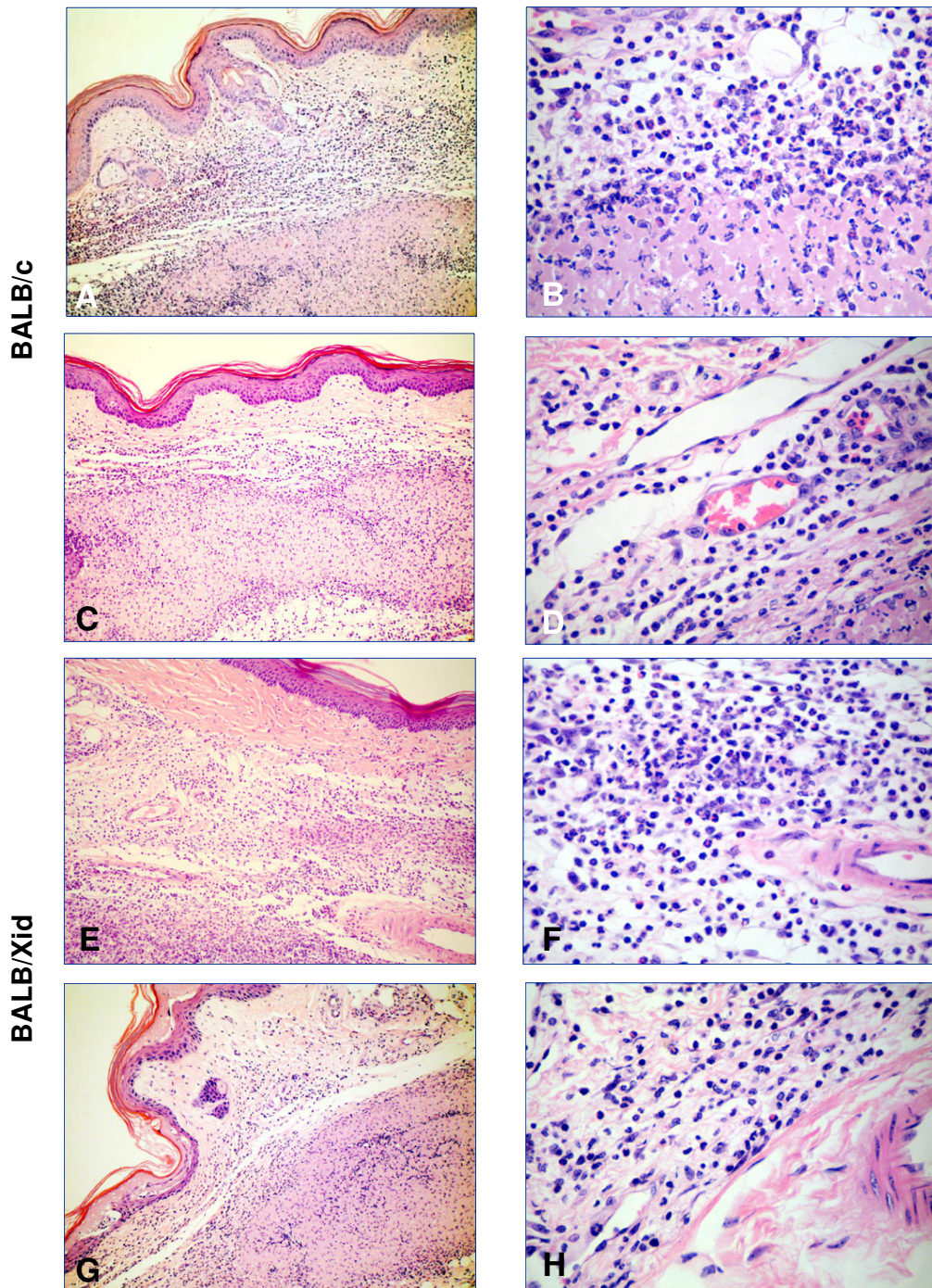
**Figura 3. Secções histológicas da região do coxim plantar 30 minutos após o desafio com OVA agregada. Camundongos BALB/c; A e B (imunizados), C e D. (tolerizados). Camundongos BALB/Xid; E e F (imunizados), G e H (tolerizados). (HE – 100x e 400x).**



**Figura 4. Secções histológicas da região do coxim plantar 6 horas após o desafio com OVA agregada** Camundongos BALB/c; A e B (imunizados), C e D. (tolerizados). Camundongos BALB/Xid; E e F (imunizados), G e H (tolerizados). (HE – 100x e 400x).



**Figura 5. Secções histológicas da região do coxim plantar 24 horas após o desafio com OVA agregada** Camundongos BALB/c; A e B (imunizados), C e D. (tolerizados). Camundongos BALB/Xid; E e F (imunizados), G e H (tolerizados). (HE – 100x e 400x).



**Figura 6. Secções histológicas da região do coxim plantar 48 horas após o desafio com OVA agregada** Camundongos BALB/c; A e B (imunizados), C e D. (tolerizados). Camundongos BALB/Xid; E e F (imunizados), G e H (tolerizados). (HE – 100x e 400x).

#### **4.1.3 - O tratamento por via oral com OVA prévio a imunização foi capaz de reduzir níveis de anticorpos específicos em camundongos BALB/c, mas não em BALB/Xid**

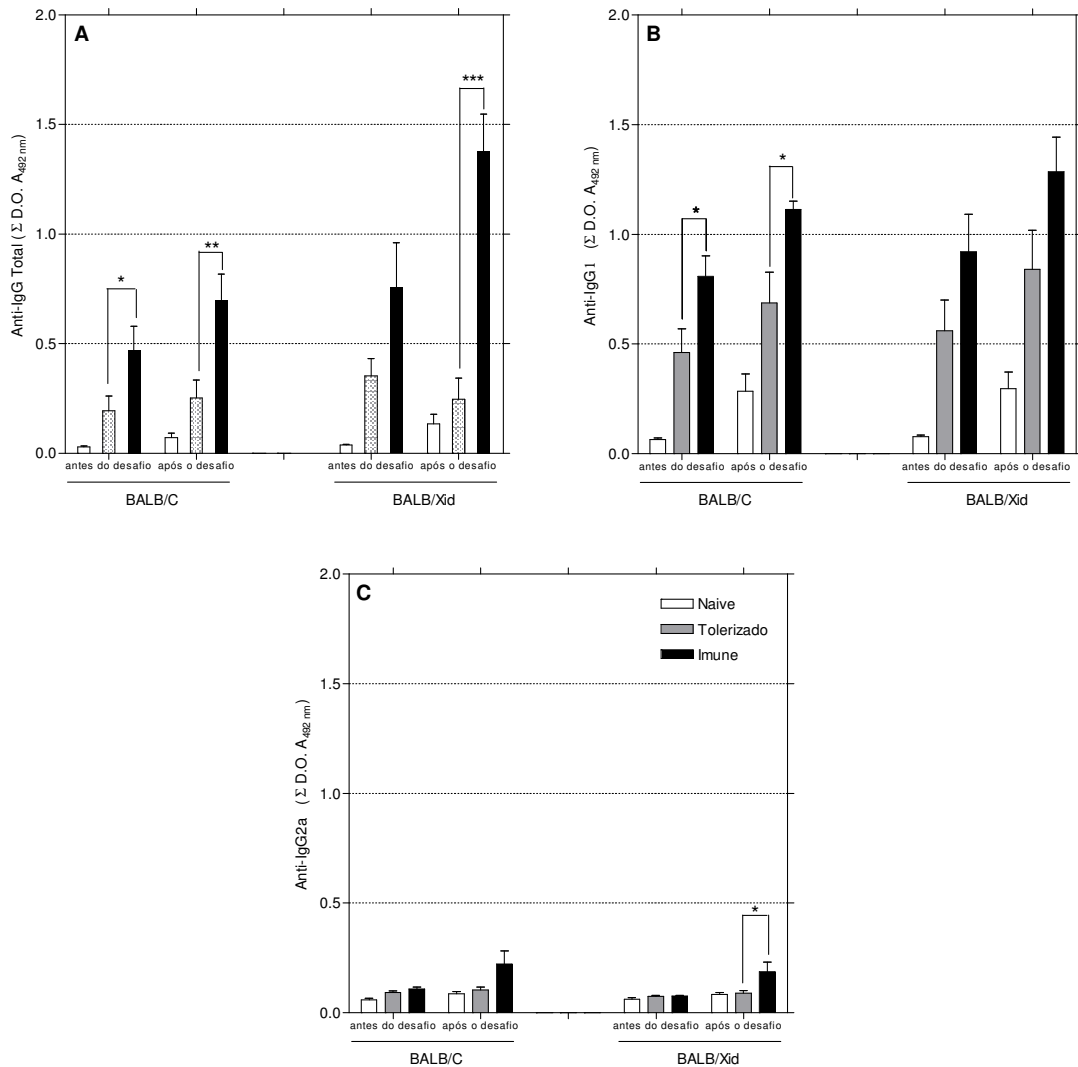
As subclasses de imunoglobulina associadas com os padrões de resposta Th1 e Th2 (IgG2a e IgG1, respectivamente) foram analisadas no soro. Para isso, animais BALB/c e BALB/Xid imunizados com OVA a 2,5%, emulsificada 1:1 com ACF, previamente submetidos ou não ao tratamento oral com OVA, foram sangrados para obtenção do plasma, 1 dia antes e 7 dias após o desafio com OVA agregada. Anticorpos séricos anti-OVA das subclasses IgG total, IgG1 e IgG2a foram determinados por ELISA e os níveis de anticorpos obtidos estão demonstrados na Figura 7 A, B e C.

Os resultados mostram que em ambas as linhagens - BALB/c e BALB/Xid - uma resposta de padrão Th2 foi verificada, pois relevantes níveis de IgG1 foram detectados, e níveis da subclasse IgG2a foram praticamente indetectáveis nos soros desses animais. No entanto, quando foi comparada a produção dessas subclasses de anticorpos, 1 dia antes e 7 após o desafio, verificou-se a elevação dos níveis séricos desses anticorpos, o que já era esperado devido à memória imunológica desenvolvida durante a resposta primária à OVA, desencadeada pelo processo de imunização.

Analisando os dados exibidos nas figuras 7 A, B e C, observa-se que animais BALB/c quando submetidos à ingestão oral com OVA, apresentam uma acentuada redução dos níveis séricos de IgG total e IgG1, com diferenças estatisticamente significantes, tanto na resposta primária – 1 dia antes do desafio – como na resposta secundária – 7 dias após o desafio. Quanto aos níveis de IgG2a, observa-se que após o 7º dia do desafio houve um discreto aumento desta subclasse de imunoglobulina.

Já camundongos BALB/Xid, apresentaram resultados semelhantes àqueles da linhagem BALB/c, muito embora algumas particularidades foram observadas: o tratamento oral com OVA, prévio à imunização, foi suficiente para fornecer níveis séricos menores de IgG total, 1 dia antes e 7 dias após o desafio, com significativa supressão na produção de anticorpos dessa subclasse na fase secundária da resposta, ( $P < 0,001$ ), o que não foi observado na resposta primária (Figura 7A). Aumento dos níveis de IgG2a observado nesses animais 7 dias após o desafio (Figura 7C). Muito embora menores níveis séricos de IgG1 foram determinados em BALB/Xid submetidos ao tratamento oral com OVA – antes e após o desafio – diferenças estatisticamente significante não foram verificadas quando os grupos dessa linhagem foram comparados.





**Figura 7. O efeito do tratamento oral com OVA na produção de anticorpos específicos IgG total, IgG1 e IgG2a em BALB/c e BALB/Xid.** Um dia antes e sete dias após o desafio com OVA agregada os camundongos foram sangrados e os níveis de anticorpos específicos nos soros foram determinados por ELISA. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão médio 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.

\*  $P < 0,05$ ;

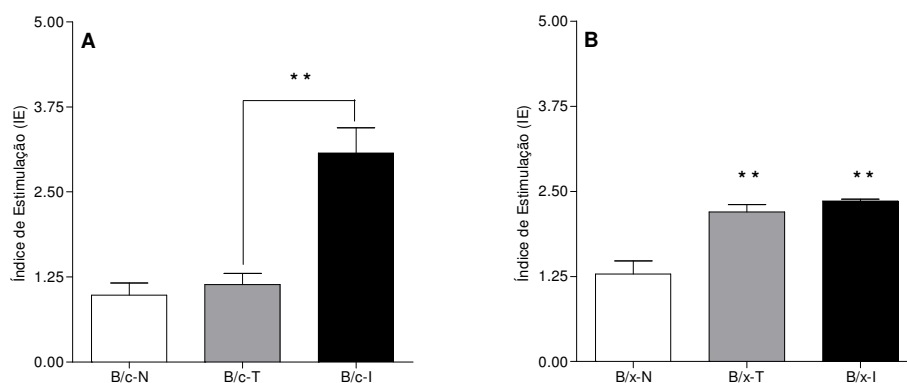
\*\*  $P < 0,01$

\*\*\*  $P < 0,001$

#### 4.1.4 – A resposta linfoproliferativa foi suprimida em camundongos BALB/c, mas não em BALB/Xid quando ambos foram tolerizados previamente à imunização

Após 14 dias da imunização, 2 a 3 animais das linhagens BALB/c e BALB/Xid submetidos ou não ao tratamento oral com OVA previamente à imunização foram sacrificados e seus baços retirados para estimulação *in vitro* com OVA, a uma concentração de 100 µg/mL.

Os resultados mostram que camundongos BALB/c submetidos ao tratamento oral com OVA, prévio à imunização, exibem um índice de estimulação menor quando comparados com animais não tolerantes ( $P < 0,01$ ) (Figura 8 A). No entanto, em camundongos BALB/Xid não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Figura 8 B). Esses dados mostram que a ingestão de OVA, previamente à imunização induziu supressão da resposta celular em camundongos BALB/c, mas não em camundongos BALB/Xid.



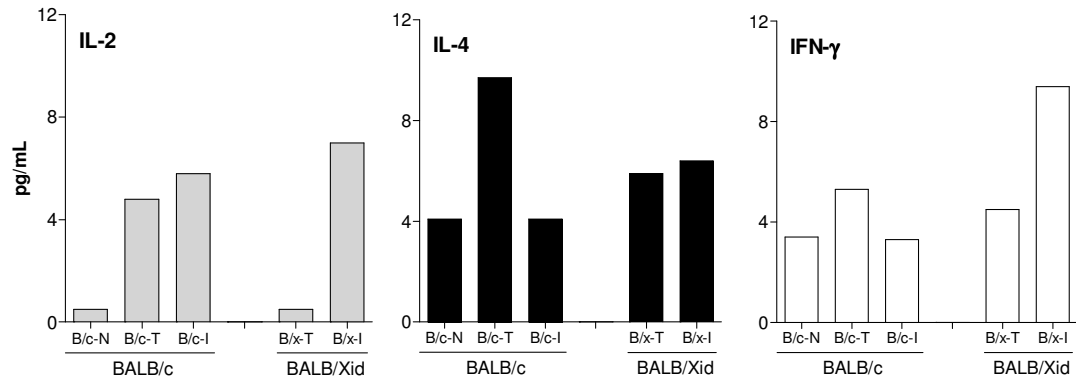
**Figura 8. O tratamento por via oral com OVA prévio à imunização suprime resposta linfoproliferativa em camundongos BALB/c.** Resposta linfoproliferativa mensurada pela incorporação de  $^3\text{H}$  Timidina em cultura de células de baço. **A**, camundongos BALB/c; **B**, camundongos BALB/Xid. As barras representam a média do Índice de Estimulação  $\pm$  erro padrão de 2 a 3 animais. \*\*  $P < 0,01$

#### **4.1.5 - Efeito do tratamento com OVA por via oral sobre os níveis séricos de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4)**

A detecção sérica de citocinas padrão Th1/Th2 foi executada pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA) Os dados obtidos mostram que camundongos BALB/c naíve, que sofreram somente desafio com OVA agregada no coxim plantar, apresentaram maior concentração sérica da citocina IL-4 quando comparada a IL-2 e IFN- $\gamma$ , confirmando o padrão de resposta Th2, peculiar da linhagem BALB/c (Figura 9).

Observa-se ainda que os níveis séricos de IL-4 estão aumentados em camundongos BALB/c tolerantes a OVA quando comparados com aqueles que não receberam tratamento oral com OVA, previamente a imunização. Esses dados sugerem que indução de tolerância oral pode ser favorecida pela ação de IL-4 (Figura 9).

Camundongos BALB/Xid exibem um padrão de resposta similar aos camundongos BALB/c, com predominância na concentração de IL-4 sobre IFN- $\gamma$  e IL-2 em animais tolerizados. No entanto, em camundongos BALB/Xid não tolerizados, um aumento na concentração sérica de IL-2, com marcante predomínio na concentração de IFN- $\gamma$  foi observado, sugerindo que o processo de indução de tolerância oral, nesses animais, exerceu influência sobre a síntese de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Figura 9).



**Figura 9. O efeito do tratamento com OVA por via oral sobre os níveis séricos de citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4.** Os soros foram colhidos da região retro-orbital 7 dias após o desafio no coxim plantar com OVA agregada.

- *Pool* sérico de 3 a 5 camundongos foi utilizado para esse ensaio.

## **4.2 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍCAS E FUNCIONAIS DE CÉLULAS DE LAVADO DE PERITÔNIO TOTAL DE CAMUNDONGOS BALB/C DOADORES**

### **4.2.1 – Alterações quantitativas e fenotípico-funcionais na população de células totais de peritônio de camundongos BALB/c doadores foram provocadas pelo tratamento oral com OVA**

Células de lavado de peritônio total de camundongos BALB/c doadores, tratados ou não com OVA, previamente à imunização, foram analisadas quanto aos aspectos quantitativos, funcionais e fenotípicos. Os dados obtidos mostram que na população de linfócitos, provenientes de animais controles (que não receberam nenhum tipo de tratamento), naïve, tolerizados e imunizados, representados respectivamente pelos *gates* R1, R2, R3 e R4 (Figura 10) há uma similaridade percentual de células com fenótipo CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, característica fenotípica de células B-1, muito embora animais controles apresentem uma discreta diminuição nesse percentual. Esses dados mostram que o tratamento por via oral com OVA, prévio à imunização não interferiu no percentual de células B-1 do lavado peritoneal total.

Também foi investigado a expressão intracelular de IL-10 nas subpopulações de células B-1a e B-1b do peritônio total de camundongos BALB/c doadores, tratados ou não com OVA por via oral. Primeiramente analisando a população total de células B-1 no peritônio, observou-se que o número absoluto de células B-1b predomina sobre B-1a, e alterações quantitativas nessas duas subpopulações celulares podem ser vistas nos animais que receberam algum tipo de tratamento quando comparados ao grupo controle (Tabela 2).

Considerando a expressão de IL-10 intracelular, os resultados mostram que em ambas as subpopulações de células B-1 ocorre a expressão intra-citoplasmática dessa citocina. No entanto, em relação aos animais “naïve” houve uma redução na quantidade de células B-1a expressando IL-10 quando os animais foram tratados com OVA por via oral, e ausentes quando os animais não receberam OVA por via oral previamente à imunização. Portanto, em animais tolerantes ou não à OVA, verificou-se aumento quantitativo das células B-1b que expressam IL-10 (Figura 11). Esses resultados sugerem que, muito embora o percentual de células com fenótipo B-1 no peritônio total seja praticamente idêntico (Figura 10), alterações quantitativas e fenotípicas-funcionais podem ser induzidas pelos tratamentos a que esses animais foram submetidos.

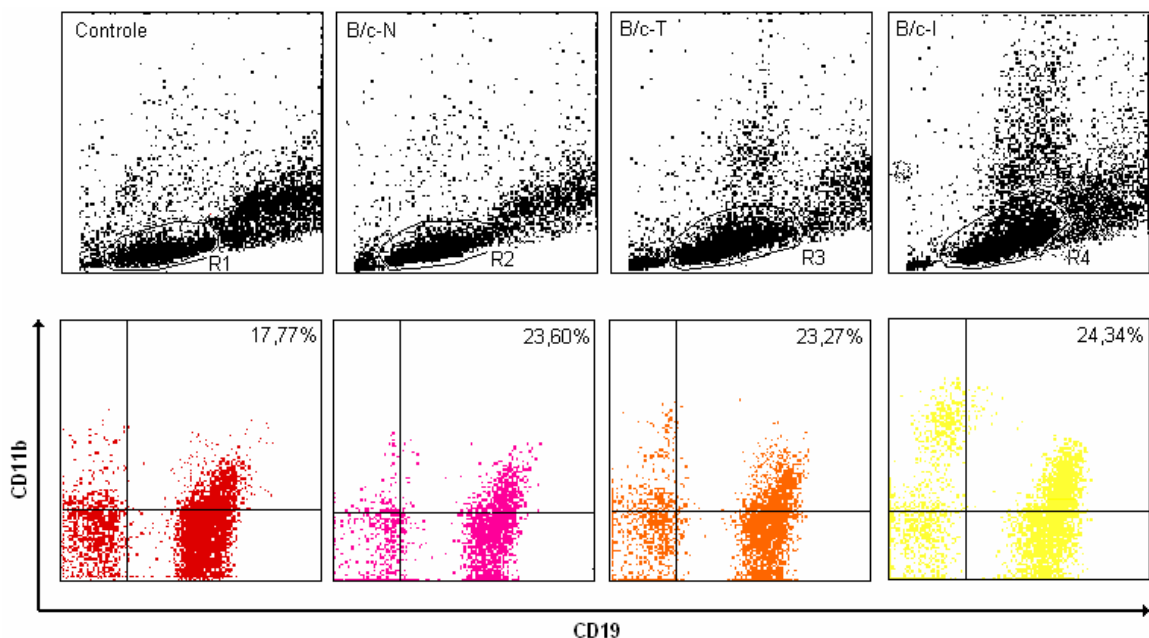
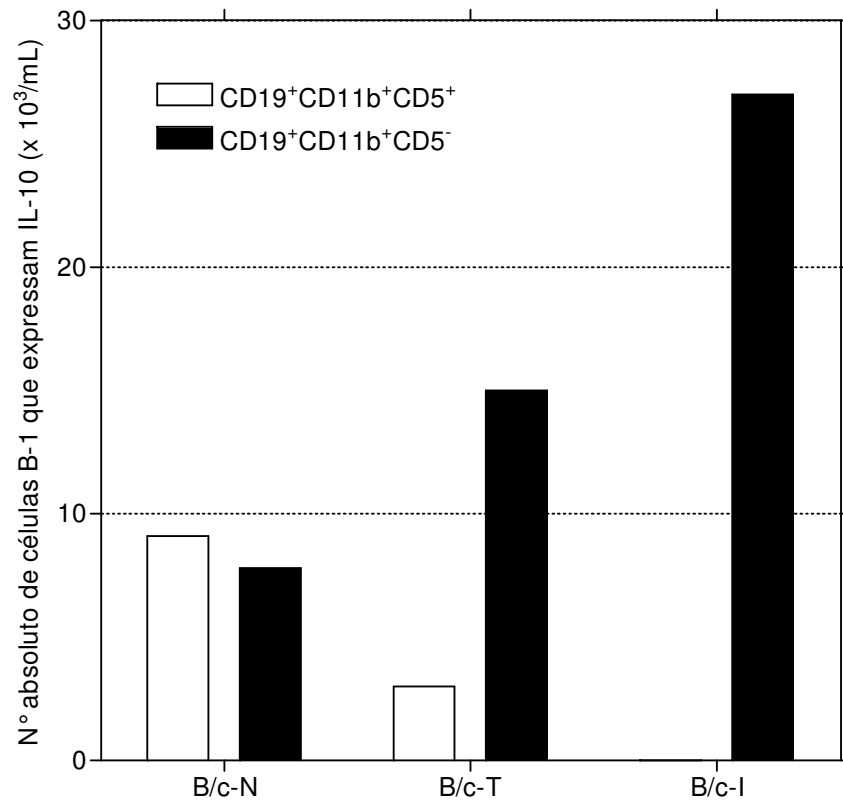


Figura 10 – Análise da expressão de marcadores de superfície em células do lavado peritoneal total de camundongos BALB/c doadores. Células de lavado peritoneal total de camundongos BALB/c submetidos ou não ao tratamento oral com OVA previamente à imunização foram marcadas. A população de linfócitos foi separada eletronicamente por tamanho e granulosidade e confinadas em *gates* R1, R2, R3 e R4.

**Tabela 1.** Número absoluto de células B-1a e B-1b de peritônio total de camundongos BALB/c doadores, tratados ou não com OVA por via oral.

2 a 3 camundongos por grupo foram utilizados nesse experimento.

	B/c-N ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	B/c-T ( $\times 10^3/\text{mL}$ )	B/c-I ( $\times 10^3/\text{mL}$ )
<b>B-1a</b>	13,0	6,0	3,2
<b>B-1b</b>	831,8	1299,0	1889,2



**Figura 11.** Número absoluto de células com fenótipo CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> (B-1a) e CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> (B-1b) que expressam IL-10 intracelular de lavado de peritônio total de camundongos BALB/c tratados ou não com OVA por via oral.\_2 a 3 camundongos por grupo foram utilizados nesse experimento.

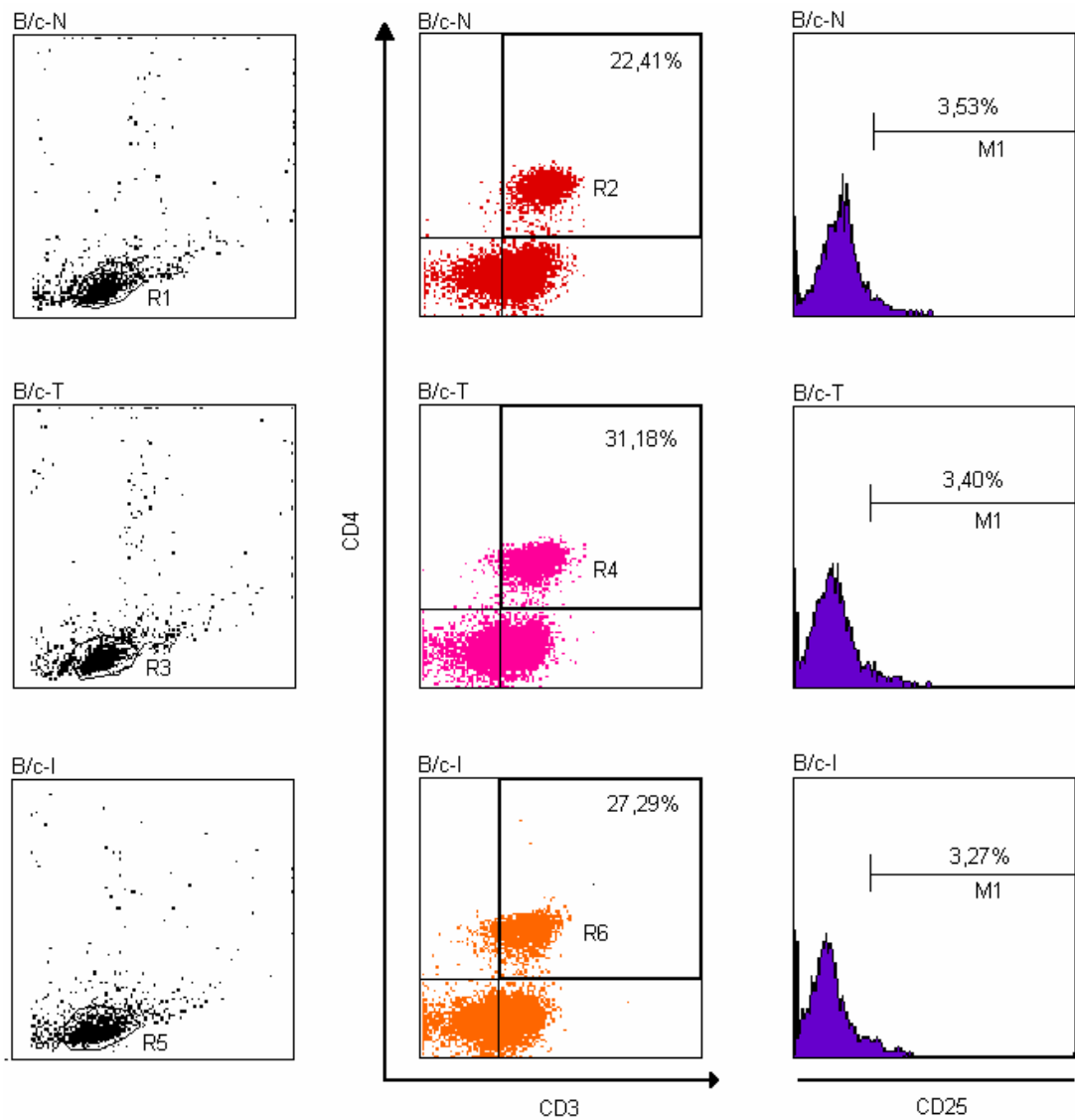


### **4.2.3 - Expressão relativa de Foxp3 e GATA-3 em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de baço de camundongos BALB/c doadores submetidos ou não ao tratamento oral com OVA**

Com o propósito de avaliar o efeito que o tratamento com OVA por via oral provocou sobre a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do baço, camundongos BALB/c doadores, tolerizados ou não, foram sacrificados 14 dias após a imunização, e a expressão relativa de Foxp3 e GATA-3 foi determinada..

Inicialmente procedeu-se à quantificação de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> do baço de camundongos BALB/c tratados ou não com OVA por via oral. Os resultados mostraram que o percentual de células duplamente marcadas, representadas nos *gates* de linfócitos (R1, R3 e R5), apresentaram pequenas diferenças entre si, mostrando que em camundongos submetidos ao tratamento oral com OVA houve um maior percentual dessas células, quando comparado aos demais grupos (Figura 12). Embora o percentual de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> que expressam CD25<sup>+</sup> nessas populações seja praticamente idêntico entre os grupos (Figura 12), foi verificado um menor número absoluto dessas células em camundongos tolerizados (Tabela 3). No entanto, pode-se observar que a indução de tolerância oral promoveu o aumento na expressão relativa de Foxp3 em esplenócitos.

Analisando a expressão de GATA-3 - fator de transcrição que favorece a resposta de padrão Th2 é interessante observar sua redução em esplenócitos de animais que não receberam OVA por via oral, previamente à imunização, sugerindo um padrão de resposta Th1 para esse grupo de animais (Tabela 3, Figura 13).

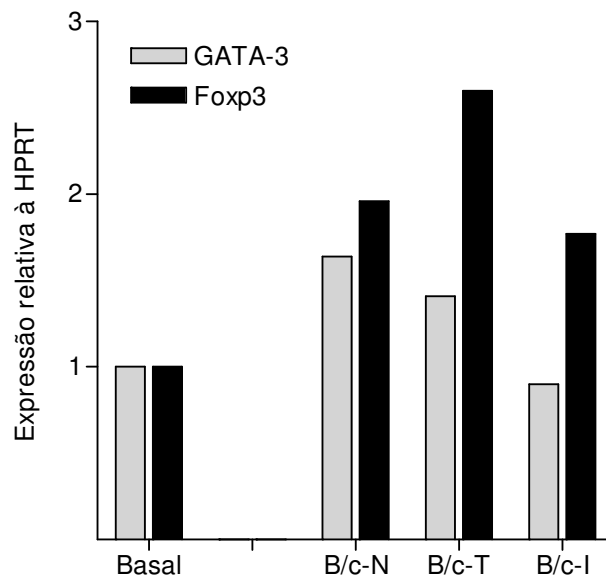


**Figura 12. Análise por citometria de fluxo da expressão de CD25 em esplenócitos de camundongos BALB/c doadores.** Esplenócitos de camundongos BALB/c, tratados ou não com OVA previamente à imunização, foram marcados com anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD25. A população de linfócitos foi separada eletronicamente por tamanho e granulosidade e confinadas em *gates* R1, R2 e R3.

**Tabela 3.** Número absoluto de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> obtidas de baço de camundongos BALB/c tratados ou não por via oral com OVA e a expressão relativa de Foxp3 e GATA-3

	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (x 10 <sup>5</sup> células/mL)	Expressão relativa Foxp3	Expressão relativa GATA-3
Basal	nd*	1,00	1,00
B/c-N	14	1,96	1,65
B/c-T	9,9	2,60	1,42
B/c-I	11	1,80	0,90

\* *não determinado*



**Figura 13. Expressão relativa de Foxp3 e GATA-3 em esplenócitos de camundongos BALB/c doadores.** Expressão de Foxp3 e GATA-3 em células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de camundongos BALB/c tratados ou não por via oral com OVA previamente à imunização.

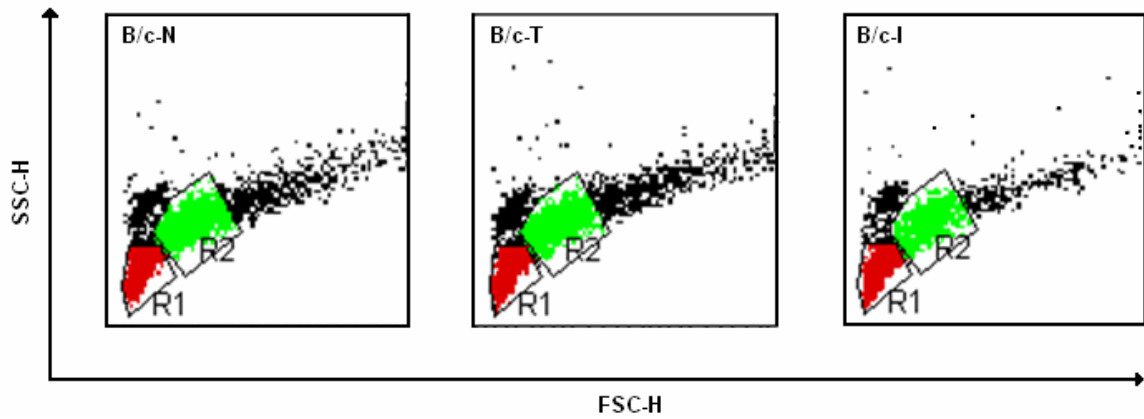
Camundongos sem qualquer tratamento foram utilizados para estabelecer a expressão basal de Foxp3 e GATA-3

### **4.3 - CARACTERÍSTICAS FENOTÍCAS E FUNCIONAIS DE CÉLULAS DE SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS ADERENTES DE PERITÔNIO DE CAMUNDONGOS BALB/c DOADORES**

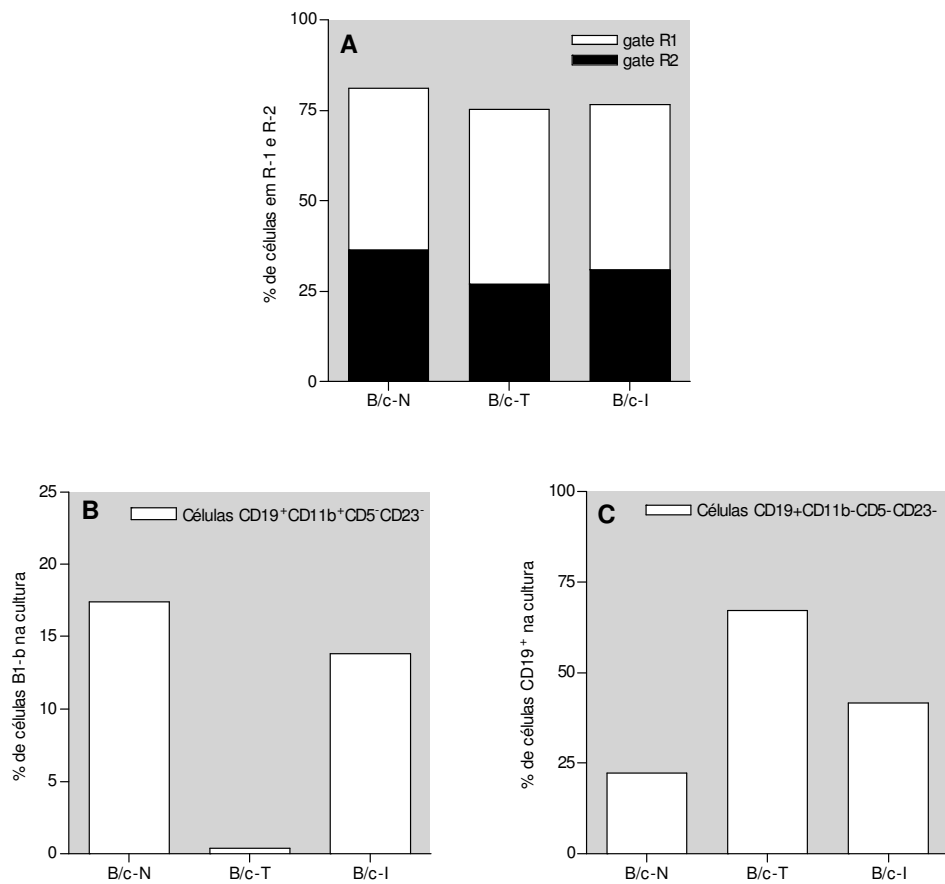
#### **4.3.1 – O tratamento por via oral com OVA foi capaz de alterar o fenótipo celular mas não o percentual quantitativo de células de sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c**

A análise por citometria de fluxo das células do sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes mostrou duas subpopulações celulares distintas, que foram confinadas em dois *gates*: R1 e R2. O *gate* R1 exibe uma população celular de menor tamanho e granulosidade quando comparada com as células do *gate* R2, cujas características morfológicas sugerem ser populações de linfócitos e fagócitos, respectivamente (Figura 14).

Quanto ao aspecto quantitativo, a análise por citometria de fluxo mostrou que o tipo de tratamento a que os camundongos BALB/c doadores foram submetidos não alterou o percentual celular da cultura, mostrando que camundongos BALB/Xid foram reconstituídos com o mesmo gradiente celular (Figura 15 A). No entanto, o tratamento oral com OVA provocou alterações no fenótipo celular, pois a subpopulação de linfócitos – *gate* R1 – exibiu uma reduzida porcentagem de células com fenótipo CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup>, e uma elevada porcentagem de células CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> (Figura 15 B e C).



**Figura 14. Separação eletrônica por tamanho e granulosidade de regiões correspondentes às populações de linfócitos e fagócitos.** Análise morfológica e dimensional de células de sobrenadante de cultura de células aderentes de peritoneo de camundongos BALB/c, submetidos ou não ao tratamento oral com OVA previamente à imunização. R1, linfócitos; R2, fagócitos



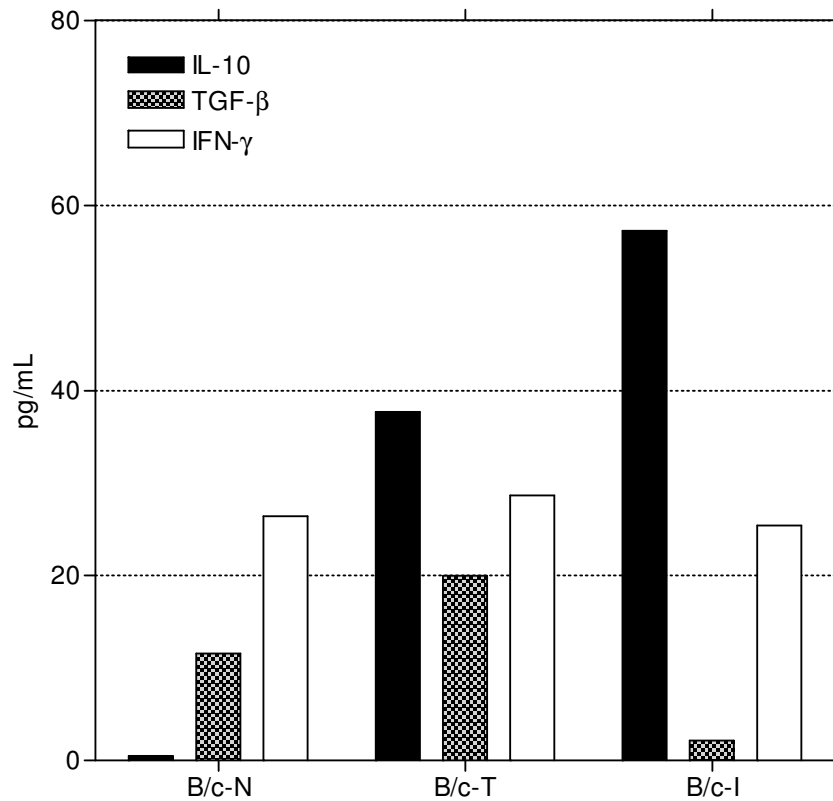
**Figura 15. Aspecto fenotípico de células de sobrenadante cultura de peritônio de camundongos BALB/c transferidas adotivamente para camundongos BALB/Xid. A,** Porcentagem de duas subpopulações celulares eletronicamente separadas por tamanho e granulosidade em Linfócitos (R1) e macrófagos (R2). **B,** Porcentagem de células CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> na cultura. **C,** Porcentagem de células CD19<sup>+</sup> na cultura.

#### **4.3.2 – A concentração de citocinas (IL-10, TGF- $\beta$ e IFN- $\gamma$ ) em sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c pode ser alterada pelo tratamento oral com OVA, previamente à imunização.**

O sobrenadante de cultura de 5 dias de células aderentes de peritônio de camundongos BALB/c, tolerantes ou não à OVA, foi colhido para a determinação das concentrações de IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Os resultados mostraram que o tratamento com OVA por via oral provocou alterações na síntese dessas citocinas (Figura 16).

Quando se compara com animais naïve, observa-se que no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes de camundongos tolerizados a concentração de IL-10 e TGF- $\beta$  aumentou (Figura 16). Analisando as nuances quantitativas dos níveis das citocinas estudadas, a IL-10 foi mais vulnerável aos diferentes tratamentos executados, pois maior variação na sua concentração foi observada entre os grupos estudados. Muito embora alterações dos níveis de TGF- $\beta$  tenham sido observadas entre os grupos, a magnitude dessas não foi tão acentuada quanto as sofridas pela IL-10 (Figura 16). Muito embora a IL-10 ainda apresente maior magnitude de aumento entre as citocinas estudadas, a produção de IFN- $\gamma$  apresentou equivalência entre os grupos; possivelmente células aderentes da cultura sejam as responsáveis pela síntese de IFN- $\gamma$ . Níveis de TGF- $\beta$  aumentados em sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c tolerantes à OVA, e quase ausentes nos outros grupos pode sugerir que a indução de tolerância oral seja influenciada por esse citocina.





**Figura 16. Determinação por ELISA de IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c submetidos ou não ao tratamento ora com OVA.** A concentração de citocinas (IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) pode ser alterada pelo tratamento oral com oral previamente à imunização. A cultura foi realizada com lavado peritoneal de 10 camundongos por grupo.

#### **4.4 - CAMUNDONGOS BALB/Xid, QUANDO RECONSTITUÍDOS COM CÉLULAS B-1 DE BALB/c, ADQUIREM CAPACIDADE DE SUPRIMIR REAÇÃO LOCAL DE HIPERSENSIBILIDADE E RESPOSTA CELULAR LOCAL E LINFOPROLIFERATIVA, MAS NÃO A DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS**

##### **4.4.1 – A população de células B-1 na cavidade peritoneal de camundongos BALB/Xid reconstituídos aumentou do 3° ao 8° dia após a transferência adotiva**

Para verificar se a população de células B-1 se mantinha após a transferência adotiva, camundongos BALB/Xid, 3 e 8 dias após serem reconstituídos, foram sacrificados e células de peritônio total foram marcadas e quantificadas por citometria de fluxo, conforme previamente descrito. Os resultados obtidos mostraram que do 3° ao 8° dia após a transferência adotiva de células de sobrenadante de cultura, células B-1 transferidas, além de estarem presentes também aumentaram em quantidade neste período. Esses resultados são suficientes para mostrar que além da reconstituição de células B-1 ter se consumado, houve auto-renovação dessa população celular na cavidade peritoneal desses animais (Tabela 4).

A análise quantitativa das subpopulações de células B-1 após o 3° dia da reconstituição mostrou um predomínio do número de células B-1b sobre B-1a em todos os grupos estudados. Camundongos BALB/Xid transferidos adotivamente com células de camundongos BALB/c tolerantes à OVA apresentaram menor quantidade de células B-1, quando comparado aos demais grupos, isto devido a diminuição da subpopulação de células B-1b (Tabela 4). No entanto, após o 8° dia da reconstituição, um importante aumento no número absoluto células B-1 foi observado na cavidade peritoneal de camundongos BALB/Xid reconstituídos com células de camundongos BALB/c tolerizados. Por outro lado, ao contrário do que foi

observado no dia após a reconstituição, células B-1a predominaram sobre B-1b (Tabela 4). Esses achados sugerem que o tratamento por regime de alimentação contínua com OVA por via oral, previamente à imunização pode influenciar tanto na auto-renovação da população de células B-1 na cavidade peritoneal desses animais, como também, de alguma maneira, pode participar do processo de diferenciação dessas células.

**Tabela 4.** Número absoluto de células com fenótipo CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup> (B-1a) e CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> (B-1b), obtidas de lavado peritoneal de camundongos BALB/Xid, após o 3° e 8° dias da transferência adotiva de células de sobrenadante de cultura de peritônio de camundongos BALB/c

Fenótipo celular	B/x-recN (x10 <sup>3</sup> /mL)		B/x-recT (x10 <sup>3</sup> /mL)		B/x-recl (x10 <sup>3</sup> /mL)	
	3° dia	8° dia	3° dia	8° dia	3° dia	8° dia
<b>CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup></b>	90	3650	160	10500	300	2320
<b>CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup></b>	1080	2920	420	7520	1070	1830

**4.4.2 - Células B-1 de sobrenadante de cultura de células aderentes peritoneais de camundongos BALB/c, quando transferidas adotivamente para camundongos BALB/Xid foi capaz de suprimir reação de hipersensibilidade local e resposta celular linfoproliferativa nesses animais.**

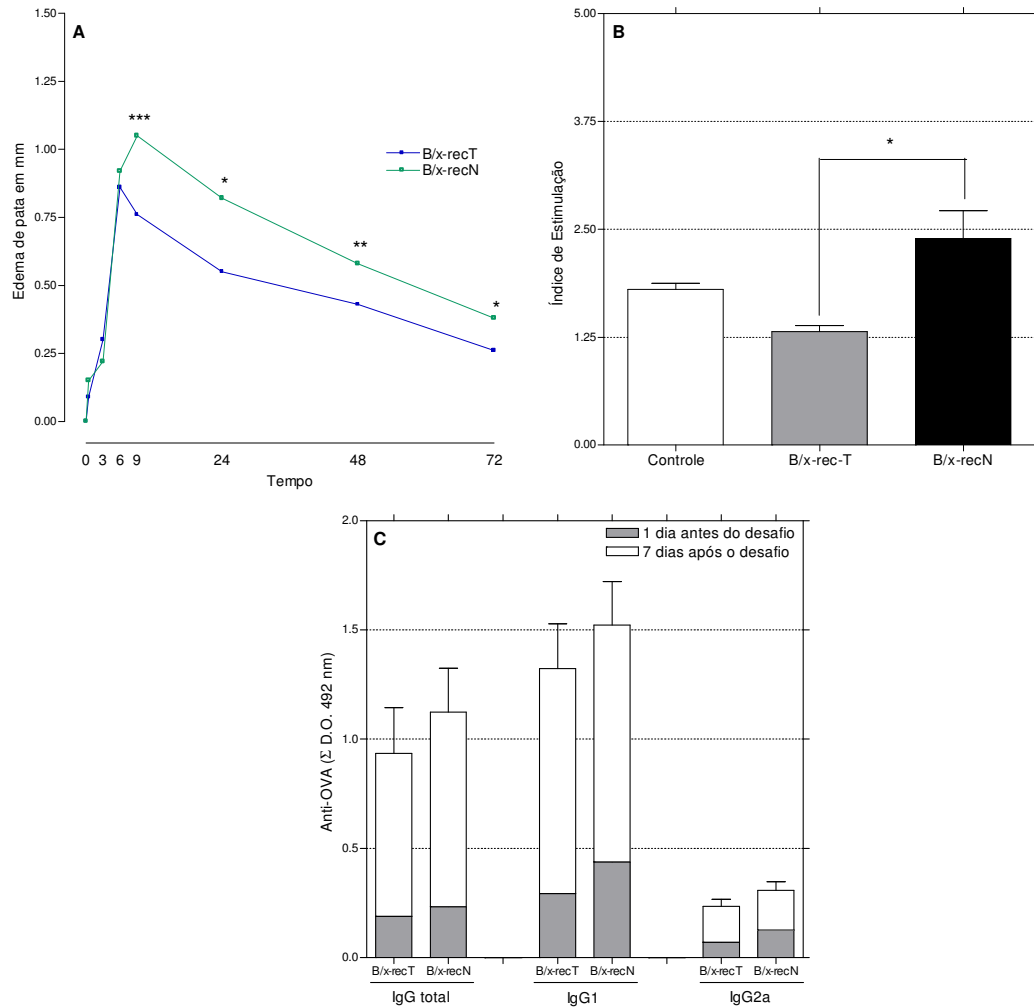
Para avaliar se células B-1 podem ou não participar dos mecanismos envolvidos na indução de tolerância oral, camundongos BALB/Xid foram reconstituídos, por via intra-peritoneal (i.p.), com  $1 \times 10^6$  células de sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c, tratados, ou não por via oral com OVA previamente à imunização. Após 3 dias da transferência adotiva, esses animais foram imunizados com OVA emulsificada em ACF (1:1), por via subcutânea (s.c.) na base da cauda.

A partir da imunização, animais de cada grupo foram desafiados com OVA agregada, no coxim plantar, 5 dias após a imunização. Nesses animais a mensuração do edema de pata e a determinação de níveis séricos de imunoglobulina específicas (IgG total, IgG1 e IgG2a) foram executadas (Figura 17 A e C ). Para o ensaio de linfoproliferação, os animais, foram sacrificados no 5º dia após a imunização e seus baços removidos para estimulação *in vitro* com OVA (Figura 17 B).

A análise da reação no coxim plantar, após o desafio com OVA agregada, mostrou que camundongos BALB/Xid não responderam à indução de tolerância oral quando tratados por regime de alimentação contínua com OVA por via oral, previamente à imunização (Figura 1 B). No entanto, quando esses animais foram reconstituídos com células B-1 de cultura peritoneal de camundongos BALB/c tolerizados, verificou-se menor edema de pata quando comparados com animais reconstituídos com células B-1 de cultura peritoneal de camundongos BALB/c

“naïve”. Nos intervalos de tempo: 9, 24, 48 e 72 horas após o desafio, uma diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ) foi observada entre os grupos (Figura 17A). Quando esplenócitos foram estimulados *in vitro* com OVA foi observada supressão da resposta linfoproliferativa em animais que foram reconstituídos com células B-1 de camundongos BALB/c tolerantes à OVA (Figura 17 B). Estes dados sugerem que células B-1 transferidas adotivamente foram capazes suprimir resposta imune celular antígeno-específica.

Por outro lado, quando se analisa a produção de anticorpos específicos para OVA, os resultados não mostraram diferenças entre os grupos estudados, tanto 1 dia antes como em 7 dias após o desafio, muito embora os níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a aumentaram consideravelmente do 1° ao 7° dia após o desafio (Figura 16 C).



**Figura 17. Células B-1 de sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c transferem tolerância a camundongos BALB/Xid.** A transferência adotiva de camundongos BALB/Xid com células B-1b de sobrenadante de cultura de células de peritônio de camundongos BALB/c tolerizados foi capaz de suprimir reação local de hipersensibilidade, resposta celular linfoproliferativa, mas não produção de anticorpos. **A**, Mensuração edema de pata. **B** Resposta linfoproliferativa mensurada pela incorporação de  $^3\text{H}$  em cultura de células de baço. **C**, Produção de anticorpos específicos anti-OVA das subclasses IgG total, IgG1 e IgG2a.

\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  \*\*\* e  $P < 0,001$

## 5. DISCUSSÃO

Há pelo menos duas décadas e meia que células B-1 CD5<sup>+</sup> foram identificadas pela primeira vez (Hardy et al., 1982; Hayakawa et al., 1983; Hayakawa et al., 1984; Hayakawa et al., 1985; Lalor et al., 1990). No entanto, ainda hoje permanecem controvérsias a respeito da origem e função dessas células. Uma quantidade cada vez maior de trabalhos tem relacionado células B-1 com a fisiologia do sistema imunológico.

No que se refere à ontogenia dessas células, se desenvolvem mais precocemente que as células B convencionais, derivam de distintos precursores e expressam um repertório de genes V relativamente limitado que lhes conferem menor diversidade quando comparadas às células B. São produtoras de anticorpos do tipo IgM, com propriedade de reagir com polissacarídeos microbianos conservados e com alguns auto-antígenos (Hardy et al., 1984; Wasserman et al., 1998; Zhou & Notkins, 2004). Por esse motivo, acredita-se que sejam produtoras de anticorpos naturais e participem da imunidade inata (Chen, Wheeler et al., 1998; Hardy, Hayakawa et al., 1984; Wang, Chen et al., 2001; Zhou & Notkins, 2004). Embora anticorpos naturais sejam identificados em animais não imunizados, não se descarta a importância da imunologia de mucosa nesse processo. Moléculas provenientes da dieta e de microrganismos no trato gastrointestinal, além de representarem um grande desafio imunológico para o organismo, são importantes no desenvolvimento e função do sistema imune do hospedeiro (Kagnoff, 1982).

O contato do antígeno com a mucosa gastrointestinal é um meio para prevenir reações de hipersensibilidade a proteínas da dieta. A supressão ativa da resposta

periférica, deleção e anergia clonal são mecanismos importantes para explicar a indução de tolerância oral.

A despeito da aparente simplicidade do protocolo utilizado nesse trabalho – alimentação contínua *ad libitum* com OVA por 5 dias, previamente à imunização, que confere um forte sinal tolerogênico a partir de pequenas doses do antígeno (Faria, Maron et al., 2003), a supressão da reação inflamatória local e a resposta celular linfoproliferativa foi observada em camundongos BALB/c, mas não em camundongos BALB/Xid, quando ambos foram submetidos ao tratamento oral com OVA, previamente à imunização.

A reação de hipersensibilidade local, após o desafio no coxim plantar, mensurada em diferentes intervalos de tempo, mostrou reduzido edema de pata em camundongos BALB/c tolerizados quando comparado com animais, da mesma linhagem, que não foram previamente tolerizados ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ). Por outro lado, a linhagem BALB/Xid, embora também tenha sido observada reação inflamatória local de similar magnitude nos animais imunes, o tratamento prévio com OVA por via oral não foi suficiente para suprimir essa resposta. A análise histológica confirma estes resultados, pois mostra que o tratamento por via oral com OVA foi capaz de reduzir o infiltrado global de leucócitos no tecido de animais de ambas as linhagens. Em vista desses dados, pode-se inferir que a indução de tolerância oral foi capaz de interferir na migração, mas não na cinética celular do infiltrado, mesmo porque, em todas as lâminas histológicas um menor contingente celular foi observado em animais tolerizados, quando comparado com aqueles somente imunes. Contudo, em animais de ambas as linhagens, tolerizados e imunes, a migração de neutrófilos e eosinófilos predominou nas primeiras 6 horas após o desafio e foi menos intensa nas 24 até 48 horas, cujo infiltrado de células mononucleares foi prevalente.



Extensas áreas de necrose tecidual e debris celulares foram observadas. Desse modo, diferenças reacionais importantes não foram observadas nos tecidos desses animais, sugerindo que o tratamento com OVA por via oral exerceu nas primeiras 24 horas um efeito regulatório sobre a migração celular, principalmente em camundongos BALB/c, dados estes que concordam com os de (Rodrigues et al., 2006) que, estudando o efeito sistêmico da indução de tolerância oral sobre a inflamação, mostraram que a mobilização de leucócitos para os tecidos inflamados, e a eosinofiloiose na medula óssea, são influenciadas pela indução de tolerância oral (Nakao et al., 1998)

Os mecanismos pelos quais as células se tornam hiporresponsivas a partir da prévia ingestão do antígeno são complexos e, até certo ponto, estão na dependência de alguns fatores como: natureza, dose e solubilidade dos antígenos, entre outros. No entanto, estudos têm mostrado a supressão ativa como um resultado da indução de tolerância oral, pois células reguladoras podem inibir resposta *in vitro* e *in vivo* pela liberação de citocinas imunossupressoras (Faria & Weiner, 2005; Mowat, Parker et al., 2004; Nakao, Kasai et al., 1998).

Células T reguladoras requerem ativação de natureza antígeno-específica, cujo estado de maturação das células apresentadoras de antígenos, bem como o envolvimento de moléculas co-estimulatórias na apresentação do antígeno, podem induzir a supressão da resposta imune celular *in vitro* e *in vivo* de maneira antígeno-inespecífica, à custa da secreção de citocinas reguladoras (Harper et al., 1996; Miller et al., 1991; Miller et al., 1992; Miller et al., 1993). Em vista desses conceitos, baços de camundongos BALB/c e BALB/Xid tratados ou não por via oral com OVA foram removidos. Culturas de esplenócitos foram realizadas para avaliar o padrão de supressão da resposta imune celular em animais tolerizados, quando a cultura foi

estimulada com OVA. Os resultados mostram que em camundongos BALB/c o tratamento oral com OVA, previamente à imunização, foi capaz de suprimir a resposta linfoproliferativa, quando comparado aos animais do mesmo grupo, que não foram tolerizados ( $P < 0,01$ ). Em contrapartida, em camundongos BALB/Xid, não foram observadas diferenças no índice de estimulação (IE) linfoproliferativa entre os animais que receberam ou não OVA por via oral. Estes resultados demonstram que mecanismos celulares são iniciados após a administração do antígeno por via oral, conduzindo a um estado que suprime a atividade proliferativa dessas células. Muito embora estudos mais antigos apontem a participação de células CD8<sup>+</sup> como moduladoras de células T, capazes de suprimir resposta linfoproliferativa *in vitro* (Lider et al., 1989), recentes trabalhos têm mostrado que fatores solúveis sintetizados por células T reguladoras estimuladas (Treg e Th3) exerçam papel fundamental nesse processo (Chung et al., 2005; Faria, Maron et al., 2003; Faria & Weiner, 2005). Ainda que antígenos ministrados por via oral, induzam células reguladoras a expressarem citocinas imunossupressoras, células T de padrão Th2 de resposta também participam desse processo, pois em modelos animais de tolerância oral já foi demonstrada que citocinas IL-4 e IL-10 são requeridas para a indução de tolerância oral (Rizzo et al., 1999; Shi et al., 1999). Com foco na produção de citocinas, sangue de camundongos de ambas as linhagem foi colhido 7 dias após o desafio e níveis séricos de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  foram determinados. Em camundongos BALB/c que constitutivamente apresentam resposta de padrão Th2, observou-se que os níveis séricos de IL-4 dobraram em camundongos tolerizados quando comparados a camundongos naïves e imunes. Quanto a IL-2, níveis similares foram detectados em camundongos BALB/c tolerizados e imunes, sugerindo que ambos os grupos se encontram no mesmo grau de ativação

imunológica. Com base nesses dados, pode-se inferir que a IL-4 participe de fato da indução de tolerância oral, pois segundo (Rizzo, Morawetz et al., 1999) esta citocina participa como indutora da tolerância oral por representar um fator de crescimento para células T reguladoras. Embora camundongos BALB/Xid, também apresentem um perfil Th2 de resposta, o tratamento oral com OVA previamente a imunização não alterou, como em camundongos BALB/c, os níveis de IL-4 quando BALB/Xid tolerizados foram comparados com BALB/Xid imunes. Em contrapartida, camundongos BALB/Xid que não receberam tratamento oral com OVA, previamente a imunização, apresentaram acentuado nível sérico de IFN- $\gamma$  e IL-2 quando comparados com aqueles tolerizados, sugerindo que nesses animais o tratamento oral com OVA, prévio a imunização possivelmente esteja suprimindo uma resposta de padrão Th1 nesses animais.

Em vista desses resultados, restava saber se o protocolo experimental empregado neste trabalho – alimentação contínua com OVA via oral por 5 dias - poderia ou não suprimir a produção de anticorpos específicos anti-OVA das subclasses IgG total, IgG1 e IgG2a, visto que é mostrado na literatura que o regime de alimentação contínua com OVA por via oral durante 20 dias foi capaz de suprimir ambos padrões de respostas Th1 e Th2 (Faria, Maron et al., 2003; Marth et al., 2000; Melamed et al., 1996).

Já está bem definido na literatura que o isotipo de imunoglobulina pode ser um relativo indicador de subpopulação de células T ativadas. Assim, IgG1 e IgE são regulados pela síntese de IL-4, e representa uma resposta de padrão Th2, enquanto que a produção de IgG2a e IgG2b é regulada por IFN- $\gamma$  e representa uma resposta de padrão Th1, (Mosmann et al., 1989; Stevens et al., 1988). Em vista desses conceitos, soro de camundongos BALB/c e BALB/Xid tratados ou não com OVA por

via oral, foi colhido 1 dia antes e 7 dias após o desafio. Anticorpos séricos anti-OVA das subclasses IgG total, IgG1 e IgG2a foram determinados por ELISA. Os resultados confirmaram o padrão Th2 de resposta em camundongos BALB/c e BALB/Xid, pois níveis de IgG1 foram detectados quando ambas as linhagens receberam estímulo, tanto primário como secundário, o que não se verificou com os níveis de IgG2a, que foram praticamente indetectáveis. Camundongos BALB/c submetidos ao tratamento oral com OVA apresentaram níveis reduzidos de IgG total e IgG1 antes e após o desafio ( $P<0,05$  e  $P<0,01$ ) quando comparados aos animais que não foram tolerizados. Muito embora níveis de IgG total em camundongos BALB/Xid tolerizados foram menores quando comparados ao grupo imune ( $P<0,001$ ), esse resultado provavelmente se deve ao significativo aumento de IgG2a após o desafio ( $P<0,05$ ), justificado pela aumento na síntese de IFN- $\gamma$  nesses animais. Embora os resultados tenham mostrado que ambas as linhagens BALB/c e BALB/Xid responderam aos estímulos antigênicos - OVA por via s.c na base da cauda - com a produção de imunoglobulinas, o tratamento oral com OVA por alimentação contínua foi capaz de suprimir com eficiência a produção de imunoglobulina da subclasse IgG1 em camundongos BALB/c, mas não em BALB/Xid.

Com base nesses resultados, observou-se que camundongos da linhagem BALB/Xid, que apresentam mutação no gene *btk* o que leva a uma redução de aproximadamente 50% no número de células B-2 e severa redução da população de células B-1 em relação aos camundongos selvagens BALB/c, responderam diferentemente à indução de tolerância oral, pois não foi verificado nesses animais nem supressão da reação inflamatória local nem tão pouco a resposta celular

linfoproliferativa, como observado em camundongos BALB/c, de mesmo *background* genético (Kerner, Appleby et al., 1995; Khan, Alt et al., 1995).

Muito embora alguns autores correlacionem a produção de auto-anticorpos “polirreativos” com doenças auto-imunes (Duan & Morel, 2006; Murakami & Honjo, 1995a; Murakami, Yoshioka et al., 1995c), o papel fisiológico de células B-1 nestes processos não foi objetivamente investigado (Chen, Wheeler et al., 1998; Duan & Morel, 2006; Wang, Chen et al., 2001; Zhou & Notkins, 2004). O fato das células B-1 migrarem para sítios inflamatórios inespecíficos (Almeida, Aroeira et al., 2001), produzirem anticorpos polirreativos e possuírem a capacidade de apresentar antígenos às células T (Vigna et al., 2002; Wang, Chen et al., 2001; Zhou & Notkins, 2004), suportam a hipótese que essas células desempenham importante papel na indução e manutenção da tolerância imunológica periférica.

Nos últimos anos, nosso laboratório mostrou que células B-1 podem influenciar na função efetora de macrófagos *in vitro* (Popi et al., 2004); tem a capacidade de apresentar antígeno, pois expressam constitutivamente altos níveis de MHCII e moléculas co-estimulatórias, principalmente B7-1, capaz estimular a proliferação de células T antígeno-específica (Vigna, Godoy et al., 2002), e mais recentemente foi mostrado que células B-1 primadas, quando adotivamente transferidas para camundongos BALB/Xid, conferem atividades supressoras em modelo de hipersensibilidade (De Lorenzo, Brito et al., 2007) *in press*. Em vista desses achados e somados aos resultados obtidos até agora neste trabalho, é provável que células B-1 possam, de alguma maneira, participar do processo de indução de tolerância oral.

Para substanciar essa hipótese, células de peritônio total de camundongos BALB/c (doadores) submetidos ou não ao tratamento oral com OVA foram cultivadas

por 5 dias em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (R-10). Após o período de incubação as células do sobrenadante foram então ressuspensas em RPMI 1640 e transferidas adotivamente para camundongos BALB/Xid (receptores). Portanto, previamente à cultura de células aderentes peritoneais, procurou-se analisar a influência do tratamento oral com OVA sobre as características fenotípicas e funcionais de células de peritônio total, e de esplenócitos de camundongos BALB/c doadores, uma vez que já se conhece a participação de células T reguladoras naturais  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ , derivadas do timo, na supressão ativa promovida pela indução de tolerância oral (Zhang et al., 2001). Foxp3 é um fator de transcrição, identificada como um marcador molecular específico para células T reguladoras, cuja expressão é essencial para a função e o desenvolvimento dessas células no timo. Assim, camundongos deficientes de Foxp3 morrem com uma síndrome linfoproliferativa auto-imune fatal e rápida com 3-4 semanas de vida e ainda são incapazes de gerar células T reguladoras (Campbell et al., 2007; Coffey et al., 2004; Fontenot et al., 2003). Em contrapartida, foi demonstrado que o tratamento oral com o antígeno foi capaz de induzir a expressão de Foxp3 em células T  $CD4^+CD25^-$ , gerando uma população de células T antígeno-específica com função reguladora, e que a simples imunização com o antígeno emulsificado em ACF foi capaz de gerar tanto células T reguladoras como células efetoras Th2 antígeno-específico (Mucida et al., 2005). Com base nesses dados, foi determinado a expressão de Foxp3 e GATA-3 em células de baço de camundongos BALB/c doadores, que receberam ou não tratamento oral com OVA. Os resultados corroboram com os da literatura, pois mostraram que o tratamento oral com OVA induziu maior expressão relativa de Foxp3 em células  $CD4^+CD25^+$ , quando comparados aos camundongos que não receberam OVA por via oral, e a menor

expressão relativa de GATA-3 em animais imunes sugere um padrão de resposta Th1 nestes animais. Não obstante a influência que a alimentação contínua com OVA produziu sobre células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, não foi observada diferenças no percentual da subpopulação de linfócitos da cavidade peritoneal entre os grupos, mostrando que, independentemente do tratamento que esses animais receberam o percentual de células submetidas à cultura foi similar entre os grupos. No entanto, quando se analisou a população de células B-1 nesse contingente celular, se observou um aumento de quase duas vezes destas células em animais que foram submetidos ou não ao tratamento oral com OVA previamente a imunização. Por outro lado, quando o fenótipo dessas células foram analisados, verificou-se que células CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>CD23<sup>-</sup> (B-1b) predominaram sobre CD19<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup> (B-1a) em todos os grupos, e uma compensação recíproca referente a quantidade celular e a expressão intracelular de IL-10 foi observada entre as duas subpopulações, corroborando mais uma vez que subpopulações de células B-1 apresentam características distintas e complementares (Haas, Poe et al., 2005), produzem IL-10 constitutivamente, cuja função permite tanto impedir a apoptose da subpopulação de células B-1a como induzir efeito proliferativo sobre população B-1b (Pers et al., 2003).

Embora a origem dessas células permaneça ainda controversa, células B-1 em diferentes locais são geralmente consideradas oriundas do mesmo compartimento imunológico (Pers et al., 2002), muito embora alguns autores já contestem esse conceito, pois acreditam que populações de células B-1 do baço e do peritônio surjam separadamente em virtude de exibirem diferenças nas características proliferativas, fenotípicas e transcricionais (Fischer et al., 2001; Stoermann et al., 2007; Tumang et al., 2004). Em contra partida, Itakura et al., (2005) mostraram em

modelo de sensibilidade de contato – um clássico exemplo de imunidade celular – que uma hora após da sensibilização cutânea com trinitrofenil cloreto (TNP-Cl), células B-1 na cavidade peritoneal são ativadas e migram para órgãos linfóides secundários. Um dia após a sensibilização, anticorpos anti-TNP, da subclasse IgM, estão presentes na circulação e participam da fase inicial da reação de sensibilidade de contato quando esses animais são desafiados.

Assim, células peritoneais de camundongos BALB/c doadores que apresentaram as características descritas acima, foram cultivadas. Após um período de 5 dias de incubação, células do sobrenadante dessa cultura foram ressuspensas em RPMI-1640 e transferidas para camundongos BALB/Xid. A análise fenotípico-funcional dessas células mostrou que o percentual celular da população de linfócitos e fagócitos se manteve similar entre os grupos, independentemente do tratamento que esses animais sofreram prévio a cultura. No entanto, um reduzido percentual de células com fenótipo  $CD19^+CD11b^+CD5^-CD23^-$  (B-1b) e um expressivo percentual de células com fenótipo  $CD19^+CD11b^-CD5^-CD23^-$  foram encontrados em culturas de animais tolerizados, características que não foram observadas nos outros grupos. O predomínio de células expressando CD19 assegura a manutenção da população de células B-1 transferidas, pois de acordo com os trabalhos de Krop et al., (1996) e Pers, Jamin et al., (2002) a alta expressão de CD19 desempenha papel importante tanto no desenvolvimento como na auto-renovação de células B-1, muito provavelmente estimuladas via IgM de superfície. No entanto, o mecanismo pelo qual o tratamento oral com OVA pode ou não participar desse processo ainda é desconhecido. A análise do sobrenadante mostrou níveis mais elevados de TGF- $\beta$  na cultura de células peritoneais de camundongos BALB/c tolerizados e um drástico aumento na síntese de IL-10 foi observado neste grupo, quando comparado ao



grupo naïve, sugerindo o estabelecimento da função moduladora e tolerante das células do sobrenadante na cultura desses animais. Níveis equivalentes de IFN- $\gamma$  entre os grupos foram observados, possivelmente fagócitos sejam as células implicadas na síntese desta citocina. Portanto, o sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes de camundongos BALB/c que não receberam OVA por via oral exibiu os maiores níveis de IL-10, embora esse resultado não fosse o esperado, pode ser justificado pelo maior número absoluto de células B-1b expressando IL-10 intracelular presentes nesta cultura. Esses dados concordam com os de Marth, Ring et al., (2000) e Melamed, Fishman-Lovell et al., (1996) que mostraram supressão ativa da resposta imune associada com produção aumentada de IL-10 e TGF- $\beta$  induzida por um regime de alimentação contínua com OVA por 20 dias.

Após a transferência adotiva de células do sobrenadante de cultura peritoneal, foi determinada a cinética das subpopulações B-1a e B-1b em camundongos BALB/Xid “receptores”. Nossos resultados mostraram que do 3° para o 8° dia após a reconstituição, as células transferidas, além de se manterem no camundongo receptor, se auto-renovaram, pois um aumento do número absoluto de células de ambas as subpopulações foi observado. Portanto, mais uma vez foi observado uma inversão no predomínio das subpopulações de células B-1 entre os grupos durante período estudado, isto é, no 3° dia após a reconstituição células B-1b predominaram sobre B-1a e, no 8° dia houve inversão desse quadro. Camundongos BALB/Xid reconstituídos com células de sobrenadante de cultura de camundongos BALB/c tolerizados apresentaram menor contingente de células B-1 no 3° dia e um drástico aumento no 8° dia após a reconstituição. Esses resultados são suficientes para sugerir que o tratamento oral com OVA esteja influenciando na diferenciação e proliferação das células B-1 na cavidade peritoneal. Assim, provavelmente a

expansão das subpopulações de células B-1, verificada pela indução de tolerância oral possivelmente contribua para a manutenção da tolerância periférica. Confirma esta hipótese, o fato de que camundongos BALB/Xid, refratários à indução de tolerância, quando reconstituídos com células B-1 de cultura de células aderentes de peritônio de camundongos BALB/c tolerizados, passou a suprimir resposta imune celular local e linfoproliferativa, muito embora não tenha sido observada a supressão na produção de imunoglobulinas da subclasse IgG1.

Em que pese nossos resultados demonstrarem que células B-1 participam na indução de tolerância oral, os mecanismos que governam esse fenômeno não foram aqui estabelecidos. As observações de Kroese et al., (1989); Murakami et al., (1995b); Stoel et al., (2005) que demonstraram a migração de células B-1 para a lâmina própria da mucosa intestinal onde sofrem *switch* para IgA, nos estimulam a investigar na continuidade destas pesquisas, as possíveis relações entre tolerância oral e a cinética de migração e diferenciação de células B-1 na mucosa do trato digestivo de camundongos.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem:

Camundongos BALB/Xid não responderam de maneira semelhante à indução de tolerância oral quando submetidos a um regime de alimentação contínua com OVA quando comparados a camundongos BALB/c.

Células B-1, possivelmente originadas a partir da transferência adotiva de células CD19+ de sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c tolerantes a OVA quando transferidas para camundongos BALB/Xid tornou os susceptíveis à indução de tolerância oral.

Células B-1, possivelmente originadas a partir da transferência adotiva de células CD19+ de sobrenadante de cultura peritoneal de camundongos BALB/c tolerantes a OVA quando transferidas para camundongos BALB/Xid foi capaz de suprimir a reação local de hipersensibilidade e resposta celular linfoproliferativa, mas não produção de anticorpos específicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, S. R.; AROEIRA, L. S.; FRYMULLER, E.; DIAS, M. A.; BOGSAN, C. S.; LOPES, J. D. et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **Int.Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 1193-1201, 2001.
2. ALUGUPALLI, K. R.; LEONG, J. M.; WOODLAND, R. T.; MURAMATSU, M.; HONJO, T.; GERSTEIN, R. M. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. **Immunity.**, v. 21, n. 3, p. 379-390, 2004.
3. CAMPBELL, D. J. ; ZIEGLER, S. F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 305-310, 2007.
4. CHEN, Z. J.; WHEELER, C. J.; SHI, W.; WU, A. J.; YARBORO, C. H.; GALLAGHER, M. et al. Polyreactive antigen-binding B cells are the predominant cell type in the newborn B cell repertoire. **Eur.J.Immunol.**, v. 28, n. 3, p. 989-994, 1998.
5. CHUNG, Y.; LEE, S. H.; KIM, D. H.; KANG, C. Y. Complementary role of CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-beta in oral tolerance. **J.Leukoc.Biol.**, v. 77, n. 6, p. 906-913, 2005.

6. COFFER, P. J. ; BURGERING, B. M. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nat.Rev.Immunol.**, v. 4, n. 11, p. 889-899, 2004.
7. DE LORENZO, B. H. P.; BRITO, R. R. N.; GODOY, L. C.; LOPES, J. D.;MARIANO, M. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. **Immunology Letters**, 2007.
8. DUAN, B. ; MOREL, L. Role of B-1a cells in autoimmunity. **Autoimmun.Rev.**, v. 5, n. 6, p. 403-408, 2006.
9. FARIA, A. M.; MARON, R.; FICKER, S. M.; SLAVIN, A. J.; SPAHN, T.;WEINER, H. L. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J.Autoimmun.**, v. 20, n. 2, p. 135-145, 2003.
10. FARIA, A. M. ; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol.Rev.**, v. 206, p. 232-259, 2005.
11. FISCHER, G. M.; SOLT, L. A.; HASTINGS, W. D.; YANG, K.; GERSTEIN, R. M.; NIKOLAJCZYK, B. S. et al. Splenic and peritoneal B-1 cells differ in terms of transcriptional and proliferative features that separate peritoneal B-1 from splenic B-2 cells. **Cell Immunol.**, v. 213, n. 1, p. 62-71, 2001.

12. FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Nat.Immunol.**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.
13. HAAS, K. M.; POE, J. C.; STEEBER, D. A.; TEDDER, T. F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. **Immunity.**, v. 23, n. 1, p. 7-18, 2005.
14. HARDY, R. R. B-1 B cell development. **J.Immunol.**, v. 117, n. 5, p. 2749-2754, 2006.
15. HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K.; HAAIJMAN, J.; HERZENBERG, L. A. B-cell subpopulations identified by two-colour fluorescence analysis. **Nature**, v. 297, n. 5867, p. 589-591, 1982.
16. HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K.; PARKS, D. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Murine B cell differentiation lineages. **J.Exp.Med.**, v. 159, n. 4, p. 1169-1188, 1984.
17. HARPER, H. M.; COCHRANE, L.; WILLIAMS, N. A. The role of small intestinal antigen-presenting cells in the induction of T-cell reactivity to soluble protein antigens: association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance. **Immunology**, v. 89, n. 3, p. 449-456, 1996.

18. HASTINGS, W. D.; GURDAK, S. M.; TUMANG, J. R.; ROTHSTEIN, T. L. CD5+/Mac-1- peritoneal B cells: a novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. **Immunol.Lett.**, v. 105, n. 1, p. 90-96, 2006.
19. HAYAKAWA, K. ; HARDY, R. R. Development and function of B-1 cells. **Curr.Opin.Immunol.**, v. 12, n. 3, p. 346-353, 2000.
20. HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. **J.Exp.Med.**, v. 161, n. 6, p. 1554-1568, 1985.
21. HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; HONDA, M.; HERZENBERG, L. A.; STEINBERG, A. D.; HERZENBERG, L. A. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 81, n. 8, p. 2494-2498, 1984.
22. HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; PARKS, D. R.; HERZENBERG, L. A. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. **J.Exp.Med.**, v. 157, n. 1, p. 202-218, 1983.
23. HERZENBERG, L. A.; STALL, A. M.; LALOR, P. A.; SIDMAN, C.; MOORE, W. A.; PARKS, D. R. et al. The Ly-1 B cell lineage. **Immunol.Rev.**, v. 93, p. 81-102, 1986.
24. ITAKURA, A.; SZCZEPANIK, M.; CAMPOS, R. A.; PALIWAL, V.; MAJEWSKA, M.; MATSUDA, H. et al. An hour after immunization peritoneal

B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity.

**J.Immunol.**, v. 175, n. 11, p. 7170-7178, 2005.

25. JACYSYN, J. F.; ABRAHAMSOHN, I. A.;MACEDO, M. S. Modulation of delayed-type hypersensitivity during the time course of immune response to a protein antigen. **Immunology**, v. 102, n. 3, p. 373-379, 2001.
26. KAGNOFF, M. F. Oral tolerance. **Ann N.Y.Acad.Sci.**, v. 392, p. 248-265, 1982.
27. KANTOR, A. B. ; HERZENBERG, L. A. Origin of murine B cell lineages. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 11, p. 501-538, 1993.
28. KERNER, J. D.; APPLEBY, M. W.; MOHR, R. N.; CHIEN, S.; RAWLINGS, D. J.; MALISZEWSKI, C. R. et al. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. **Immunity**., v. 3, n. 3, p. 301-312, 1995.
29. KHAN, W. N.; ALT, F. W.; GERSTEIN, R. M.; MALYNN, B. A.; LARSSON, I.; RATHBUN, G. et al. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. **Immunity**., v. 3, n. 3, p. 283-299, 1995.
30. KROESE, F. G.; BUTCHER, E. C.; STALL, A. M.; LALOR, P. A.; ADAMS, S.;HERZENBERG, L. A. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. **Int.Immunol.**, v. 1, n. 1, p. 75-84, 1989.



31. KROP, I.; DE FOUGEROLLES, A. R.; HARDY, R. R.; ALLISON, M.; SCHLISSEL, M. S.;FEARON, D. T. Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. **Eur.J.Immunol.**, v. 26, n. 1, p. 238-242, 1996.
32. LALOR, P. A. ; MORAHAN, G. The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires. **Eur.J.Immunol.**, v. 20, n. 3, p. 485-492, 1990.
33. LIDER, O.; SANTOS, L. M.; LEE, C. S.; HIGGINS, P. J.;WEINER, H. L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. **J.Immunol.**, v. 142, n. 3, p. 748-752, 1989.
34. MACKAY, I. R. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. **BMJ**, v. 321, n. 7253, p. 93-96, 2000.
35. MARTH, T.; RING, S.; SCHULTE, D.; KLENSCH, N.; STROBER, W.; KELSALL, B. L. et al. Antigen-induced mucosal T cell activation is followed by Th1 T cell suppression in continuously fed ovalbumin TCR-transgenic mice. **Eur.J.Immunol.**, v. 30, n. 12, p. 3478-3486, 2000.
36. MELAMED, D.; FISHMAN-LOVELL, J.; UNI, Z.; WEINER, H. L.;FRIEDMAN, A. Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. **Int.Immunol.**, v. 8, n. 5, p. 717-724, 1996.

37. MILLER, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L. M.; DAS, M. P.;WEINER, H. L. Epitopes of myelin basic protein that trigger TGF-beta release after oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. **J.Immunol.**, v. 151, n. 12, p. 7307-7315, 1993.
38. MILLER, A.; LIDER, O.; ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B.;WEINER, H. L. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 89, n. 1, p. 421-425, 1992.
39. MILLER, A.; LIDER, O.;WEINER, H. L. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens.**J.Exp.Med.**, v. 174, n. 4, p. 791-798, 1991.
40. MONTECINO-RODRIGUEZ, E. ; DORSHKIND, K. New perspectives in B-1 B cell development and function. **Trends Immunol.**, v. 27, n. 9, p. 428-433, 2006a.
41. MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.;DORSHKIND, K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. **Nat.Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 293-301, 2006b.
42. MOSMANN, T. R. ; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

43. MOWAT, A. M.; PARKER, L. A.; BEACOCK-SHARP, H.; MILLINGTON, O. R.;CHIRDO, F. Oral tolerance: overview and historical perspectives. **Ann N.Y.Acad.Sci.**, v. 1029, p. 1-8, 2004.
44. MUCIDA, D.; KUTCHUKHIDZE, N.; ERAZO, A.; RUSSO, M.; LAFAILLE, J. J.;CUIROTTO DE LAFAILLE, M. A. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. **J.Clin.Invest**, v. 115, n. 7, p. 1923-1933, 2005.
45. MURAKAMI, M. ; HONJO, T. B-1 cells and autoimmunity. **Ann N.Y.Acad.Sci.**, v. 764, p. 402-409, 1995a.
46. MURAKAMI, M. ; HONJO, T.. Involvement of B-1 cell in mucosal immunity and autoimmunity. **Immunol.Today**, v. 16, n. 11, p. 534-539, 1995b.
47. MURAKAMI, M.; YOSHIOKA, H.; SHIRAI, T.; TSUBATA, T.;HONJO, T. Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. **Int.Immunol.**, v. 7, n. 5, p. 877-882, 1995c.
48. NAGLER-ANDERSON, C.; TERHOUST, C.; BHAN, A. K.;PODOLSKY, D. K. Mucosal antigen presentation and the control of tolerance and immunity. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 120-122, 2001.
49. NAKAO, A.; KASAI, M.; KUMANO, K.; NAKAJIMA, H.; KURASAWA, K.;IWAMOTO, I. High-dose oral tolerance prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. **Int.Immunol.**, v. 10, n. 4, p. 387-394, 1998.

50. PERS, J. O.; JAMIN, C.; LYDYARD, P. M.; CHARREIRE, J.;YOUINOU, P.  
The H2 haplotype regulates the distribution of B cells into B-1a, B-1b and B-2 subsets. **Immunogenetics**, v. 54, n. 3, p. 208-211, 2002.
51. PERS, J. O.; JAMIN, C.; YOUINOU, P.;CHARREIRE, J. Role of IL-10 in the distribution of B cell subsets in the mouse B-1 cell population. **Eur.Cytokine Netw.**, v. 14, n. 3, p. 178-185, 2003.
52. PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.;DEMPFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 9, p. e362002.
53. POPI, A. F.; LOPES, J. D.;MARIANO, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 348-354, 2004.
54. RAWLINGS, D. J.; SAFFRAN, D. C.; TSUKADA, S.; LARGAESPADA, D. A.; GRIMALDI, J. C.; COHEN, L. et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. **Science**, v. 261, n. 5119, p. 358-361, 1993.
55. RIZZO, L. V.; MORAWETZ, R. A.; MILLER-RIVERO, N. E.; CHOI, R.; WIGGERT, B.; CHAN, C. C. et al. IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. **J.Immunol.**, v. 162, n. 5, p. 2613-2622, 1999.

56. RODRIGUES, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. **Immunology**, v. 117, n. 4, p. 517-525, 2006.
57. SHI, H. N.; GRUSBY, M. J.; NAGLER-ANDERSON, C. Orally induced peripheral nonresponsiveness is maintained in the absence of functional Th1 or Th2 cells. **J.Immunol.**, v. 162, n. 9, p. 5143-5148, 1999.
58. SIMIONI, P. U.; FERNANDES, L. G.; GABRIEL, D. L.; TAMASHIRO, W. M. Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin. **Scand.J.Immunol.**, v. 60, n. 3, p. 257-266, 2004.
59. STARR, T. K.; JAMESON, S. C.; HOGQUIST, K. A. Positive and negative selection of T cells. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 21, p. 139-176, 2003.
60. STEVENS, T. L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V. M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-258, 1988.
61. STOEL, M.; JIANG, H. Q.; VAN DIEMEN, C. C.; BUN, J. C.; DAMMERS, P. M.; THURNHEER, M. C. et al. Restricted IgA repertoire in both B-1 and B-2 cell-derived gut plasmablasts. **J.Immunol.**, v. 174, n. 2, p. 1046-1054, 2005.

62. STOERMANN, B.; KRETSCHMER, K.; DUBER, S.; WEISS, S. B-1a cells are imprinted by the microenvironment in spleen and peritoneum. **Eur.J.Immunol.**, v. 37, n. 6, p. 1613-1620, 2007.
63. STROBEL, S. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation. **Proc.Nutr.Soc.**, v. 60, n. 4, p. 437-442, 2001.
64. THOMAS, J. D.; SIDERAS, P.; SMITH, C. I.; VORECHOVSKY, I.; CHAPMAN, V.; PAUL, W. E. Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. **Science**, v. 261, n. 5119, p. 355-358, 1993.
65. TUMANG, J. R.; HASTINGS, W. D.; BAI, C.; ROTHSTEIN, T. L. Peritoneal and splenic B-1 cells are separable by phenotypic, functional, and transcriptomic characteristics. **Eur.J.Immunol.**, v. 34, n. 8, p. 2158-2167, 2004.
66. TUNG, J. W. ; HERZENBERG, L. A. Unraveling B-1 progenitors. **Curr.Opin.Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 150-155, 2007.
67. VIGNA, A. F.; GODOY, L. C.; ROGERIO DE, A. S.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro. **Immunol.Lett.**, v. 83, n. 1, p. 61-66, 2002.
68. WANG, Z.; CHEN, Z. J.; WHEELER, J.; SHEN, S.; NOTKINS, A. L. Characterization of murine polyreactive antigen-binding B cells: presentation of antigens to T cells. **Eur.J.Immunol.**, v. 31, n. 4, p. 1106-1114, 2001.

69. WASSERMAN, R.; LI, Y. S.; SHINTON, S. A.; CARMACK, C. E.; MANSER, T.; WIEST, D. L. et al. A novel mechanism for B cell repertoire maturation based on response by B cell precursors to pre-B receptor assembly. **J.Exp.Med.**, v. 187, n. 2, p. 259-264, 1998.
70. ZHANG, X.; IZIKSON, L.; LIU, L.; WEINER, H. L. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. **J.Immunol.**, v. 167, n. 8, p. 4245-4253, 2001.
71. ZHOU, Z. H. ; NOTKINS, A. L. Polyreactive antigen-binding B (PAB-) cells are widely distributed and the PAB population consists of both B-1+ and B-1- phenotypes. **Clin.Exp.Immunol.**, v. 137, n. 1, p. 88-100, 2004.



São Paulo, 11 de março de 2005.  
CEP 0096/05

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) LUIZ ANTONIO DE GENNARO  
Co-Investigadores: Mario Mariano;  
Disciplina/Departamento: Imunologia/Micro, Imuno e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Indução de tolerância oral e a participação de células B-1 em doença periodontal experimental no camundongo".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo experimental em camundongos para estabelecer um protocolo para indução de tolerância oral.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** não se aplica.

**OBJETIVOS:** estabelecer um protocolo para indução de tolerância oral, estabelecer um modelo murino de doença periodontal, verificar o padrão de resposta imune no tecido gengival e a migração de cels B-1 para o tecido gengival inflamado e determinar a produção sérica de anticorpos para colageno tipo I.

**RESUMO:** serão utilizados camundongos fêmeas com 8 - 12 semanas das linhagensBALB/c fornecidos pelo CEDEME e BALB/c Xid que serão fornecidos pela USP. Previamente a imunização, dois grupos de camundongos serão submetidos a indução de tolerância oral. Cada grupo receberá dose única por via oral 20 mg de OVA (ovalbumina) e Adjuvante completo de Freund ACF dissolvidos em PBS e cinco doses de 1 mg de OVA e ACF dissolvidos em PBS a cada dois dias, ambos serão desafiados no coxim plantar com 50 ul de um solução de 10 ul de OVA e PPD respectivamente. Em seguida será induzida experimentalmente de doença periodontal e os camundongos previamente imunizados e desafiados serão sacrificados e amostras gengivais serão colhidas para avaliações morfológicas das lesões e avaliação da resposta imune no tecido gengival, a migração de cels B-1 para o tecido gengival inflamado e a detecção sérica de Ac para colágeno do tipo.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Supõe-se que a indução da tolerancia oral em indivíduos portadores de doenças com características auto-ímmunes possam representar uma forma efetiva no controle dessas formas de doença..

**MATERIAL E MÉTODO:** descritas todas as fases dos experimentos.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** sem financiamento específico (R\$ 9 219,46).

**CRONOGRAMA:** adequado 48 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Doutorado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** 06/03/2006 e 01/03/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)