

Diana Vilas Boas e Silva

Efeitos sistêmicos da tolerância oral diminuem a gravidade da
reação de enxerto-*versus*-hospedeiro em camundongos

Belo Horizonte

ICB/UFMG

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Diana Vilas Boas e Silva

Efeitos sistêmicos da tolerância oral diminuem a gravidade da
reação de enxerto-*versus*-hospedeiro em camundongos

Dissertação apresentada ao Departamento de Morfologia – Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadores

Prof. Dra. Cláudia Rocha Carvalho

Prof. Dr. Nelson Monteiro Vaz

Colaborador

Dr. Geraldo Magela de Azevedo Júnior

Agosto/2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com o apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

"A maneira de aprender é por experiência e erro, erro, erro."

Buckminster Fuller

"Experiência é aquilo que a gente ganha quando nada dá certo."

Millôr Fernandes

Aos meus pais, Nelson e Ana Maria, pela contribuição constante com a minha vida pessoal e profissional, pelo amor e pelo exemplo de luta.

Aos meus irmãos, Livia e Mateus, pelo companheirismo, pelo apoio constante e pelo enorme carinho.

Aos meus tios e primos, pela alegria com a qual me ensinam a conduzir a vida.

Agradecimentos

A Deus, cuja presença foi sempre sensível.

Aos meus orientadores, Cláudia e Nelson, pela confiança, pelo aprendizado e pela paciência.

Ao Geraldo, pela solicitude e paciência durante as análises histopatológicas.

À Raquel, ao Claudiney e ao André Pires, pela ajuda durante os experimentos; aos demais colegas de laboratório, pela convivência tão agradável.

Aos colegas do Laboratório de Imunobiologia, pelas discussões imensamente construtivas e pelas sextas-feiras tão agradáveis.

Ao Laboratório de Biologia da Reprodução, pela disponibilização do sistema de captura de imagens digitais, e em especial ao André, pela enorme boa vontade em ajudar.

Aos amigos do grupo Iriri_Island (ordem alfabética: André, Carlos, Denilson, Dênis, Graciela, Isabela, Luciana, Marcelo e Miriam), pelos momentos de risada, pela amizade e pelo companheirismo.

Aos demais amigos (Santa Rita, Santo Agostinho, Loyola, UFMG, Elite/Bernoulli), pelos momentos tão agradáveis e construtivos, e pela amizade sincera.

Aos professores Hélio Chiarini, Walderez Dutra e Gerluza Borges, pela confiança e pelo apoio.

Resumo

A tolerância oral é definida como um estado no qual ocorre diminuição da resposta imune a antígenos previamente contatados por via digestiva quando esses mesmos antígenos são re-introduzidos por via parenteral. Em organismos tolerantes orais, a exposição parenteral a antígenos tolerados não desencadeia resposta imune específica e, além disso, inibe a resposta imune a antígenos não relacionados injetados concomitantemente ou pouco tempo depois, um fenômeno denominado "efeito indireto da tolerância oral". Resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa sugerem que a reação de enxerto-*versus*-hospedeiro (GvHR, do inglês *graft-versus-host reaction*), uma complicação decorrente do transplante de células hematopoiéticas, pode ser amenizada pelos efeitos indiretos da tolerância oral – uma observação de grande importância médica. Em nosso trabalho aprofundamos os estudos anteriores dos efeitos da injeção parenteral de antígenos tolerados na GvHR. Para tal, camundongos doadores C57BL/6 (H2-b/b) e receptores B6D2F1 (H2-b/d) foram tolerizados por meio da administração oral de solução de clara de ovo 1:5 *ad libitum* durante quatro dias. Uma semana após esse tratamento, realizou-se o transplante i.v. de 1×10^8 células de baço e linfonodos inguinais de parentais (C57BL/6) para camundongos B6D2F1 para desencadear uma GvHR aguda. Concomitantemente com a transferência das células linfóides, o grupo experimental recebeu uma injeção i.p. de ovalbumina em adjuvante $Al(OH)_3$ para desencadear o "efeito indireto" amenizador. Os animais receptores foram sacrificados 14 ou 50 dias após o transplante para análise histológica do fígado, intestino e baço, ou acompanhados durante 50 dias para análises de massa corpórea e sobrevivência. Nossos resultados mostram que camundongos tolerantes submetidos à GvHR, quatorze dias após a indução da doença, apresentaram melhor situação histológica quando comparados ao grupo não tolerante. Além disso, a sobrevivência desses animais foi maior que a dos demais grupos com GvH. Entretanto, a perda de massa corpórea decorrente da GvHR não foi afetada pelos efeitos indiretos da tolerância oral, assim como o chamado "índice esplênico", que se baseia no aumento do baço. Análises histopatológicas realizadas cinquenta dias após a indução da GvHR mostraram que não mais havia diferenças entre os grupos como aquelas observadas aos quatorze dias.

Palavras-chave: tolerância oral, efeitos indiretos, GvH

Lista de abreviaturas

APC (*antigen presenting cell*): célula apresentadora de antígenos
CD (*cluster of differentiation*): grupo de diferenciação
CFA (*complete Freund adjuvant*): adjuvante completo de Freund
CTL (*cytotoxic T lymphocyte*): linfócito T citotóxico
DC (*dendritic cell*): célula dendrítica
DNP (*dinitrophenyl*): dinitrofenil
DTH (*delayed-type hypersensitivity*): hipersensibilidade do tipo tardia
EAE (*experimental allergic encephalomyelitis*): encefalomielite alérgica experimental
EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*): ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*): ensaio imunoenzimático
aGvH (*acute graft-versus-host*): enxerto-*versus*-hospedeiro aguda
cGvH (*chronic graft-versus-host*): enxerto-*versus*-hospedeiro crônica
GvH (*graft-versus-host*): enxerto-*versus*-hospedeiro
GvHR (*graft-versus-host reaction*): reação de enxerto-*versus*-hospedeiro
GvL (*graft-versus-leukemia*): enxerto-*versus*-leucemia
HBSS (*Hanks balanced salt solution*): solução salina balanceada
HLA (*human leukocyte antigen*): antígeno leucocitário humano
HSP (*heat shock protein*): proteína de choque térmico
IBD (*inflammatory bowel disease*): doença inflamatória intestinal
IEL (*intraepithelial lymphocytes*): linfócitos intraepiteliais
IFA (*incomplete Freund adjuvant*): adjuvante incompleto de Freund
IFN- γ (*interferon gamma*): interferon gama
IL (*interleukin*): interleucina
IL-2R (*interleukin-2 receptor*): receptor de interleucina-2
Ig: imunoglobulina
KLH (*keyhole limpet haemocyanin*): hemocianina de gastrópode
LPS: lipopolissacarídeo
LT: linfócito T
MBP (*myelin basic protein*): proteína básica de mielina
MHC (*major histocompatibility complex*): complexo principal de histocompatibilidade
miHA (*minor histocompatibility antigens*): antígenos menores de histocompatibilidade
MLN (*mesenteric lymph node*): linfonodo mesentérico
Ova (*ovalbumin*): ovalbumina
PBS (*phosphate-buffered saline*): solução salina tamponada contendo fosfato
PP (*Peyer patch*): placa de Peyer
SEA (*soluble egg antigen*): antígeno solúvel de ovo de *Schistosoma mansoni*
TCR (*T cell receptor*): receptor de células T
TGF- β (*tumor growth factor-beta*): fator beta de crescimento tumoral
TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*): fator alfa de necrose tumoral

Lista de figuras

Figura 1: Protocolo experimental	28
Figura 2: O pré-tratamento oral com Ova resultou em menores níveis séricos de imunoglobulinas anti-Ova	35
Figura 3: Efeito da injeção de uma proteína tolerada na sobrevivência dos animais submetidos à reação de GvH. 36	
Figura 4: A tolerância oral não alterou a perda de massa corpórea	37
Figura 5: A tolerância oral não alterou a perda de massa corpórea	38
Figura 6: A tolerância oral não alterou o índice esplênico dos camundongos com GvHR	39
Figura 7: A tolerância oral não alterou o índice esplênico dos camundongos com GvHR	40
Figura 8: Os efeitos indiretos da tolerância oral amenizaram as alterações histopatológicas no fígado decorrentes da reação de GvH aguda	42
Figura 9: Os efeitos indiretos da tolerância oral amenizaram as alterações histopatológicas no intestino decorrentes da reação de GvH aguda	44
Figura 10: A reação de GvH aguda alterou a proporção vilosidade:cripta no intestino proximal	45
Figura 11: A porcentagem de células calciformes no intestino delgado proximal encontrou-se diminuída em decorrência da reação de GvH aguda	45
Figura 12: A reação de GvH promoveu depleção de linfócitos na polpa branca	47
Figura 13: Leucopenia grave é característica da reação de GvH.....	48
Figura 14: Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR.....	50
Figura 15: Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR.....	51
Figura 16: Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR.....	52
Figura 17: Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR.....	53
Figura 18: Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR.....	54

Sumário

1. Revisão da literatura	11
1.1. Reação de enxerto- <i>versus</i> -hospedeiro (GvHR)	11
1.1.1. Caracterização da doença.....	11
1.1.2. Mecanismos da GvHR.....	13
1.1.3. Tratamento	17
1.2. Atividades inflamatórias em diversas patologias.....	18
1.2.1. A inflamação como uma atividade fisiológica	18
1.2.2. A inflamação e a patologia	19
1.2.3. Bloqueio da inflamação em animais tolerantes orais	20
1.2.4. Bloqueio da inflamação pela injeção de uma proteína tolerada.....	22
1.3. Alteração da reação de enxerto- <i>versus</i> -hospedeiro pela injeção de uma proteína tolerada	25
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Materiais e métodos.....	27
3.1. Camundongos	27
3.2. Indução de tolerância oral a Ovalbumina	27
3.3. Indução de GvHR.....	28
3.4. Injeção i.p. do antígeno tolerado para desencadear os efeitos indiretos	28
3.5. Contagem de leucócitos no sangue periférico	29
3.6. Avaliação da massa corpórea dos animais	29
3.7. Processamento e análise histológica	29
3.8. Quantificação das imunoglobulinas séricas por ELISA.....	31
3.9. Análise estatística	32
3.10. Soluções utilizadas.....	32
4. Resultados	34
4.1. O tratamento oral resultou em menores níveis séricos de imunoglobulinas específicas.....	34
4.2. A tolerância oral interferiu na sobrevivência dos animais submetidos à reação de GvH.....	35
4.3. A injeção i.p. de um antígeno tolerado não alterou a perda de massa corpórea e o índice esplênico de camundongos com GvHR.....	37
4.4. Alterações histopatológicas são diferentes no fígado dos animais que receberam a injeção do antígeno tolerado em relação aos animais dos outros grupos.....	40
4.5. Alterações histopatológicas são diferentes no intestino dos animais que receberam a injeção do antígeno tolerado em relação aos animais dos outros grupos.....	42
4.6. A reação de GvH promoveu depleção de linfócitos na polpa branca	46
4.7. Leucopenia grave é característica da reação de GvH	47
4.8. Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR	48
5. Discussão.....	55
6. Conclusões	66
7. Referências Bibliográficas.....	67

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Reação de enxerto-versus-hospedeiro (GvHR)

1.1.1. Caracterização da doença

A reação de enxerto-versus-hospedeiro (*graft-versus-host reaction*, GvHR) é uma importante complicação clínica comum após o transplante de medula óssea em pacientes com doenças hematopoiéticas malignas ou não malignas, sendo o maior obstáculo para a realização de transplantes hematopoiéticos. A GvH caracteriza-se em humanos por um processo inflamatório desencadeado pela transfusão de células imunocompetentes de um doador para um receptor imunodeficiente, devendo existir entre esses indivíduos incompatibilidade de HLA (*Human Leucocyte Antigen*) (Chao, 1992). É uma doença caracterizada por lesões cutâneas, entéricas e hepáticas, leucopenia grave (apoptose de leucócitos periféricos), diarreia, acompanhadas por perda de peso e mortalidade (Baker *et al.*, 1996; Chao, 1992; Ichiki *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2000; Nestel *et al.*, 1992).

A descoberta da doença ocorreu com os trabalhos de Murphy, em 1916. Trabalhando com o transplante de órgãos de galinhas adultas para membranas cório-alantóideas de embriões, esse pesquisador detectou o aumento do tamanho do baço dos animais receptores (Murphy, 1916). Embora esse constitua o primeiro relato de GvH na literatura, tal doença ainda não era conhecida na época, e a esplenomegalia observada nos experimentos de Murphy foi então atribuída a alguma estimulação provocada pelo órgão transplantado. É digno de nota o fato de que apenas aloenxertos contendo grande número de leucócitos provocavam as alterações descritas. Aloenxertos de cartilagem, músculo e osso, ou ainda xenoenxertos, não provocavam GvH.

Anos mais tarde, o pesquisador Ray Owen observou que a maioria dos gêmeos bovinos dizigóticos nascia com uma proporção de células sanguíneas pertencente ao irmão gêmeo, ou seja, esses indivíduos nasciam como quimeras (Owen, 1945). Essas células permaneciam por muito tempo na circulação dos animais. Percebeu-se posteriormente que entre as quimeras da mesma gestação poderiam ser realizados enxertos de pele sem que os animais os rejeitassem. Experimentos nessa direção foram realizados em camundongos de linhagens isogênicas por Peter Medawar e colaboradores. Animais da linhagem CBA que receberam, *in utero*, infusão de células alogênicas (rim, baço e fígado) de doadores da linhagem A foram incapazes de rejeitar, quando adultos, enxertos de pele dos doadores A (Billingham *et al.*, 1953). Essa tolerância a aloenxertos foi atribuída à deleção de clones reativos aos antígenos de A nos animais CBA, e serviu de base à proposta da Teoria de seleção clonal de Burnet sobre a atividade imunológica (Burnet, 1959). Essa é a teoria dominante na Imunologia até o presente.

Nessa mesma época, trabalhos semelhantes aos de Murphy foram realizados por Morten Simonsen. Células de baço de galinhas adultas enxertadas em membranas cório-alantóideas de embriões desencadeavam uma reação intensa provocada pelas células do doador, resultando em alta taxa de mortalidade nos animais recém-saídos do ovo. Em experimentos com camundongos, Simonsen ensaiou várias linhagens doadoras e mostrou uma grande incidência de GvH grave e mortal pela transferência de linfócitos de animais adultos para receptores recém-natos de outras linhagens (Simonsen, 1957). Isto sugeria que os resultados obtidos por Medawar, que mostram a ocorrência de alo-tolerância sem ocorrência de GvHR, eram excepcionais e talvez se devessem à grande proximidade genética entre as linhagens de camundongos utilizadas (CBA e A).

A ocorrência de GvHR está vinculada à incapacidade das células do receptor em rejeitar as células do doador, e também a diferenças genéticas entre doador e receptor (Vogelsang *et al.*, 2003). Diferenças tanto no HLA (antígenos codificados por genes do complexo MHC) quanto

em antígenos menores de compatibilidade (miHA) podem levar à ocorrência da doença. Os antígenos HLA (denominados H-2 em camundongos) são codificados por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), enquanto os miHA são variações alélicas em diversos tipos de genes, que geram peptídeos "apresentados" pelo MHC (Bleakley & Riddell, 2004; Shlomchik *et al.*, 1999). A compatibilidade no MHC facilita e acelera a pega do transplante, mas mesmo quando há identidade de MHC entre doadores e receptores, a GvHR pode ocorrer devido às diferenças já mencionadas nos miHA (Vogelsang *et al.*, 2003)¹. Os genes do MHC são extremamente polimórficos, existindo, para cada um dos loci que compõem o complexo gênico, dezenas ou mesmo centenas de alelos. Em decorrência desse grande polimorfismo, associado à poligenia dos genes do MHC, é praticamente impossível encontrar compatibilidade entre doadores e receptores que não sejam aparentados.

É importante ressaltar que como parte da reação de GvH observa-se a reação de enxerto-*versus*-leucemia (*graft-versus-leukemia*, GvL), que consiste na destruição das células cancerosas do indivíduo receptor pelas células saudáveis do doador. A não ocorrência da GvL está vinculada a uma maior chance de recidivas de doenças malignas, correlacionando-se a um pior prognóstico para o paciente. Há, portanto, a necessidade de se desenvolver métodos que evitem a GvHR, sem diminuir a GvL.

1.1.2. Mecanismos da GvHR

Apesar dos esforços dispensados aos estudos da GvH, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença não estão completamente elucidados. Estudos com modelos animais são muito importantes para ampliar o entendimento dos mecanismos da reação de GvH,

¹ A GvHR pode ocorrer mesmo entre gêmeos univitelinos, havendo também a possibilidade de GvHR autóloga (NAKAMURA, H., NAKAO, T., UJIIE, H., KARASUNO, T., TESHIMA, H., KOMATSU, K., ISHIGURO, S., HIRAOKA, A. and MASAOKA, T. (1999). Induction of autologous graft-versus-host disease after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, S457-461.)

sendo o primeiro passo no sentido de elucidar a condição que ocorre em humanos. O início dos trabalhos com GvH, realizados por Simonsen, utilizava um modelo de transplante semi-alogênico, no qual células de camundongos doadores parentais eram transferidas para receptores F1. Dessa forma, as células dos doadores, que possuíam apenas um haplotipo H-2, reagiam com as células dos animais híbridos F1, que expressavam os antígenos H-2 de ambos os haplotipos parentais. A maioria dos estudos atuais, entretanto, utiliza modelos de transplantes alogênicos para camundongos receptores irradiados.

Em camundongos receptores irradiados, após a injeção i.v. de leucócitos alogênicos, as células "naive" (não ativadas) do doador são retidas em órgãos linfóides secundários, sendo aí ativadas por APCs do hospedeiro e colocadas em ciclo mitótico. Três a quatro dias depois, os linfoblastos entram na circulação periférica, sendo então capazes de infiltrar em tecidos não linfóides de várias regiões do corpo, desencadeando aí as lesões cutâneas, hepáticas, entéricas e outras, que são características da doença (Baker *et al.*, 1996; Chakraverty & Sykes, 2007; Ichiki *et al.*, 2006). Trabalhos recentes, entretanto, mostram que a reatividade das células T com antígenos do hospedeiro não leva automaticamente a lesões teciduais. É possível que reações inflamatórias causadas pelo próprio regime de condicionamento (quimioterapia e radioterapia), necessário para aceitação do transplante alogênico, facilitem a ocorrência da GvH por influenciar o recrutamento de linfócitos nos tecidos periféricos (Chakraverty *et al.*, 2006). Em geral, os regimes de condicionamento atuam sobre o ciclo celular, sendo então tóxicos para vários tecidos, particularmente para o trato gastrointestinal. Já foi mostrado que quimioterapias e radioterapias aumentam a permeabilidade intestinal, permitindo assim a passagem de produtos bacterianos como o LPS da luz intestinal para a circulação. O LPS que entra na circulação sanguínea acaba potencializando a patogênese da GvH por estimular macrófagos e outros tecidos a produzir citocinas pró-inflamatórias, entre as quais TNF- α e IFN- γ , que contribuem para as lesões teciduais (Nestel *et al.*, 1992; Vogelsang *et al.*, 2003). Além da importância dos

macrófagos na patologia, outros estudos mostram que a citotoxicidade mediada por perforina/granzima e a apoptose mediada pela interação Fas/Fas ligante (FasL) são importantes tanto na reação de GvH quanto na GvL, evidenciando o envolvimento de ambos os mecanismos em fases diferentes do desenvolvimento da doença (Baker *et al.*, 1996; Vogelsang *et al.*, 2003).

De acordo com a sugestão da agência americana NIH (*National Institutes of Health*), costuma-se dividir a GvH em aguda e crônica de acordo com o tipo de manifestação clínica apresentada (Holler, 2007). A GvH aguda (aGvH) caracteriza-se por lesões cutâneas, hepáticas e entéricas, leucopenia grave e diarreia, além de promover perda de peso e mortalidade. Em camundongos, essas alterações começam a aparecer quatorze dias após a indução da doença. As manifestações entéricas são caracterizadas clinicamente por náusea, vômito, anorexia, diarreia, e/ou dor abdominal. Na histologia, é visível a apoptose de células na base da cripta, às vezes acompanhada por infiltrado inflamatório. A histologia hepática evidencia a presença de infiltrados inflamatórios ao redor do ducto biliar, o que leva à destruição do ducto, acarretando icterícia. Nesse infiltrado predominam células T do doador (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺). As lesões hepáticas ocorrem via Fas/FasL (Vogelsang *et al.*, 2003).

A GvH crônica apresenta um quadro clínico bem diferente da doença aguda, assemelhando-se mais a uma patologia autoimune (Lee, 2005). É caracterizada por lesões em diversos tecidos do corpo, como rins, olhos, unhas, pele, pulmão, boca, fígado etc.

Estudos sobre a GvH aguda em camundongos revelaram que a presença de células apresentadoras de antígenos (APCs) do receptor é essencial para o desencadeamento da doença em um modelo de GvH dependente de células T CD8⁺ e com diferenças apenas nos miHA entre doadores e receptores (Shlomchik *et al.*, 1999). Outros estudos mostram que APCs do receptor são não só necessárias, mas também suficientes para desencadear GvHD (Holler, 2007; Matte *et al.*, 2004). Corroborando esses dados, Chakraverty e Sykes demonstraram que as APCs do receptor são necessárias para iniciar a patologia aguda (aGvH) e para máxima

resposta GvL. Após o transplante, essas células vão sendo substituídas pelas APCs do doador, sendo que a rapidez e a extensão desse processo dependem da intensidade do condicionamento. É indiscutível, entretanto, a importância das APCs do doador nesse processo. As células apresentadoras do doador, apesar de não serem suficientes para iniciar a GvH, podem atuar na perpetuação das lesões teciduais observadas na doença crônica (Chakraverty & Sykes, 2007). Além disso, estudos mostram que animais que receberam células de medula sem o gene da $\beta 2$ microglobulina (nocautes) desenvolveram GvH mais branda. Entretanto, essas mesmas células apresentadoras do doador parecem não ser importantes para o desencadeamento de GvL (Matte *et al.*, 2004).

De maneira diferente da aGvH, na patologia crônica bastam APCs do doador ou do receptor, além dos linfócitos alorreativos, para que ocorram as alterações cutâneas decorrentes da doença. Apesar disso, as APCs do receptor parecem ser mais importantes nesse contexto, sendo necessárias para a máxima penetrância da patologia. As manifestações entéricas da cGvH dependem da estimulação dos linfócitos T do doador pelas APCs do doador. No caso da cGVHD cutânea, APCs do receptor possuem papel predominante. Assim, parece que os requisitos para se iniciar GvH nos diferentes órgãos são também diferentes. Em relação às manifestações no intestino, mostrou-se importante papel das moléculas coestimulatórias CD40, CD80 e CD86 no desenvolvimento da patologia. A GvH entérica é atenuada quando a medula transplantada é deficiente em moléculas co-estimulatórias chave (Anderson *et al.*, 2005).

Utilizando um modelo murino de GvH, Murai e colaboradores apontaram as placas de Peyer como importantes na indução da doença, além de demonstrarem a importância de moléculas quimiotáticas (CCL5), produzidas por células dendríticas, e da interação entre moléculas de adesão entre células e endotélio (integrina $\alpha_4\beta_7$ -MAdCAM-I) no desenvolvimento da GvH. Isso evidenciou o papel essencial da migração celular na patologia (Murai *et al.*, 2003).

1.1.3. Tratamento

Apesar dos vários estudos realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos que levam à manifestação da GvH, pouco se sabe efetivamente sobre tais processos. Além disso, a GvH é uma reação inflamatória sistêmica, o que acrescenta dificuldade ao desenvolvimento de terapias preventivas. Atualmente, as terapias mais utilizadas no tratamento da GvH são baseadas em imunossupressão, com a utilização de drogas como ciclosporina (inibidor da produção de IL-2), metotrexato (agente anti-proliferativo), prednisona e tacrolimus, o que desencadeia nos pacientes inúmeros efeitos indesejados (Anasetti, 2004). Apesar do papel pró-inflamatório apresentado pela IL-2 no contexto da GvH, a utilização de anticorpos monoclonais anti-IL-2R em estudos clínicos mostrou resultados pouco satisfatórios (Reddy & Ferrara, 2003).

A GvH não se manifesta se os linfócitos T forem removidos do enxerto. Assim sendo, percebeu-se que a eliminação de linfócitos do enxerto seria o meio mais eficaz de impedir a GvH. Entretanto, nesses casos há também um maior risco de falha na pega do enxerto, além de diminuição na reação de GvL, o que acaba por aumentar a ocorrência de recidivas em caso de doenças malignas, de forma que a taxa de mortalidade dos pacientes não se altera (Anasetti, 2004; Chao, 1992; Ichiki *et al.*, 2006). Um determinado nível de reatividade GvH parece, então, ser benéfico para o prognóstico do paciente. De fato, estudos mostram a importância da reação entre os linfócitos transplantados e as células malignas dos receptores na prevenção de recidivas (reação de enxerto-*versus*-leucemia). Como mostrado por Bleakley em 2004, pacientes que receberam células-tronco alogênicas tiveram menor risco de recidivas do que receptores de células singênicas (irmãos gêmeos idênticos) ou de medula alogênica sem células T (Bleakley & Riddell, 2004).

1.2. Atividades inflamatórias em diversas patologias

1.2.1. A inflamação como uma atividade fisiológica

O conceito de inflamação é antigo e surgiu no domínio da Patologia, em uma época na qual a Imunologia ainda não existia como ciência. Apesar de facilmente identificada na clínica pelos sinais de dor, calor, rubor, edema e perda de função, pouco se sabia sobre seu mecanismo. No final do sec. XIX, o cientista russo Elie Metchnikoff (1845-1916) lançou importantes contribuições para o entendimento do fenômeno inflamatório. Por meio de estudos embriológicos, Metchnikoff foi quem primeiro descreveu as funções das células fagocíticas que hoje conhecemos como os macrófagos e neutrófilos dos vertebrados. Esses fagócitos estavam presentes em indivíduos menos derivados como os dos grupos *Cnidaria* e *Ctenophora*, exercendo nesses animais as funções tanto de nutrição quanto de “defesa” do organismo. Em cordados mais derivados, essas funções permaneceriam, mas com diferentes repercussões fisiológicas. A presença de um sistema digestivo desenvolvido dispensou a função de nutrição associada à fagocitose. Esse fenômeno seria agora importante para a manutenção da integridade do organismo através da eliminação de restos celulares (corpos apoptóticos, células necróticas etc), definição da estrutura do organismo (desaparecimento da cauda do girino durante a metamorfose), além da eliminação de corpos externos (bactérias, fungos, partículas virais e outros antígenos). O ponto mais importante desses achados é a visão da fagocitose (e da inflamação) como processo primariamente fisiológico (Tauber, 2003). De fato, ainda em 1870, o patologista britânico Julius Cohnheim descreveu a diapedese, colocando a inflamação como um mecanismo fisiológico, apesar de ainda se saber muito pouco sobre esse fenômeno (Parnes, 2003). Por sua importante contribuição, Metchnikoff dividiu o prêmio Nobel com Paul Ehrlich em

1908. A partir de então a Imunologia foi oficialmente reconhecida como ramo da ciência (Kaufmann, 2008).

É possível encontrar trabalhos que mostram diversas condições fisiológicas que se relacionam com a inflamação. A ovulação (Brannstrom & Enskog, 2002), o exercício físico intenso (Pedersen & Toft, 2000) e o envelhecimento (Muller-Werdan, 2007) constituem exemplos de processos não infecciosos que vêm acompanhados de reações inflamatórias. Além disso, temos a inflamação constitutiva da mucosa intestinal, com a presença de milhares de folículos linfóides organizados e de inúmeros leucócitos dispostos difusamente na lâmina própria (Macdonald & Monteleone, 2005).

1.2.2. A inflamação e a patologia

Apesar de a inflamação ser um processo fisiológico, a exacerbação desse processo pode ter conseqüências patológicas. Como exemplo dessas inflamações patológicas é possível citar a artrite reumatóide, a esclerose múltipla, a “doença do soro” identificada por Pirquet, a inflamação pulmonar exagerada observada na tuberculose, as reações de hipersensibilidade e as doenças inflamatórias intestinais conhecidas pela sigla IBD² (*inflammatory bowel diseases*). Muitas dessas patologias são atualmente denominadas “autoimunes” e, além do envolvimento de linfócitos, não têm causa conhecida. É possível que antígenos de bactérias comensais sejam responsáveis pelo desencadeamento de algumas das doenças, como a colite ulcerativa e a doença de Crohn (Macdonald & Monteleone, 2005). Entretanto, é importante salientar que esse quadro inflamatório é gerado e mantido pela própria maquinaria do organismo (Parnes, 2003). Um argumento a favor disso é a presença de patógenos em indivíduos sadios: a simples

² Doença de Crohn e colite ulcerativa são doenças inflamatórias intestinais (IBD) de causa desconhecida. É possível que antígenos de bactérias comensais sejam responsáveis pelo desencadeamento das doenças. Nessas patologias, o infiltrado inflamatório na mucosa intestinal torna-se intenso. Pacientes com a doença de Crohn parecem ter um problema no recrutamento inicial de neutrófilos e uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 β .

presença do patógeno não gera a patologia; é necessária a contribuição do organismo para originar a doença. Também, em nossos experimentos observamos como organismos tolerantes e não tolerantes reagem diferentemente frente ao mesmo estímulo, que é a injeção de uma proteína (ovalbumina). Se a simples injeção do antígeno fosse o fator determinante da conduta do organismo, não haveria diferença nas respostas observadas em indivíduos tolerantes e não tolerantes expostos à mesma proteína por via parenteral.

1.2.3. Bloqueio da inflamação em animais tolerantes orais

O termo “tolerância imunológica” é normalmente usado para se referir à diminuição ou inibição de respostas imunes tanto a antígenos do próprio organismo (tolerância aos auto-componentes) quanto a antígenos externos ao organismo contatados por via mucosa (tolerância mucosa). A tolerância oral seria então uma faceta da tolerância imunológica ou, mais especificamente, da tolerância mucosa. Ela é originalmente definida como um estado no qual ocorre diminuição da resposta imune a antígenos previamente contatados por via oral quando esses mesmos antígenos são re-introduzidos por via parenteral (Faria & Weiner, 1999; Faria & Weiner, 2005). Todas as manifestações das respostas imunes específicas tanto *in vivo*, como formação de anticorpos e reação de hipersensibilidade tardia, quanto *in vitro*, como a ativação linfocitária, sofrem interferência da tolerância oral (Strobel & Mowat, 1998; Vaz & Carvalho, 1994).

A tolerância imunológica é convencionalmente explicada por vários mecanismos: deleção clonal de linfócitos T auto-reativos no timo, anergia e supressão mediada por células T regulatórias (Treg) (Abbas *et al.*, 2004; Faria & Weiner, 1999). O termo “tolerância” foi citado por Medawar e Burnet, sendo um ponto central na Teoria de seleção clonal (Burnet, 1959) e envolvendo a idéia de que o sistema imune, responsável pela atividade de defesa do organismo

contra materiais estranhos, deve fazer uma distinção entre esses antígenos estranhos e os auto-componentes a fim de evitar a auto-imunidade patogênica. Dessa forma, o sistema imune trabalharia com uma premissa principal que postula a distinção entre *self* e *nonself*, e a auto-tolerância consistiria então no silenciamento da reatividade imunológica ao próprio.

Essa definição tradicional, entretanto, parece não corresponder à fisiologia do sistema imune. Experimentos realizados por Bandeira e Coutinho mostraram que camundongos CBA neonatos que receberam esplenócitos de C57BL/6 por via endovenosa aceitaram, quando adultos, enxertos de pele do doador alogênico (C57BL/6). Alguns dos camundongos CBA, entretanto, rejeitaram o enxerto – ou seja, neles a tolerância não se estabeleceu. A quantificação dos esplenócitos desses indivíduos mostrou que eles possuíam menos células ativadas do que os animais tolerantes, que aceitaram o enxerto. Desse modo, pode-se evidenciar que a tolerância imunológica não consiste em ausência de reatividade. Pelo contrário, a tolerância se relaciona a um elevado nível de ativação linfocitária (Bandeira *et al.*, 1989). Diversos outros estudos mostraram que a existência de células auto-reativas corresponde à situação padrão, ocorrendo em indivíduos saudáveis (Avrameas, 1991). Moalem e cols. mostraram que células auto-reativas podem ter um papel fisiológico importante. Em seu modelo experimental, animais com lesão no nervo óptico que receberam injeção de células T ativadas que reagiam com proteína básica de mielina (MBP) apresentaram menor nível de degeneração secundária. Linfócitos T ativados específicos para outros antígenos não tiveram esse mesmo efeito benéfico (Moalem *et al.*, 1999). Schwartz e Cohen ressaltam que as células auto-reativas endógenas (que já estavam no organismo do animal no momento da indução da lesão) foram muito menos eficientes na manutenção do sistema nervoso central do que as células injetadas (Schwartz & Cohen, 2000). Níveis fisiológicos de auto-reatividade parecem, então, corresponder a um processo intrínseco ao funcionamento do sistema imune, e disso depende o funcionamento saudável desse sistema (Cohen, 1992).

1.2.4. Bloqueio da inflamação pela injeção de uma proteína tolerada

Embora o termo tolerância oral remeta a uma idéia de não reatividade ou de algum evento subtrativo da atividade imunológica, a exposição parenteral de animais a um antígeno ao qual foi previamente induzida tolerância oral pode bloquear também outras reações imunológicas não diretamente relacionadas (Carvalho & Vaz, 1996). Portanto, a possibilidade da injeção de um antígeno tolerado inibir a formação de anticorpos ou a inflamação desencadeada por antígenos não especificamente relacionados atesta que a tolerância deve ser vista como um fenômeno imunológico ativo.

Datam de meados da década de 60 os primeiros estudos relacionados às respostas imunes a dois ou mais antígenos injetados simultaneamente. Os trabalhos de Brody mostraram, pela primeira vez, que a exposição simultânea de coelhos a dois haptenos diferentes promovia diminuição da produção de imunoglobulinas específicas para os dois epitopos (Brody *et al.*, 1967). Esse fenômeno, denominado "competição antigênica", somente ocorria se os dois determinantes haptênicos fossem injetados no mesmo local (Brody & Siskind, 1969).

Em artigo publicado no ano de 1981, Vaz e colaboradores mostraram uma diminuição da resposta anti-DNP em camundongos tolerantes orais a Ova imunizados simultaneamente com DNP-Ova e DNP-KLH. Camundongos não tolerantes apresentaram, nesse contexto imunogênico, altos títulos de imunoglobulinas anti-DNP (Vaz *et al.*, 1981). A esse fenômeno foi dado o nome de "supressão cruzada" (*cross suppression*).

Anos depois, Miller e colaboradores demonstraram que a injeção concomitante de ovalbumina e MBP, em adjuvante completo de Freund (CFA), em camundongos tornados previamente tolerantes à Ova, diminuía a severidade da encefalomielite alérgica experimental (EAE) induzida pela MBP (Miller *et al.*, 1991). Esses foram os primeiros estudos que mostraram que a tolerância oral influenciava eventos não relacionados diretamente à proteína tolerada

(Miller *et al.*, 1991; Vaz *et al.*, 1981). Miller e cols. sugeriram que fatores solúveis da família do TGF- β estariam envolvidos na diminuição das respostas imunes à proteína tolerada, e inibiriam inespecificamente outras reações que estivessem ocorrendo ao mesmo tempo. A essa inibição de respostas inespecíficas desencadeada pela presença do antígeno tolerado o autor denominou "supressão do espectador inocente" (*innocent bystander suppression*) (Miller *et al.*, 1991).

Em investigações sobre esse fenômeno, Carvalho e cols., em 1994, demonstraram que a imunização parenteral com o antígeno tolerado (Ova) inibiu respostas imunes a outro antígeno (DNP-KLH) injetado concomitantemente, fenômeno então denominado "efeito indireto" da tolerância oral. Em animais tolerantes a Ova, a imunização apenas com DNP-KLH em adjuvante levou a uma alta produção de anticorpos anti-DNP. Essa produção de anticorpos foi, entretanto, diminuída quando o mesmo DNP-KLH foi injetado juntamente com Ova, ou seja, houve supressão de respostas imunes não relacionadas, caracterizando os "efeitos indiretos" da exposição ao antígeno tolerado (Carvalho *et al.*, 1994).

Mesmo quando o antígeno tolerado e o não tolerado foram injetados por vias diferentes (por exemplo, s.c. e i.p.), esse fenômeno foi observado. A inibição da resposta ao antígeno não relacionado em animais tolerantes não ocorreu, entretanto, quando a re-exposição ao antígeno tolerado foi feita pelas vias digestiva e intravenosa (Carvalho *et al.*, 1994).

Os efeitos indiretos puderam também ocorrer mesmo se os dois antígenos não fossem injetados ao mesmo tempo: a inibição da resposta ao antígeno não tolerado foi conseguida quando o antígeno tolerado (Ova) foi injetado até 72h antes. Entretanto, não ocorreram efeitos indiretos quando o antígeno tolerado foi aplicado após o antígeno não tolerado. Ainda, em camundongos tolerantes orais a Ova, a injeção concomitante de DNP-Ova e DNP-KLH na imunização primária foi capaz de bloquear a resposta a DNP-KLH nas imunizações subseqüentes, na ausência de outras exposições a DNP-Ova (Carvalho *et al.*, 1994).

Os efeitos indiretos se mostraram capazes de inibir também reações inflamatórias crônicas, do tipo granulomatosas, provocadas por ovos de *Schistosoma mansoni*. Em animais tolerantes orais a Ova, a injeção i.p. de DNP-Ova concomitante à injeção i.v. de 2000 ovos do parasita resultou em diminuição do título de anticorpos anti-SEA e do tamanho dos granulomas hepáticos (Carvalho *et al.*, 2002). É possível que os efeitos indiretos tenham causado uma modificação no padrão de migração das células inflamatórias (Azevedo-Júnior, 2004; Carvalho *et al.*, 2002). Em outro modelo de inflamação, peritonite induzida pela injeção i.p. de Ova estéril em animais previamente sensibilizados, mostrou-se que em animais tolerantes a Ova a peritonite foi mais branda que em animais não tolerantes (Rodrigues *et al.*, 2006). A contagem de leucócitos periféricos, principalmente neutrófilos e eosinófilos, também se mostrou diminuída, assim como a produção dos eosinófilos na medula óssea. Os efeitos indiretos da tolerância oral alteraram, nesse caso, tanto a mobilização leucocitária quanto a eosinopoiese (Rodrigues *et al.*, 2006). Ramos e colaboradores mostraram que os efeitos indiretos reduziram a peritonite induzida por uma proteína não tolerada, havendo também nesse caso redução do infiltrado inflamatório e da eosinopoiese medular. Além disso, a injeção i.p. de Ova em camundongos tolerantes orais a Ova diminuiu a inflamação induzida por carragenina injetada no coxim plantar (Ramos, *in press*). Esses resultados nos levam a crer que a aplicação terapêutica da tolerância oral e dos seus efeitos indiretos seja possível também em outros tipos de desordens imunológicas.

Os mecanismos dos efeitos indiretos da tolerância oral estão ainda sendo estudados. Weiner e colaboradores sugerem a hipótese da "supressão do espectador inocente" (*innocent bystander suppression*), segundo a qual o ambiente supressor (IL-4, IL-10, TGF- β) gerado pela presença do antígeno tolerado resultaria na supressão de respostas não relacionadas que estivessem ocorrendo simultaneamente (Miller *et al.*, 1991). Entretanto, evidências experimentais rejeitam fortemente essa hipótese quando mostram que a presença da proteína tolerada apenas na imunização secundária não foi capaz de inibir a produção de imunoglobulinas específicas

para o antígeno não tolerado. Dessa forma, é improvável que os efeitos indiretos dependam primariamente de um ambiente supressor rico em IL-4, IL-10 e TGF- β (Carvalho & Vaz, 1996; Carvalho *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 1997). Também não se trata de competição antigênica, já que os efeitos indiretos foram observados mesmo quando os antígenos foram injetados em locais distintos, e não ocorreram em animais não tolerantes a uma das proteínas (Carvalho & Vaz, 1990; Carvalho *et al.*, 1994).

1.3. Alteração da reação de enxerto-versus-hospedeiro pela injeção de uma proteína tolerada

Estudos previamente realizados pela nossa equipe de trabalho mostraram que a injeção da proteína tolerada concomitantemente à indução da GvH em camundongos aumentou a sobrevivência dos animais receptores (Vaz & Carvalho, 1994). Utilizando o modelo de transplante alogênico para camundongos irradiados, observou-se que a tolerância oral aumentou, além da sobrevivência, o ganho de peso de animais submetidos à GvH em relação aos controles doentes. Além disso, as manifestações clínicas da doença (aparência do pêlo e diarreia) também se mostraram melhores nos camundongos tolerantes. A quantificação dos linfócitos T e B esplênicos não evidenciou, entretanto, diferenças entre os grupos de animais com GvH, independentemente do tratamento dispensado a cada grupo (da Silva, 2000).

O principal objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos amenizadores da injeção de uma proteína tolerada sobre a GvHR por análise das alterações histopatológicas. Para evitar interferências dos regimes de condicionamento (químico e radioterapia) na histologia, resolvemos eliminar a irradiação dos nossos experimentos. O modelo de transplante semi-alogênico de parental para F1 descrito por Simonsen é adequado a esse nosso propósito (Simonsen, 1957).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Verificar se os efeitos indiretos da tolerância oral, desencadeados pela injeção parenteral de uma proteína tolerada, promovem melhoria em alterações patológicas decorrentes da reação de enxerto-*versus*-hospedeiro (GvHR) em camundongos.

2.2. *Objetivos específicos*

Em camundongos tolerantes orais a ovalbumina (Ova) e controles não tolerantes, imunizados (ou não) por via i.p. com Ova no dia da indução da GvHR:

- Acompanhar massa corpórea e mortalidade até 50 dias após a indução da GvHR, e verificar massa do baço desses animais ao final desse período.
- Observar histologicamente as alterações hepáticas da reação de GvH 14 e 50 dias após indução da doença;
- Observar histologicamente as alterações esplênicas da reação de GvH 14 e 50 dias após indução da doença;
- Observar histologicamente as alterações intestinais da reação de GvH 14 e 50 dias após indução da doença.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Camundongos*

Foram utilizados camundongos das linhagens B6D2F1 (C57BL/6 x DBA/2)F1 e C57BL/6, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (Cebio – ICB/UFMG), todos com mesmo sexo (machos) e com idade entre sete e nove semanas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFMG (CETEA/UFMG).

3.2. *Indução de tolerância oral a Ovalbumina (Ova)*

Camundongos receptores B6D2F1 e doadores C57BL/6 de células (ver protocolo experimental – Fig.1) receberam por via oral, durante quatro dias consecutivos, solução de clara de ovo em água na proporção 1:5. Após esse período, a solução foi substituída por água pura, permanecendo assim durante todo o experimento. Camundongos dos grupos controle não tolerantes a Ova receberam água durante todo o experimento.

A fim de verificar o estabelecimento da tolerância oral pelo tratamento acima descrito, animais tolerizados foram imunizados com 10µg de Ova adsorvidos em 1,6mg de Al(OH)₃ sete dias após o tratamento oral. Quatorze dias após a imunização primária, realizou-se uma secundária com Ova solúvel. Sete dias após a secundária, os camundongos foram sangrados pelo plexo axilar na ausência de anticoagulante e o soro foi coletado. A dosagem de imunoglobulinas séricas anti-Ova foi realizada por ELISA.

3.3. Indução da GvHR

Camundongos doadores de células (C57BL/6) foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida foram coletados os linfonodos inguinais e baço. Estes órgãos foram colocados em meio HBSS gelado e macerados para a obtenção de uma suspensão de células. De cada um dos diferentes grupos de doadores (n=7-8) obteve-se um "pool" de células. Após a lavagem da suspensão celular em meio HBSS gelado foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer. Foram transferidas $1,0 \times 10^8$ células de baço e linfonodos inguinais por via intravenosa (i.v.) para camundongos B6D2F1.

3.4. Injeção i.p. do antígeno tolerado para desencadear os efeitos indiretos

Camundongos receptores B6D2F1 foram imunizados por via intraperitoneal (i.p.) com solução de 10 μ g de Ovalbumina (grau V, Sigma) e 1,6mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] minutos antes de receberem a transfusão i.v. de células linfóides dos doadores C57BL/6.

GRUPO	Doador	Receptor	Imunização i.p.
NORMAL		B6D2F1 (normal)	não
GvHR	C57BL/6 (normal)	B6D2F1 (normal)	não
GvHR+EI	C57BL/6 (tolerante)	B6D2F1 (tolerante)	10 μ g Ova+1,6mg Al(OH) ₃
GvHR+IM	C57BL/6 (normal)	B6D2F1 (normal)	10 μ g Ova+1,6mg Al(OH) ₃

Figura 1. Protocolo experimental.

3.5. Contagem de leucócitos no sangue periférico

A fim de observarmos o efeito da tolerância oral na leucopenia decorrente da GvHR, realizou-se a indução da doença e tolerização dos camundongos conforme descrito nos itens acima. Nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 14 pós-transplante, os animais foram submetidos a sangrias pela veia da cauda. Em cada uma das sangrias, o volume de sangue de cada camundongo foi coletado em 5 μ L de anticoagulante EDTA. Para a contagem do número global de leucócitos, uma alíquota de 10 μ L de sangue foi misturada a 90 μ L de solução de Turk, a fim de lisar as hemácias. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e calculou-se, a partir daí, o número de leucócitos por mm³ de sangue periférico.

3.6. Avaliação da massa corpórea dos animais

Camundongos receptores B6D2F1 foram pesados em balança digital no dia da transfusão e em dias subsequentes após a transfusão de células. Os resultados foram expressos em gramas.

3.7. Processamento e análise histológica

Passados 14 ou 50 dias da transferência de células de baço e linfonodos dos parentais para os indivíduos F1, os camundongos receptores foram sacrificados por deslocamento cervical. Baço, fígado e intestino delgado proximal foram retirados e fixados por imersão, durante 24h, em solução tampão de aldeído fórmico neutro ou em formalina de Carson em tampão Millonig. A massa do baço foi avaliada antes desse procedimento. Dividindo-se a massa do baço pela massa corpórea e multiplicando esse valor por cem obteve-se o índice esplênico. Após a

fixação, a solução tampão foi substituída por solução de álcool etílico a 70% e deixada até o dia da inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram obtidos com a utilização de micrótomo (Microm), sendo posteriormente corados com hematoxilina-eosina ou alcian blue. Os cortes histológicos foram analisados ao microscópio óptico (Fotomicroscópio Olympus BX60). A aquisição de imagens histológicas foi realizada com o auxílio de microscópios ópticos acoplados a câmeras digitais (microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado a câmera digital; fotomicroscópio Olympus BX60 acoplado à câmera Olympus QCapture3). As imagens digitais foram processadas com a utilização do software Photoshop (Adobe Systems).

3.7.1. Técnicas histológicas

3.7.1.1. Inclusão em parafina

Desidratação	Diafanização	Infiltração
álcool 70%.....	xilol I..... 20min	parafina I..... 30min
álcool 80%..... 30min	xilol II..... 20min	parafina II..... 30min
álcool absoluto I..... 30min	xilol III..... 20min	
álcool absoluto II..... 30min		
álcool absoluto III..... 30min		

3.7.1.2. Hematoxilina e Eosina

Desparafinização	Hidratação	Coloração	Desidratação e diafanização
xilol I..... 30min	álcool absoluto I..... 3min	lavagem (água corrente).... 10min	álcool 70%..... 1 a 2min
xilol II.....30min	álcool absoluto II..... 3min	hematoxilina..... 1min30s	álcool 80%..... 1 a 2min
xilol III.....30min	álcool 90%..... 2min	lavagem (água corrente)10min	álcool 90%..... 2min
	álcool 80%..... 2min	eosina..... 30s	álcool absoluto I..... 3min
	álcool 70%..... 2min	lavagem rápida em água	álcool absoluto II..... 3min
			xilol I..... 2min
			xilol II..... 2min
			xilol III..... 10min

Obs.: a montagem das lâminas foi realizada com Bálsamo do Canadá.

3.7.1.3. Alcian Blue

Desparafinização	Hidratação	Coloração	Desidratação e diafanização
xilol I..... 30min	álcool absoluto I..... 3min	lavagem (água corrente)..... 10min	álcool 70%..... 1 a 2min
xilol II.....30min	álcool absoluto II..... 3min	Alcian blue pH 2,5..... 45min	álcool 80%..... 1 a 2min
xilol III.....30min	álcool 90%..... 2min	lavagem rápida em água	álcool 90%..... 2min
	álcool 80%..... 2min	hematoxilina..... 2min	álcool absoluto I..... 3min
	álcool 70%..... 2min	lavagem (água corrente)..... 10min	álcool absoluto II..... 3min
			xilol I..... 2min
			xilol II..... 2min
			xilol III..... 10min

3.8. Quantificação de imunoglobulinas séricas por ELISA

Imunoglobulinas (Igs) totais anti-Ova foram avaliadas por ensaio imunoenzimático padrão (ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Resumidamente, placas de poliestireno de fundo chato com 96 poços (Nunc) foram incubadas *overnight* a 4°C com solução de Ova (2µg/poço) em tampão carbonato pH 9,6. Após 18h, as placas foram lavadas três vezes com solução fisiológica contendo 0,05% Tween-20 (salina-Tween) e bloqueadas com 200 µL/poço de uma solução de caseína a 0,25% em PBS (PBS-caseína) por uma hora a temperatura ambiente. A solução de PBS-caseína foi desprezada, as placas foram lavadas três vezes com salina-Tween e incubadas com diluições sucessivas das amostras de soro em PBS-caseína entre 1:100 e 1:12800 por uma hora a 37°C. As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas por uma hora com 100 µL/poço de soro poli-específico de cabra anti-Igs totais de camundongo conjugadas à peroxidase (Southern Biotechnology Associates) diluído 1:30000 em PBS-caseína. As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas com 100µL/poço de uma solução de ortofenileno-diamino (OPD) a 0,4 mg/mL em tampão citrato pH

5,0 contendo 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ H_2O_2 30 volumes ao abrigo da luz por 20 min. A reação foi interrompida pela adição de 20 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de H_2SO_4 2N e as absorbâncias foram determinadas a 492 nm em um leitor automático (BioRad Model 450 Microplate Reader). Além das amostras experimentais, foi utilizada uma amostra de soro padrão positivo em oito diluições seriadas (1:100 a 1:12800). Os valores de absorbância do soro positivo foram utilizados para controlar a sensibilidade do teste. O resultado foi expresso como curva de titulação.

3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism 4. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e foi aplicado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando-se também o teste de Mann-Whitney. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos e os resultados foram expressos como a média \pm SEM.

3.10. Soluções utilizadas

Alcian Blue (pH 2,5): 0,0075M Alcian Blue; 2,91% CH_3COOH

Eosina: 0,0145M Eosina; 0,017M $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 0,015% $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$; 10% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; 4 gotas CH_3COOH

Formalina de Carson em tampão Millonig (pH 7,2-7,4): 4% HCHO ; 0,155M NaH_2PO_4 ; 0,105M NaOH

HBSS (pH 7,4): 5,4mM KCl; 0,3mM Na₂HPO₄; 0,4mM KH₂PO₄; 4,2mM NaHCO₃; 1,3mM CaCl₂; 0,5mM MgCl₂; 0,6mM MgSO₄; 137mM NaCl; 5,6mM D-glicose

Hematoxilina de Harris: 0,015M Hematoxilina; 7,85% C₂H₅OH; 0,07M KAl(SO₄)₂; 0,0126M HgO; 0,36% CH₃COOH

PBS (pH 7,2): 0,137M NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na₂PO₄; 1,5mM KH₂PO₄

PBS-caseína: PBS pH 7,2 + 0,25% caseína

Salina Tween: solução fisiológica contendo 0,05% de Tween 20

Solução fisiológica: 0,145M NaCl

Solução tampão de aldeído fórmico neutro: 4% HCHO; 0,029M NaH₂PO₄.H₂O; 0,046M Na₂HPO₄

Solução de Turk: 2,91% CH₃COOH; 0,039% C₂₅H₃ClN₃

Tampão carbonato (pH 9,6): 0,0175M Na₂CO₃; 0,0349M NaHCO₃

Tampão citrato (pH 5,0): 0,2M NaH₂PO₄; 0,1M ácido cítrico

4. RESULTADOS

4.1. O tratamento oral resultou em menores níveis séricos de imunoglobulinas específicas

Para confirmarmos que o protocolo de tratamento oral utilizado resulta em tolerância oral, um grupo de camundongos recebeu uma solução de clara de ovo 1:5 em água filtrada *ad libitum*, como única fonte de líquido, durante quatro dias consecutivos. Cada animal consome, em média, 5 mL da solução de clara de ovo por dia, e vários trabalhos anteriores ao nosso já mostraram que isto resulta em níveis significativos de tolerância. Os bebedouros contendo a solução foram trocados diariamente a fim de evitar contaminação da solução de clara de ovo. Um grupo de camundongos controle recebeu água filtrada *ad libitum*. Sete dias após o tratamento oral, todos os animais foram imunizados por via i.p. com 0,2 mL de solução contendo 10 µg de Ova adsorvidos em 1,6 mg de hidróxido de alumínio, Al(OH)₃. Quatorze dias após a primária, os animais de ambos os grupos receberam uma imunização secundária por via i.p. com 0,2 mL de solução contendo 10 µg de Ova. Sete dias após a secundária, os camundongos foram sacrificados e amostras de soro para determinação dos níveis de imunoglobulinas séricas anti-Ova foram obtidas.

A inibição da produção de imunoglobulinas séricas específicas é um parâmetro comumente utilizado para demonstração da tolerância oral. Observamos redução nos níveis de imunoglobulinas séricas anti-Ova em camundongos previamente tratados por via oral com solução de clara de ovo 1:5 quando comparado com os que receberam apenas água filtrada por via oral, o que atesta indução de tolerância oral (Fig.2).

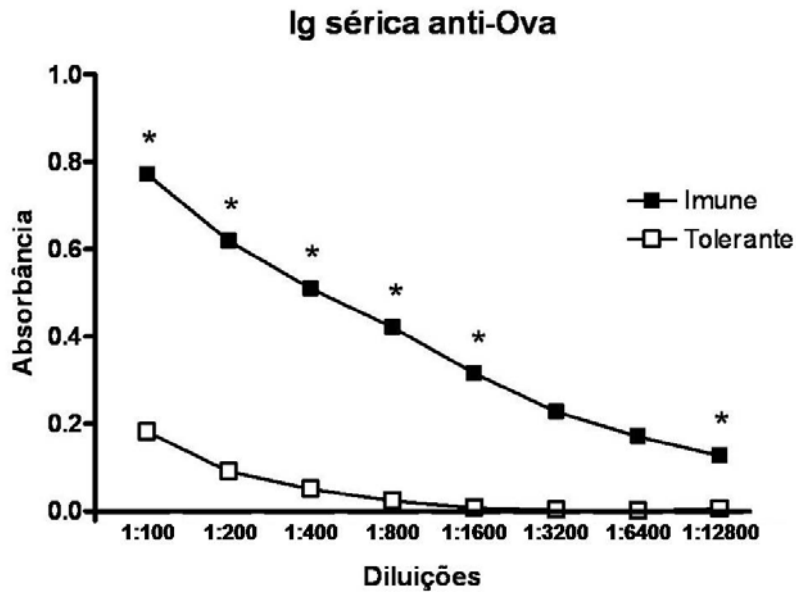


Figura 2. O pré-tratamento oral com Ova resultou em menores níveis séricos de imunoglobulinas anti-Ova. São mostrados os níveis de imunoglobulinas séricas anti-Ova (Ig total). *Quadrado sólido*: camundongos imunizados por via i.p. com Ova sem pré-tratamento oral; *quadrado aberto*: camundongos previamente tratados com solução de clara de ovo 1:5 por via oral e imunizados de acordo com o mesmo protocolo utilizado para os animais do grupo *Imune*. Os níveis séricos de Ig total anti-Ova foram determinados por ELISA. Os resultados são apresentados como curvas das médias das absorbâncias a 492 nm, nas diluições decrescentes. (Imune, n=5; Tolerante, n=5) * $p < 0,05$ em relação ao grupo *Imune*.

4.2. A tolerância oral interferiu na sobrevivência dos animais submetidos à reação de GvH

Em nosso modelo experimental avaliamos os efeitos da tolerância oral na reação inflamatória sistêmica desencadeada pela reação de enxerto-*versus*-hospedeiro (GvHR). Para indução de tolerância, camundongos doadores e receptores do grupo *GvHR+Efeito Indireto (GvHR+E)* foram tratados com Ova por via oral, como descrito em Materiais e métodos. Animais controles beberam apenas água durante esse mesmo período. Com exceção do grupo controle normal, todos os grupos receberam infusão intravenosa de 0,2 mL de suspensão celular

contendo $1,0 \times 10^8$ leucócitos de doadores parentais C57BL/6. Minutos antes da transferência de células, camundongos receptores foram imunizados por via i.p. com $10 \mu\text{g}$ de Ova adsorvidos em $1,6 \text{mg}$ de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Um grupo controle da reação de GvH (grupo *GvHR*) não recebeu imunização. Os animais foram observados pelo período de cinquenta dias após indução de GvHR, tendo sua massa corpórea avaliada durante esse tempo.

Nossos resultados mostraram que existe um aparente aumento da sobrevivência dos camundongos tolerantes em relação aos grupos *GvHR* e *GvHR+IM* (Fig.3). No entanto, a aplicação do Log Rank Test para análise de sobrevivência não mostrou diferença significativa entre os grupos. Outros experimentos realizados a fim de confirmar os dados de sobrevivência falharam em induzir uma mortalidade significativa nos camundongos com GvHR.

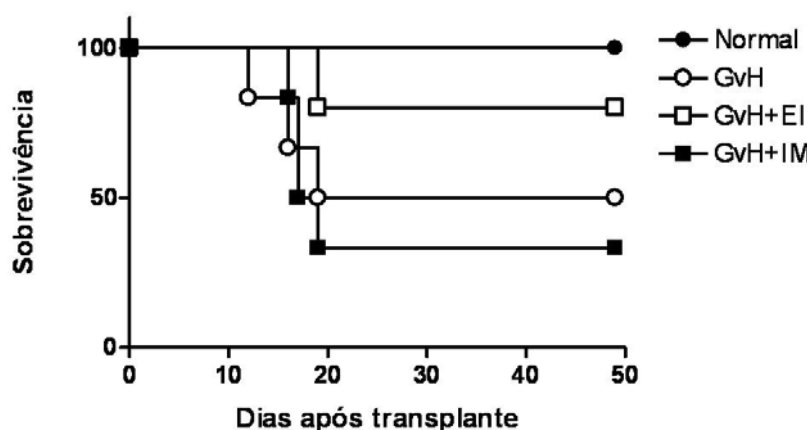


Figura 3. Efeito da injeção de uma proteína tolerada na sobrevivência dos animais submetidos à reação de GvH. O gráfico mostra a sobrevivência dos animais após indução de GvHR e de controles normais (*Normal*, $n=6$). Camundongos receptores F1 receberam por via i.v. 1×10^8 células de parentais C57BL/6 (*GvHR*, $n=6$). Camundongos do grupo *GvHR+EI* receberam tratamento prévio com solução de clara de ovo, sendo imunizados pela via i.p. com Ova em $\text{Al}(\text{OH})_3$ no dia da transferência de células (*GvHR+EI*, $n=5$). Os animais do grupo *GvHR+IM* não receberam tratamento oral mas foram também imunizados (*GvHR+IM*, $n=6$).

4.3. A injeção i.p. de um antígeno tolerado não alterou a perda de massa corpórea e o índice esplênico de camundongos com GvHR

A reação de GvH desencadeia, entre outras alterações descritas, perda de massa corpórea. Em nossos experimentos, não foi observada diferença entre os grupos com GvHR de zero a 50 dias após a indução da doença, independente de terem recebido ou não a injeção i.p. do antígeno tolerado, ou seja, animais dos grupos *GvHR*, *GvHR+EI* e *GvHR+IM* mostraram, igualmente, perda de massa (Fig.4). Essa perda de massa foi mais acentuada por volta do décimo quarto dia após o transplante. Os animais que sobreviveram até o final do experimento apresentaram recuperação da massa corpórea.

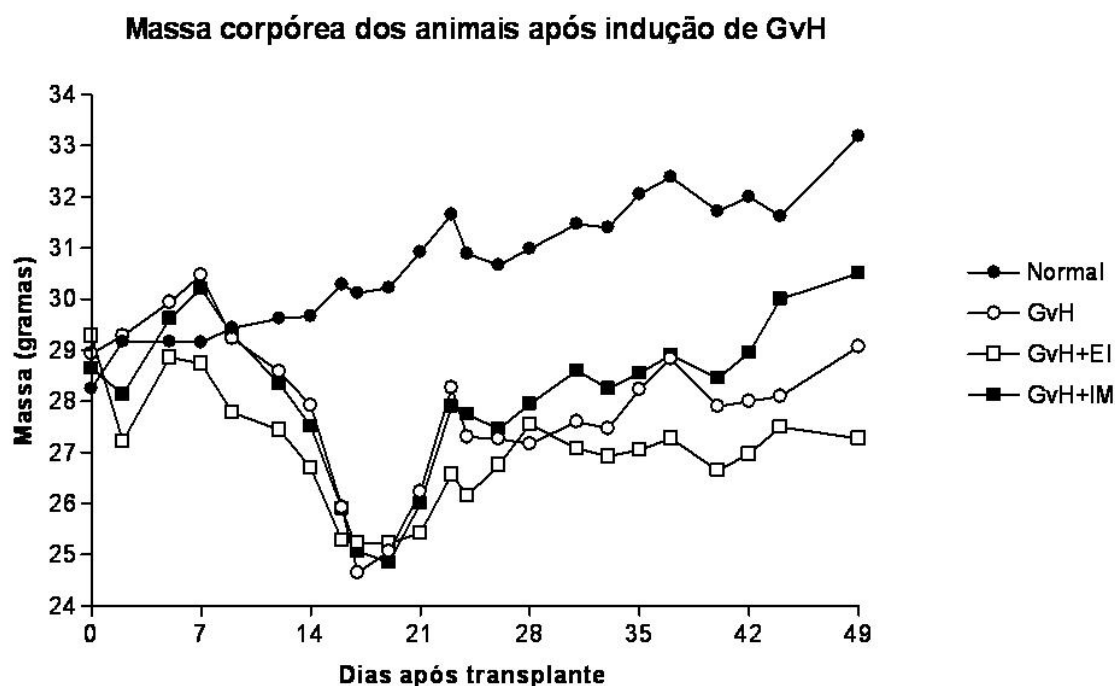


Figura 4. A tolerância oral não alterou a perda de massa corpórea. O gráfico mostra as médias das massas corpóreas dos animais de cada grupo, em cada um dos dias mostrados no eixo X. Cada linha representa um grupo, conforme a legenda. Os protocolos de tolerização e de indução da GvHR são os mesmos descritos nas figuras 2 e 3. No dia zero: *Normal*, n=6; *GvHR*, n=6; *GvHR+EI*, n=5; *GvHR+IM*, n=6. A partir do dia 21: *Normal*, n=6; *GvHR*, n=3; *GvHR+EI*, n=4; *GvHR+IM*, n=2.

Em um segundo experimento, realizado de acordo com o mesmo protocolo utilizado até então, os camundongos com GvHR não apresentaram mortalidade. Quando observamos o gráfico de massa corpórea desses animais, foi visível a menor intensidade da perda de massa (Fig.5). Apesar disso, novamente foi constatada perda de massa independentemente do tratamento. A massa dos camundongos foi menor por volta do décimo quarto dia após transplante. A partir daí esses animais apresentaram recuperação da massa corporal, ficando, entretanto, abaixo do padrão normal.

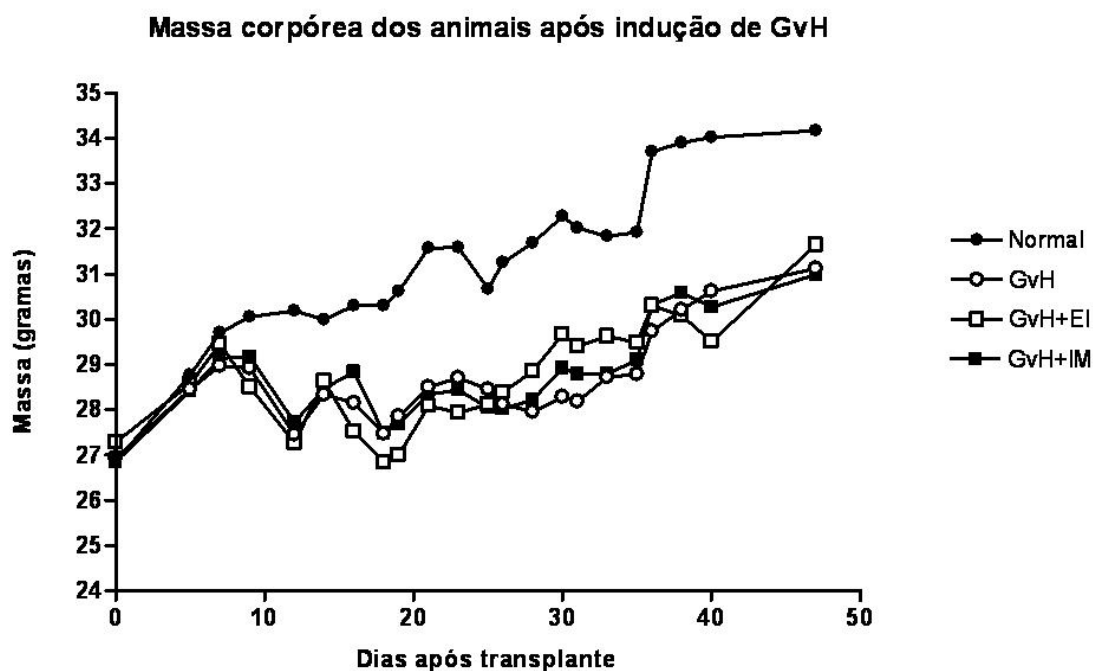


Figura 5. A tolerância oral não alterou a perda de massa corpórea. O gráfico mostra as médias das massas corpóreas dos animais de cada grupo, em cada um dos dias mostrados no eixo X. Cada linha representa um grupo, conforme a legenda. Os protocolos de tolerização e de indução de GvHR são os mesmos descritos nas figuras 2 e 3; n=6 para todos os grupos.

Outro parâmetro avaliado foi a massa do baço, a qual mostra-se normalmente aumentada na reação de GvH. Experimentos nos quais foi induzida GvHR em camundongos

mostraram que esses animais apresentaram aumento na massa do baço. Camundongos com GvHR, independentemente do tratamento, apresentaram maior índice esplênico que os controles normais (Fig.6).

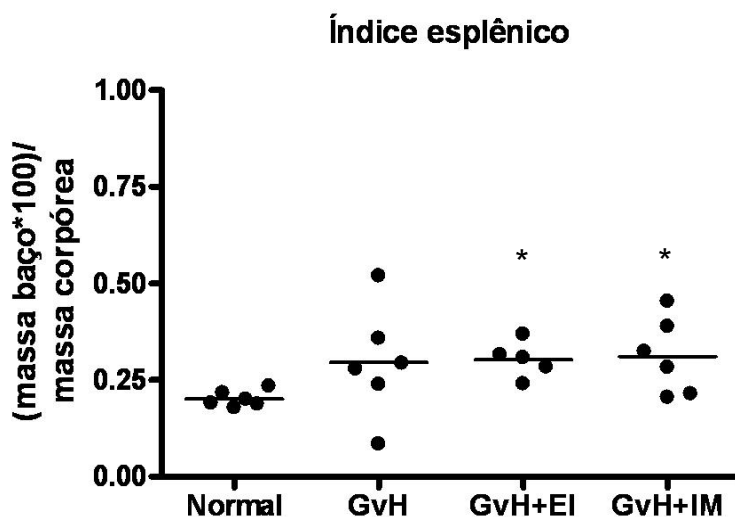


Figura 6. A tolerância oral não alterou o índice esplênico dos camundongos com GvHR. Índice esplênico de camundongos B6D2F1 50 dias após a indução de GvHR. Os protocolos de indução de GvHR e imunização são os mesmos descritos nas figuras 2 e 3. O gráfico mostra dados de um experimento no qual não foi observada mortalidade dos animais doentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *Normal*, para índice esplênico, pelo teste de Mann-Whitney.

Resultados um pouco diferentes foram obtidos em um segundo experimento, realizado de acordo com o mesmo protocolo do experimento anterior. Nele, os camundongos apresentaram elevada mortalidade, principalmente nos grupos de animais com GvHR e não tolerantes (*GvHR* e *GvHR+IM*) (Fig.3). A observação do índice esplênico dos camundongos que sobreviveram até 50 dias após a indução de GvHR não mostrou diferença em relação ao grupo *Normal* (Fig.7).

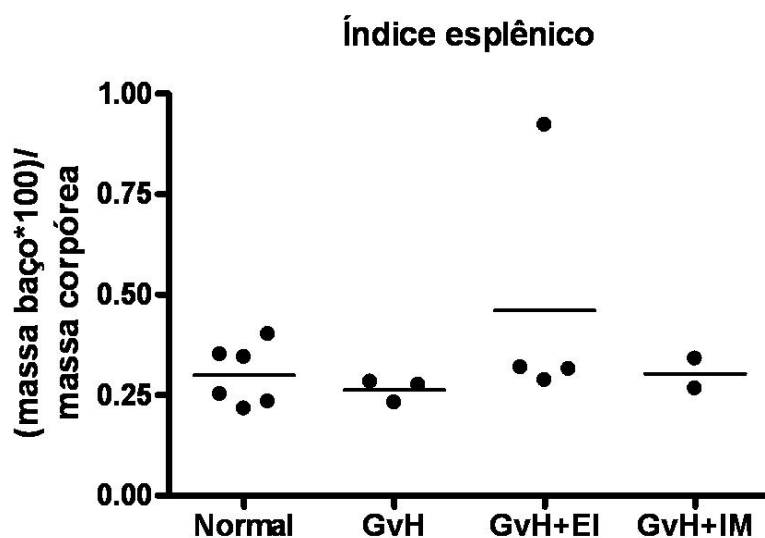


Figura 7. A tolerância oral não alterou o índice esplênico dos camundongos com GvHR. Índice esplênico de camundongos B6D2F1 50 dias após a indução de GvHR. Os protocolos de indução de GvHR e imunização são os mesmos descritos nas figuras 2 e 3. O gráfico mostra dados de um experimento no qual foi observada mortalidade dos animais doentes, principalmente nos grupos *GvHR* e *GvHR+IM*.

4.4. Alterações histopatológicas são diferentes no fígado dos animais que receberam a injeção do antígeno tolerado em relação aos animais dos outros grupos.

O período que se inicia quatorze dias após a indução da GvHR aguda é descrito como sendo marcado por intensa mortalidade e alterações sistêmicas como alopecia, postura encurvada, presença de sangue oculto nas fezes e prostração, além de intensa perda de peso. Alterações histopatológicas podem ser detectadas em diferentes órgãos. Investigamos se as alterações histopatológicas causadas pela GvHR, no período que antecede a mortalidade, seriam diferentes no grupo que recebeu a injeção do antígeno tolerado. Para tal, realizou-se a indução de GvHR e a tolerização dos animais, conforme protocolo anteriormente descrito em Materiais e métodos. No décimo quarto dia após a indução de GvHR, os camundongos foram

sacrificados e tiveram baço, fígado e intestino delgado proximal retirados para análise histopatológica.

O fígado normal apresenta lóbulos compostos por cordões de hepatócitos, entremeados por capilares sinusóides. No centro do lóbulo localiza-se a veia centro lobular, e na periferia localizam-se espaços porta, em número de três a seis por lóbulo. Em cada espaço porta encontram-se ramos da artéria hepática e da veia porta, além do ducto biliar, sendo todas essas estruturas envolvidas por tecido conjuntivo.

Em nossos experimentos, a GvHR hepática caracterizou-se por presença de infiltrado inflamatório no espaço porta que variou de moderado a intenso, e degeneração hepatocitária variando de discreta a acentuada. Foram ainda observados focos inflamatórios perisinusoidais em decorrência da doença (Fig.8B). Os camundongos B6D2F1 tolerantes a Ova que receberam transfusão de leucócitos de C57BL/6 também tolerantes a Ova, concomitante à imunização i.p. com a proteína tolerada (grupo *GvHR+E*), também apresentaram alterações histopatológicas no fígado. Essas foram, entretanto, mais brandas quando comparadas ao grupo controle *GvH*. Nesses animais tolerantes, o infiltrado inflamatório no espaço porta foi moderado, e foi observada discreta degeneração dos hepatócitos quando comparados ao *GvHR*. Ainda, observou-se que os focos inflamatórios perisinusoidais mostraram-se menos freqüentes nos camundongos tolerantes (Fig.8B). Animais B6D2F1 não tolerantes que receberam a transfusão celular de C57BL/6 concomitante à imunização i.p. com Ova em adjuvante (grupo *GvHR+IM*) também apresentaram uma redução das alterações histopatológicas no fígado em relação ao grupo controle *GvHR*. Nesses animais, a inflamação portal mostrou-se moderada, sendo, entretanto, um pouco mais intensa que nos tolerantes. Houve, nesses camundongos imunes, discreta degeneração dos hepatócitos, assim como nos tolerantes. Ainda, o infiltrado perisinusoidal estava reduzido em relação aos controles doentes, mas em geral estava um pouco aumentado em relação aos animais tolerantes (Fig.8D).

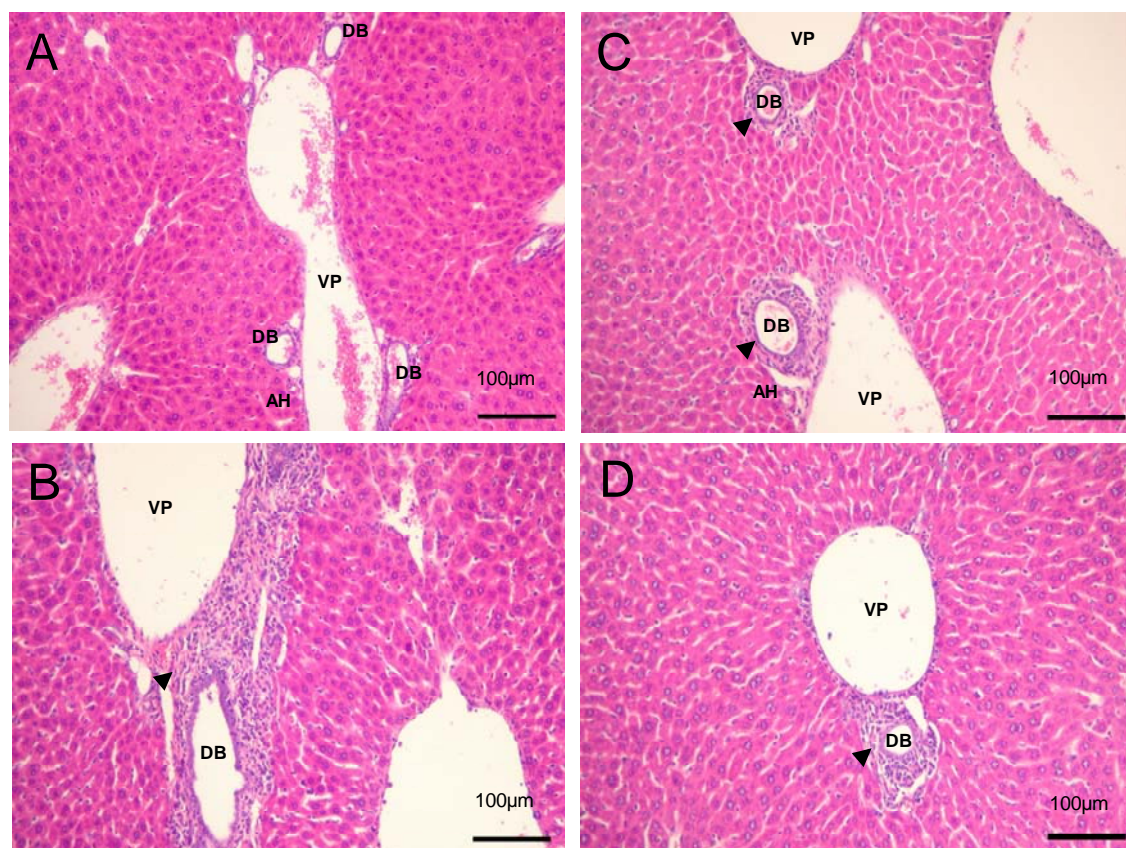


Figura 8. Os efeitos indiretos da tolerância oral amenizaram as alterações histopatológicas no fígado decorrentes da reação de GvH aguda. Alterações hepáticas decorrentes da reação de GvH, 14 dias após a indução dessa doença. Em A, controle normal (n=5). Em B, camundongos B6D2F1 que receberam por via i.v. 1×10^8 células de baço e linfonodo de parentais C57BL/6 (n=9). C e D, animais que receberam, concomitante à transfusão de células, imunização i.p. com $10 \mu\text{g}$ de Ova adsorvida em $1,6 \text{mg}$ de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (n=9 e n=9, respectivamente). Os camundongos retratados em C foram previamente tratados com solução de clara de ovo 1:5 por via oral. Nesse aumento é visível apenas a extensão do infiltrado inflamatório (cabeça de seta) no espaço porta. VP: ramo da veia porta; AH: ramo da artéria hepática; DB: ducto biliar. Coloração Hematoxilina e Eosina; barra=100 μm .

4.5. Alterações histopatológicas são diferentes no intestino dos animais que receberam a injeção do antígeno tolerado em relação aos animais dos outros grupos

A visualização do intestino delgado ao microscópio óptico revela a ocorrência de vilosidades revestidas por um epitélio simples, prismático, com borda estriada e células caliciformes. Abaixo da camada epitelial encontram-se células do tecido conjuntivo, camada essa

denominada lâmina própria. Abaixo da base das vilosidades é possível a visualização das glândulas intestinais, ou criptas, essas também revestidas por epitélio. As células epiteliais da região basal da cripta possuem intensa atividade mitótica, sendo responsáveis pela rápida renovação do epitélio intestinal. Calcula-se que, no homem, a substituição desse epitélio demore cerca de cinco dias. Abaixo das criptas pode-se observar a muscular da mucosa e uma camada de tecido conjuntivo frouxo contendo células e vasos sanguíneos, denominada submucosa. Externamente, encontram-se as camadas musculares lisas e a túnica adventícia.

Camundongos controles com GvHR (grupo *GvHR*) apresentaram, em relação ao grupo *Normal*, diminuição acentuada da razão entre os comprimentos da vilosidade e da cripta, aqui denominada proporção v:c (Fig.10). Apresentaram, ainda, redução moderada a acentuada do número de células caliciformes (Fig.11), aumento acentuado de linfócitos intraepiteliais, assim como aumento da celularidade da lâmina própria (Fig.9B). A injeção do antígeno tolerado nos receptores promoveu mudanças na histopatologia entérica. Nestes animais do grupo *GvHR+EI*, a proporção v:c apresentou-se reduzida em relação ao *Normal*, mas aumentada em relação ao *GvHR*. Observou-se também, quando comparado ao *Normal*, um aumento leve a moderado de linfócitos intraepiteliais, além de um leve aumento na celularidade da lâmina própria. Como se pode ver, os camundongos tolerantes apresentaram melhor estado histológico do que os animais controles doentes (Fig.9C). O grupo *GvHR+IM* apresentou resultados muito semelhantes aos do grupo *GvHR+EI*, com exceção do número de células caliciformes, que tendeu a ser maior ou igual aos animais normais (Fig.9D).

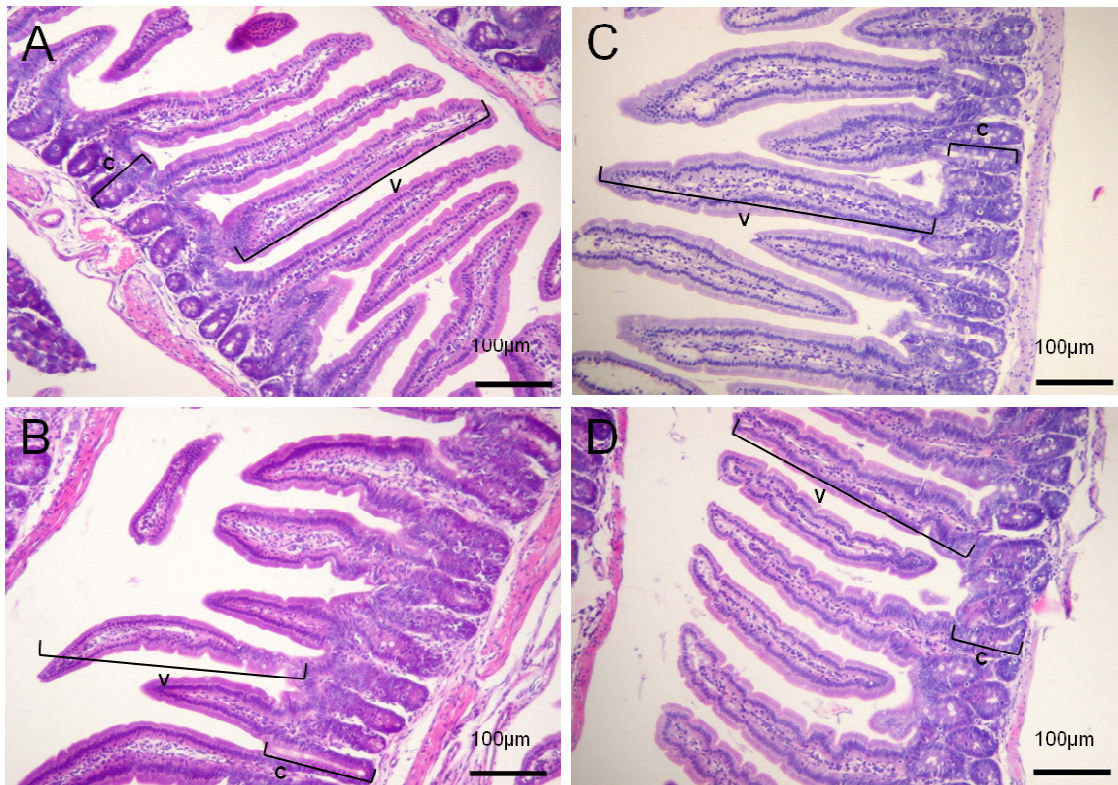


Figura 9. Os efeitos indiretos da tolerância oral amenizaram as alterações histopatológicas no intestino decorrentes da reação de GvH aguda. Alterações entéricas decorrentes da reação de GvH, 14 dias após a indução dessa doença. Em A, controle normal (n=5) no qual podemos ver as criptas (C) e vilosidades (V) intestinais. O mesmo está demonstrado nos grupos *GvHR* (n=9), *GvHR+EI* (n=9) e *GvHR+IM* (n=9), representados nas fotos B, C e D, respectivamente. Coloração Hematoxilina e Eosina; barra=100 µm.

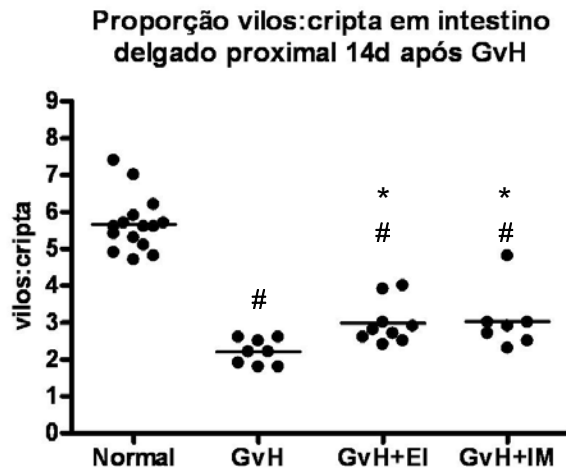


Figura 10. A reação de GvH aguda alterou a proporção vilosidade:cripta no intestino proximal. Quantificou-se o comprimento de vilosidades e criptas no intestino delgado de camundongos B6D2F1 dos quatro grupos experimentais, 14 dias após a indução de GvHR e controle normal. Os tratamentos recebidos por cada um dos grupos são os mesmos descritos na legenda das figuras 2 e 3. * $p < 0,01$ em relação ao *GvH* e # $p < 0,001$ em relação ao *Normal*, pelo teste Mann-Whitney.

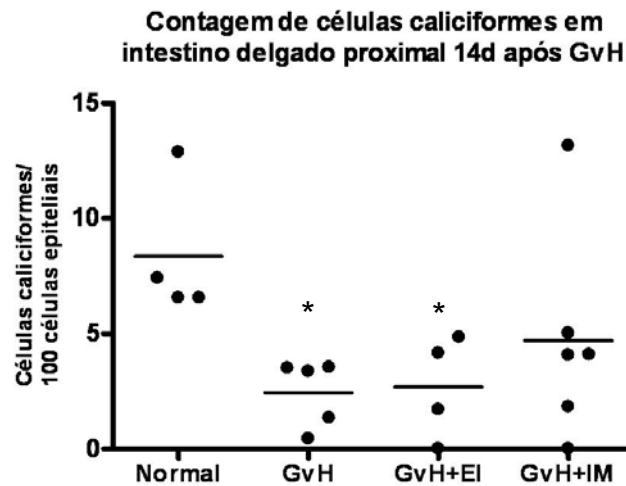


Figura 11. A porcentagem de células caliciformes no intestino delgado proximal encontrou-se diminuída em decorrência da reação de GvH aguda. Porcentagem de células caliciformes em intestino delgado proximal de camundongos B6D2F1, 14 dias após GvHR. Os tratamentos recebidos por cada um dos grupos são os mesmos descritos na legenda das figuras 2 e 3. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *Normal* pelo teste Mann-Whitney.

4.6. A reação de GvH promoveu redução de linfócitos na polpa branca

As alterações histopatológicas esplênicas decorrentes da GvHR foram também avaliadas nesse trabalho. A histologia normal do baço evidencia bainhas periarteriolas, denominadas polpa branca, compostas principalmente por linfócitos. Muitas vezes são visíveis, nos camundongos normais, centros germinativos na polpa branca, o que é indicativo de ativação celular. Circundando a polpa branca observa-se a polpa vermelha, que contém, além de leucócitos, hemácias, as quais conferem uma tonalidade avermelhada a essa porção do órgão (Fig. 12A). Megacariócitos são normalmente vistos no parênquima esplênico de camundongos.

A reação de GvH provocou, no baço, uma redução acentuada de linfócitos na polpa branca, junto com um aumento intenso da celularidade da polpa vermelha (Fig.12B). Animais tolerantes a Ova que receberam células de doadores também tolerantes apresentaram essa mesma depleção periarteriolar acentuada da polpa branca. A polpa vermelha desses animais apresentou-se, entretanto, menos celular quando comparada com o grupo controle doente (Fig.12C). Camundongos que receberam imunização concomitante à injeção i.v. de linfócitos de doadores normais apresentaram uma histopatologia muito semelhante ao grupo *GvHR*, apresentando depleção periarteriolar acentuada, e aumento intenso da celularidade da polpa vermelha (Fig.12D).

Em um segundo experimento realizado de acordo com esse mesmo protocolo, os três grupos de camundongos com GvHR (*GvHR*, *GvHR+EI* e *GvHR+IM*) apresentaram resultados muito semelhantes, quais sejam, redução acentuada da celularidade da bainha periarteriolar e aumento da celularidade da polpa vermelha (dados não mostrados).

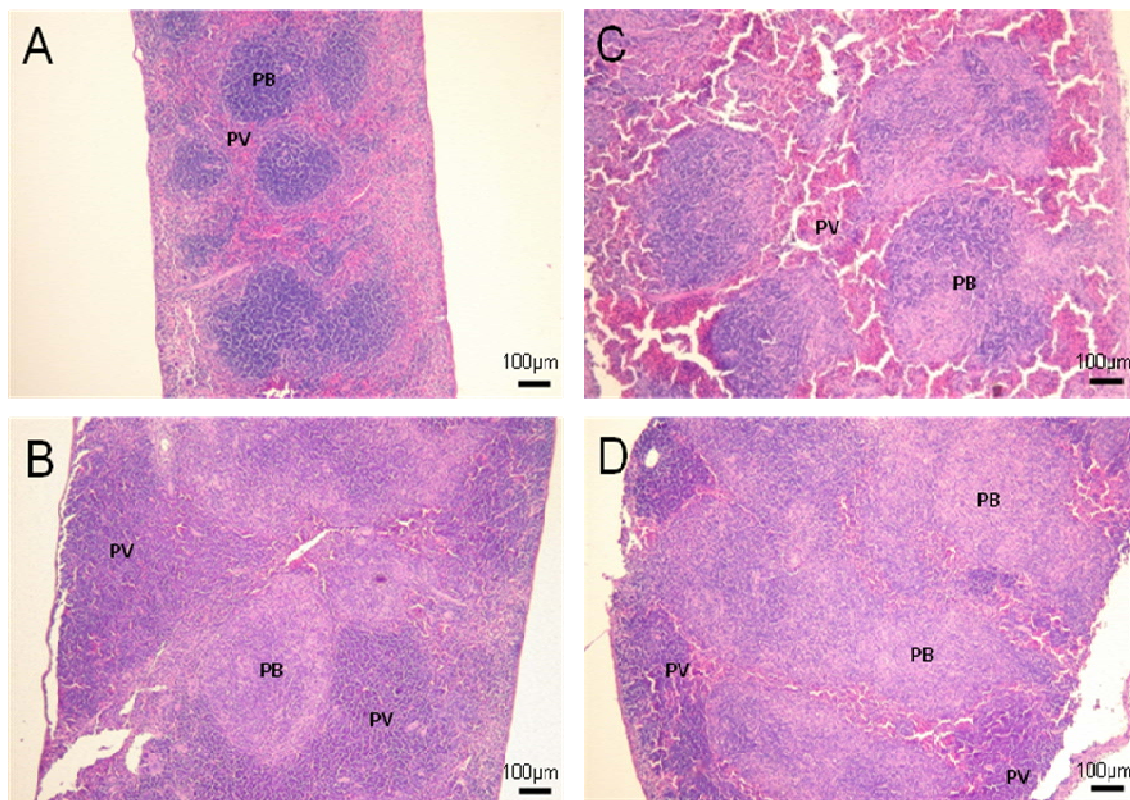


Figura 12. A reação de GvH promoveu redução de linfócitos na polpa branca. Alterações esplênicas decorrentes da reação de GvH, 14 dias após a indução dessa doença. Em A, controle normal (n=5). Em B, camundongos B6D2F1 que receberam por via i.v. 1×10^8 células de baço e linfonodo de parentais C57BL/6 (n=4). C e D, animais que receberam, concomitante à transfusão de células, imunização i.p. com 10µg de Ova adsorvida em 1,6mg de $Al(OH)_3$ (n=4 e n=3, respectivamente). Os camundongos retratados em C foram previamente tratados com solução de clara de ovo 1:5 por via oral. PB: polpa branca; PV: polpa vermelha. Coloração Hematoxilina e Eosina; barra=100µm.

4.7. Leucopenia grave é característica da reação de GvH

A contagem de leucócitos no sangue em diferentes dias após a indução da reação de GvH evidenciou a ocorrência de leucopenia. A contagem do dia zero, sangue colhido logo antes da indução de GvHR, constituiu nosso controle do número normal. Foi observada intensa queda no número de leucócitos circulantes logo nos primeiros dias após a transfusão de células nos camundongos receptores B6D2F1. Esse número alcançou o valor mais baixo no segundo dia

após transplante. Entre os dias 2 e 14 observou-se um aumento na contagem celular, sendo que o décimo quarto dia foi marcado, assim como o dia dois, por leucopenia severa. Esse perfil foi observado em todos os grupos de camundongos em que foi desencadeada a reação de GvH, e o tratamento oral no grupo *GvHR+EI* não alterou a leucopenia decorrente desta reação (Fig.12).

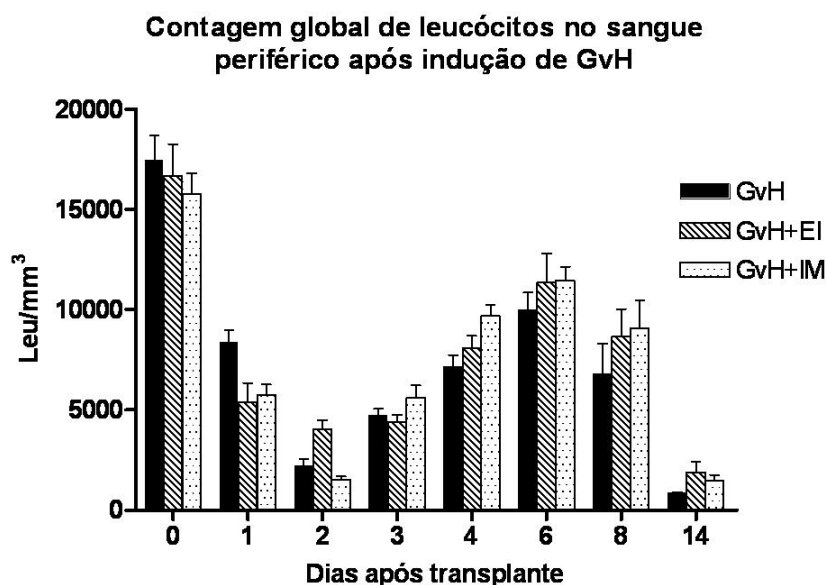


Figura 13. Leucopenia grave é característica da reação de GvH. Número absoluto de leucócitos no sangue periférico de camundongos receptores B6D2F1 de zero a 14 dias após indução de GvHR. A tolerização dos animais e indução da reação de GvH foram realizados como descrito na legenda das figuras 2 e 3. *GvHR*, n=5; *GvHR+EI*, n=5; *GvHR+IM*, n=6.

4.8. Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR

Tendo-se em vista os resultados de sobrevivência e massa corpórea de camundongos submetidos à GvHR, observa-se que os animais que não morreram se recuperaram da doença. Perguntamo-nos se esses animais sobreviventes apresentariam, ao final de 50 dias, alterações em decorrência da patologia que foi induzida. Análises histopatológicas de fígado, intestino delgado proximal e baço foram, então, realizadas.

Em todos os órgãos analisados foi possível observar alterações inflamatórias decorrentes da GvHR. Em geral, os camundongos submetidos aos efeitos indiretos da tolerância oral não apresentaram diferenças significativas quantificáveis em nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, muitas vezes o aspecto histológico nos animais desse grupo era melhor quando comparado aos demais grupos com a patologia (grupos *GvHR* e *GvHR+IM*).

O fígado dos camundongos dos grupos com GvHR apresentou um quadro de degeneração hepatocitária difusa de grau discreto a moderado, além de focos inflamatórios perisinusoidais em maior número que o observado no grupo *Normal*. A inflamação portal ainda estava presente, mas já se encontrou bem reduzida em relação à situação observada 14 dias após indução de GvHR, sendo aqui classificada como inflamação leve a moderada (Fig.14).

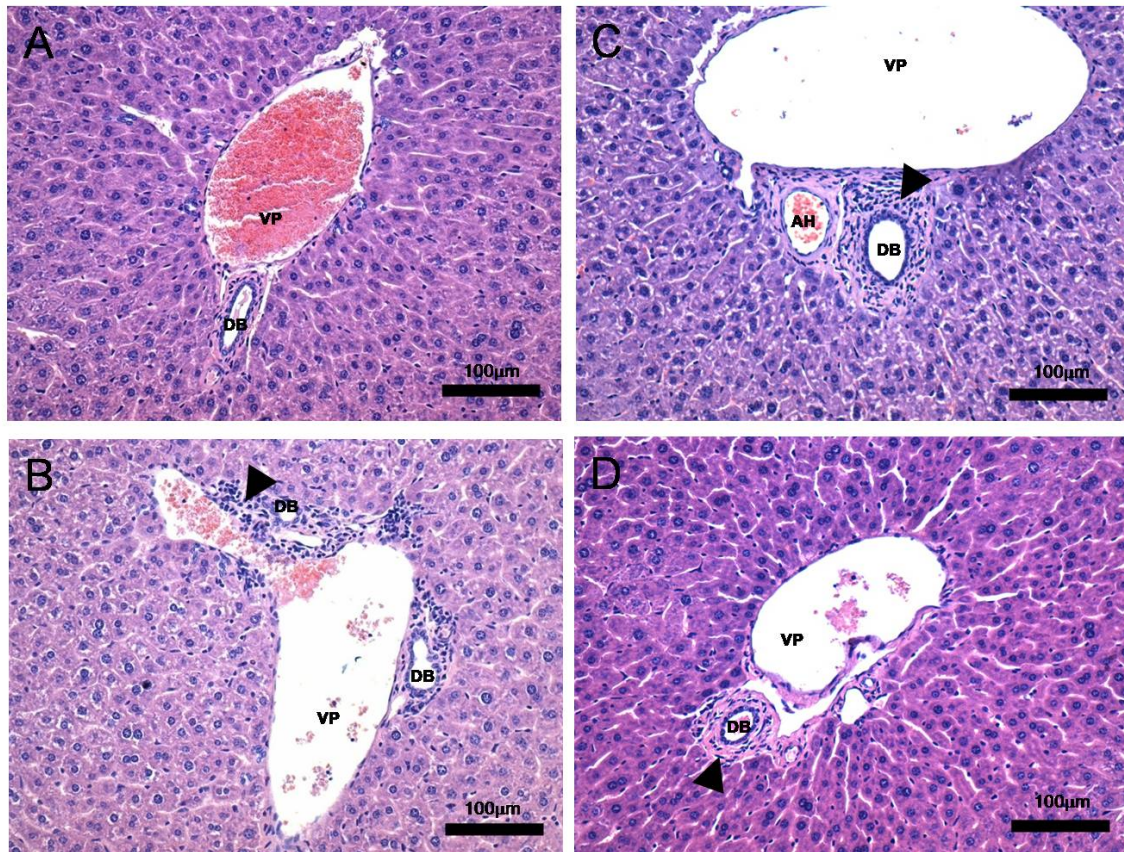


Figura 14. Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR. Alterações hepáticas decorrentes da reação de GvH, 50 dias após a indução dessa doença. Em A, controle normal. Em B, camundongos B6D2F1 que receberam por via i.v. 1×10^8 células de baço e linfonodo de parentais C57BL/6. C e D, animais que receberam, concomitante à transfusão de células, imunização i.p. com 10 μ g de Ova adsorvida em 1,6 mg de $Al(OH)_3$. Os camundongos retratados em C foram previamente tratados com solução de clara de ovo 1:5 por via oral. Nesse aumento é visível apenas a extensão do infiltrado inflamatório (cabeça de seta) no espaço porta. VP: ramo da veia porta; AH: ramo da artéria hepática; DB: ducto biliar; n=6 para todos os grupos. Coloração Hematoxilina e Eosina; barra=100 μ m.

Chamou a atenção o fígado dos controles normais de um segundo experimento realizado, os quais já mostraram eventos degenerativos discretos e difusos (Fig.15A). A situação histológica dos camundongos com GvHR desse experimento mostrou-se também um pouco mais grave que a representada pela Figura 14. Nesses grupos com GvHR, houve degeneração hepatocitária de grau moderado a acentuado, e inflamação moderada no espaço porta (Fig.15B, C, D). Foram ainda observados focos inflamatórios perisinusoidais como no outro experimento.

No grupo de camundongos tolerantes desse segundo experimento, 50% dos animais apresentaram um menor grau de degeneração hepatocitária em comparação com o grupo GvHR (Fig.15C).

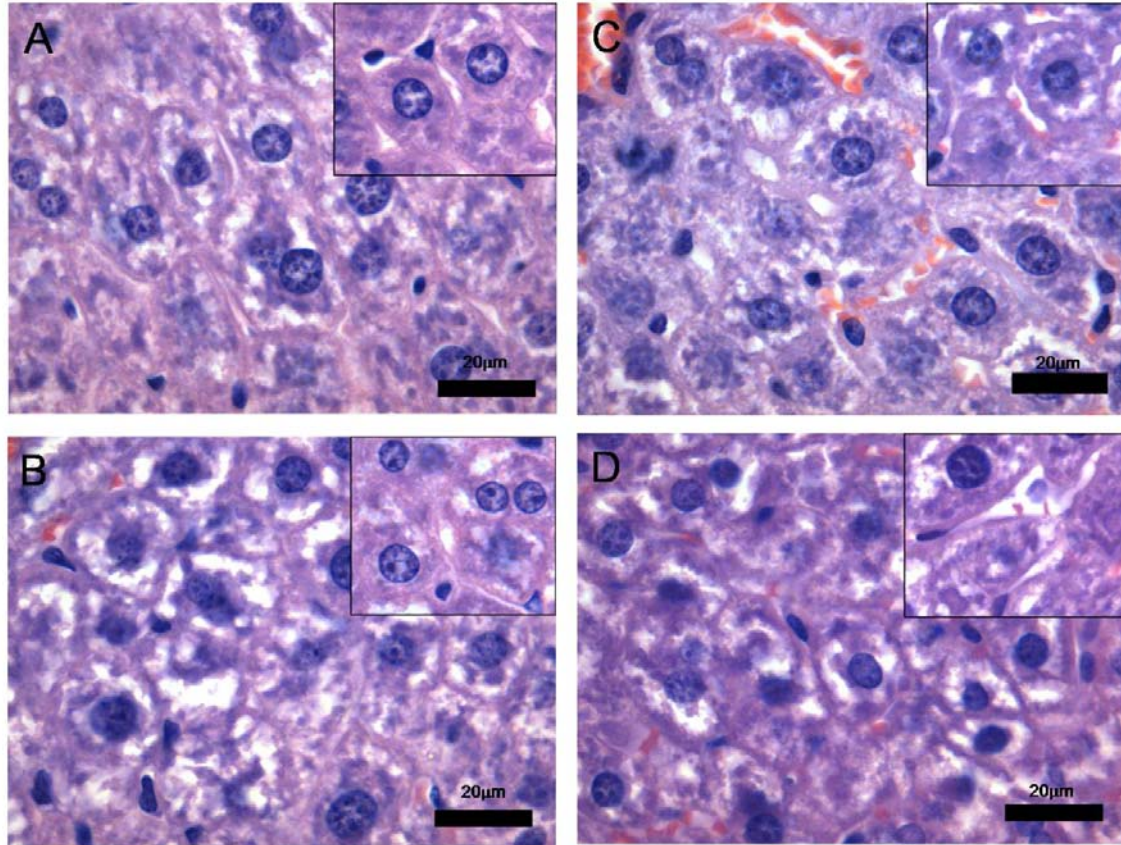


Figura 15. Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR. Alterações hepáticas decorrentes da reação de GvH, 50 dias após a indução dessa doença. Em A, controle normal (n=6). Em B, C e D, grupos *GvHR* (n=6), *GvHR+EI* (n=5) e *GvHR+IM* (n=6), respectivamente. As fotos maiores representam controles normais e animais sobreviventes de um experimento no qual se observou elevada letalidade da GvHR, evidenciando eventos degenerativos mais graves. As fotos dos inserts mostram a histologia hepática de um experimento no qual não se observou letalidade significativa da GvHR, evidenciando um quadro degenerativo menos grave. Coloração Hematoxilina e Eosina; barra=20 µm.

Nas análises de intestino delgado proximal foram observadas as mesmas alterações histológicas descritas nos animais 14 dias após a indução da GvHR, quais sejam, diminuição da proporção v:c (Fig.16), aumento da celularidade da lâmina própria, edema, aparente aumento do

número de mitoses na cripta e do número de linfócitos intraepiteliais. Entretanto, passados 50 dias da indução da doença, essas alterações se mostraram mais suaves (Fig. 17). Os camundongos tolerantes mostraram uma melhor aparência histológica no intestino, apresentando vilosidades menos tortuosas, menos espaçadas e de tamanho mais homogêneo que nos demais grupos experimentais. Entretanto, esses aspectos não são, em sua maioria, passíveis de quantificação.

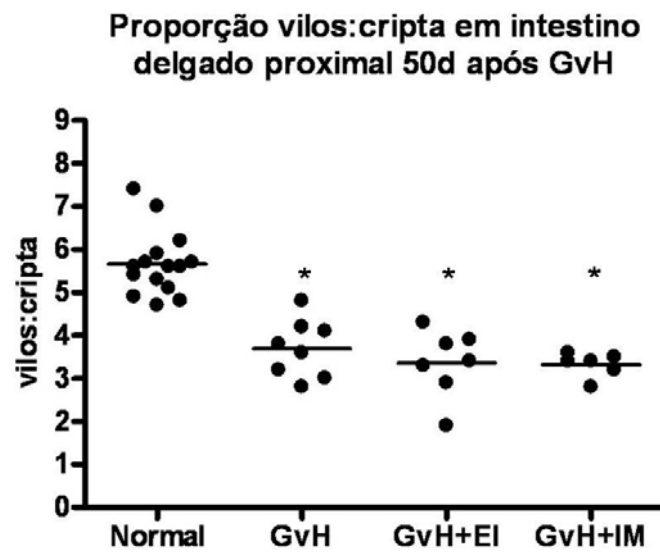


Figura 16. Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR. Quantificou-se o comprimento de vilosidades e criptas no intestino delgado de camundongos B6D2F1 dos quatro grupos experimentais, 50 dias após a indução de GvHR e controle normal. Os tratamentos recebidos por cada um dos grupos são os mesmos descritos na legenda das figuras 2 e 3. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *Normal*.

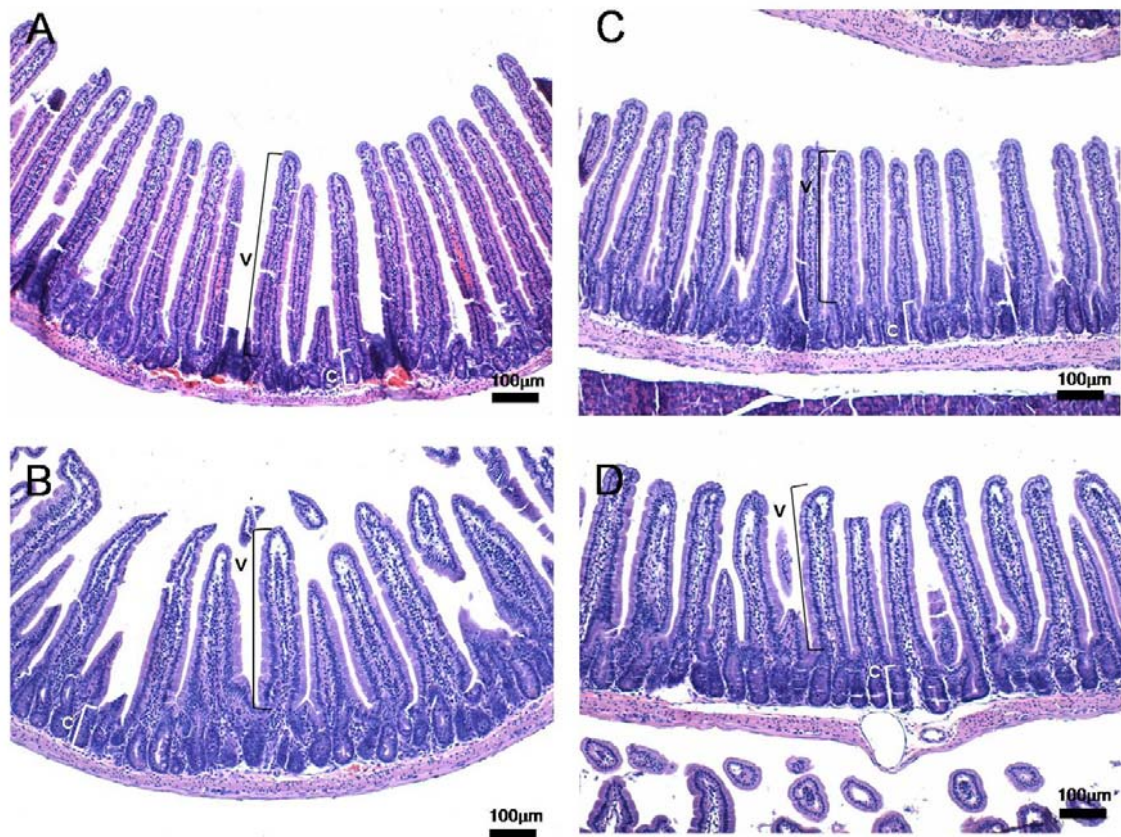


Figura 17. Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR. Alterações entéricas decorrentes da reação de GvH, 50 dias após a indução dessa doença. Em A, controle normal (n=12) no qual podemos ver as criptas (C) e vilosidades (V) intestinais. O mesmo está demonstrado nos grupos *GvHR* (n=12), *GvHR+EI* (n=11) e *GvHR+IM* (n=12), representados nas fotos B, C e D, respectivamente. Coloração Hematoxilina e Eosina; barra=100 μm.

A histopatologia esplênica evidenciou, ainda aos 50 dias, alterações em decorrência da GvHR. No entanto, observou-se uma recuperação da arquitetura do órgão em comparação com a histologia mostrada na Figura 12. Em todos os grupos com GvHR foi visível uma diminuição moderada da área ocupada pela polpa branca em comparação com o grupo normal. A celularidade da polpa vermelha encontrou-se compatível com o padrão normal (Fig.18).

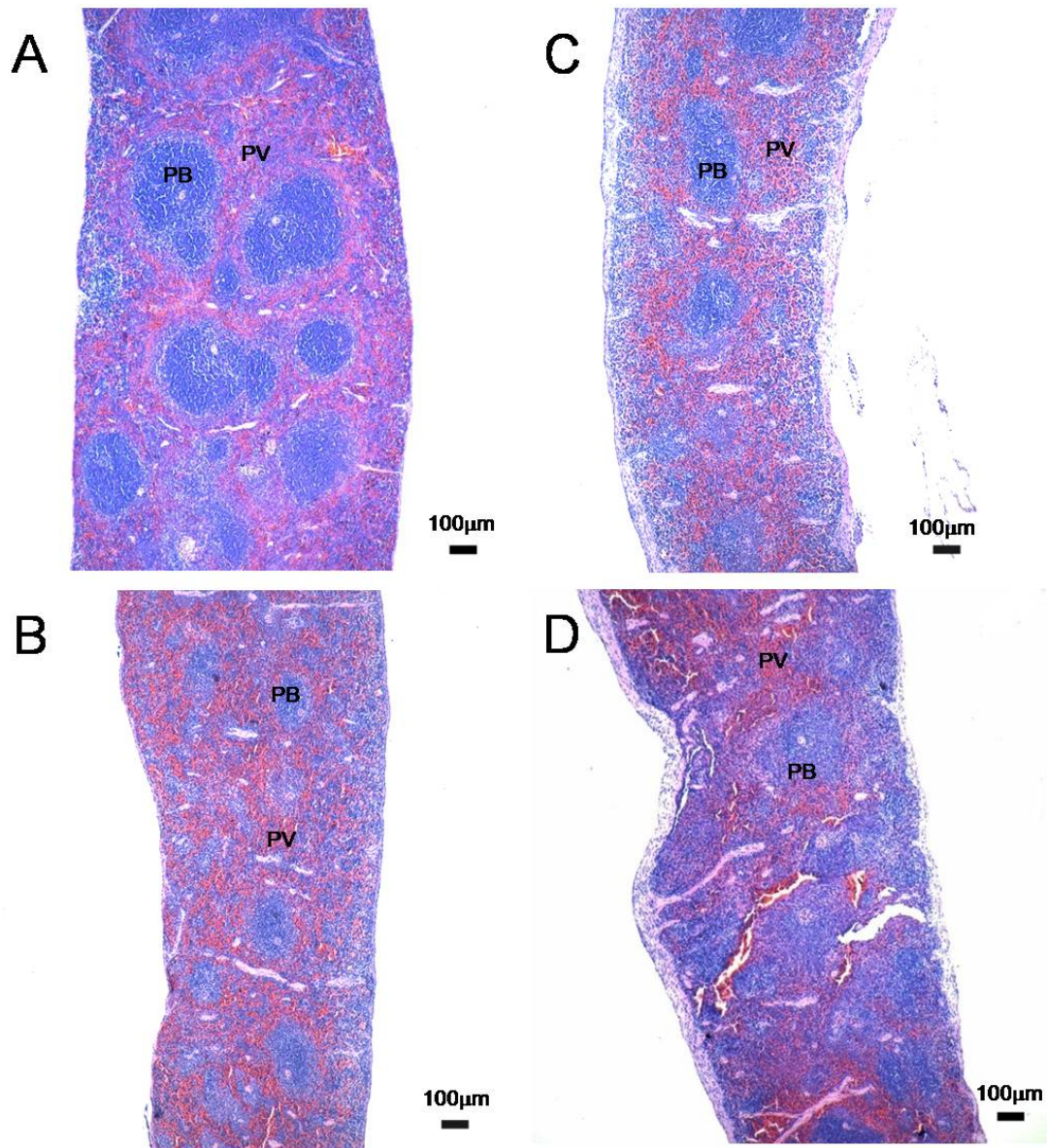


Figura 18. Alterações histopatológicas ainda estão presentes 50 dias após indução de GvHR. Alterações esplênicas decorrentes da reação de GvH, 50 dias após a indução dessa doença. Em A, controle normal (n=12). Em B, C e D, grupos *GvHR* (n=12), *GvHR+EI* (n=11) e *GvHR+IM* (n=12), respectivamente. PB: polpa branca; PV: polpa vermelha. Coloração Hematoxilina e Eosina; barra=100 µm.

5. DISCUSSÃO

Vários estudos mostram a influência da forma de administração e da dose do antígeno administrada por via oral sobre o desencadeamento da tolerância oral. Demonstrou-se que a ingestão voluntária de doses diárias do antígeno durante dias consecutivos, como parte de uma dieta normal, foi mais eficaz na tolerização (Faria *et al.*, 1993). A tolerância assim induzida é persistente e difícil de ser quebrada. De acordo com a literatura, mostramos que a produção de anticorpos anti-Ova pelos camundongos tratados *ad libitum*, durante quatro dias, com uma solução contendo Ova foi visivelmente menor que nos animais imunes (Fig. 2). Assim, mostramos que o tratamento oral realizado no presente trabalho resultou em tolerância.

Como foco da nossa pesquisa temos a reação de GvH, uma patologia inflamatória que repercute nos mais diversos sistemas orgânicos.

A GvH é uma importante complicação clínica comum após transplante de medula óssea, e é por esse motivo que estudos relacionados à doença possuem enorme relevância médica. Dentre as complicações clínicas que podem surgir após o transplante de células hematopoiéticas, foram relatadas lesões hepáticas e entéricas, diarreia, dores abdominais, perda de peso e leucopenia severa. Em muitos casos, a GvH decorrente do transplante pode levar à morte do paciente (Baker *et al.*, 1996; Chao, 1992; Ichiki *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2000; Nestel *et al.*, 1992). No entanto, deve-se observar que, ao mesmo tempo em que a transplantação traz inúmeros efeitos negativos para a saúde do paciente, ela representa a única chance de cura no caso de algumas doenças malignas ou não malignas. Vale ressaltar que a eliminação dos linfócitos do transplante aboliria a GvH. Entretanto, vários estudos demonstraram o benefício da reação de GvL, que poderia ser decorrente da GvH moderada, na prevenção de recidivas no caso de doenças malignas, e no sucesso de enxertamento do transplante (Anasetti, 2004; Chao, 1992; Ichiki *et al.*, 2006). Seria, então, possível aproveitar o potencial terapêutico desse

procedimento de transplante de células de medula óssea e eliminar os efeitos indesejados da GvH? Partindo do princípio de que a patologia decorrente da GvH advém de intensas reações inflamatórias que ocorrem sistemicamente, a possibilidade de diminuição da inflamação seria um possível alvo de ação.

Como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo de trabalho, a injeção de uma proteína tolerada foi capaz de diminuir reações inflamatórias desencadeadas por um antígeno não relacionado. Esse fenômeno, denominado “efeito indireto da tolerância oral”, já foi comprovado em vários modelos experimentais, incluindo a formação de granulomas esquistossomóticos (Azevedo-Júnior, 2004; Carvalho *et al.*, 2002) e a peritonite (Ramos, *in press*). Como a GvH consiste em reações inflamatórias sistêmicas e disso decorre a patologia, partimos do pressuposto de que os efeitos indiretos da tolerância oral poderiam diminuir as alterações clínicas causadas pela doença. De fato, trabalhos anteriores mostraram resultados positivos em camundongos submetidos previamente ao tratamento oral e injetados com a proteína tolerada concomitante com o transplante de células de baço e linfonodos para indução de GvHR (da Silva, 2000; Vaz & Carvalho, 1994).

Nosso primeiro objetivo foi, então, avaliar o efeito da tolerância oral na mortalidade decorrente da GvHR. Na experimentação animal, utilizamos o modelo descrito por Simonsen (Simonsen, 1957), no qual é realizado o transplante de células de camundongos parentais C57BL/6 para receptores híbridos (C57BL/6 x DBA/2)F1, resumidamente denominados B6D2F1. Por se tratar de um transplante semi-alogênico, a necessidade de destruição da medula óssea dos animais receptores por meio de irradiação é eliminada. Encontramos, entretanto, grande dificuldade em induzir, com essa metodologia, uma GvHR aguda que levasse à letalidade dos camundongos. Provavelmente por isso a maior parte dos estudos sobre GvH encontrados na literatura utilizem modelos experimentais nos quais se faz a irradiação prévia dos animais receptores (Anderson *et al.*, 2005; Mapara *et al.*, 2006; Matte *et al.*, 2004). Foi demonstrado que

o regime de condicionamento promove aumento da expressão de quimiocinas – importantes fatores de recrutamento celular – nos órgãos alvo da GvH. Esse aumento é diretamente proporcional à intensidade do condicionamento (Mapara *et al.*, 2006). Entretanto, como tínhamos o objetivo de analisar as alterações histopatológicas da GvHR e correlacioná-las com o possível efeito benéfico dos efeitos indiretos da injeção do antígeno tolerado, optamos por usar o modelo sem a irradiação prévia dos receptores. A dificuldade de reproduzir uma reação de GvHR letal já havia sido relatada em nosso Instituto (da Silva, 2000), e procuramos um meio de explicá-la. Primeiramente, devemos considerar a robustez do sistema imune. De acordo com Vaz, a fisiologia do sistema imune é extremamente conservadora, sendo imensamente difícil causar mudanças em um sistema que esteja funcionando perfeitamente (Vaz *et al.*, 2003). A transferência adotiva, através de linfócitos singênicos, de alguns fenômenos imunológicos como, por exemplo, da própria tolerância oral ou de seus efeitos indiretos, é facilitada pela irradiação prévia dos receptores (Cunha, 2004). Ainda, trabalhos do grupo da pesquisadora Megan Sykes mostraram que uma inflamação prévia é necessária para a infiltração de células alogênicas nos tecidos periféricos do animal receptor (Chakraverty *et al.*, 2006). Nesse estudo, camundongos que não possuíam focos inflamatórios tissulares apresentaram apenas um quadro de GvH hematopoiética. Como os regimes de condicionamento (quimioterapia e radioterapia) já causam, por eles mesmos, lesões em diversos tecidos do organismo, modelos de GvH que utilizam transplante alogênico precedido de irradiação são, dessa forma, mais agressivos, sendo capazes de causar uma patologia inflamatória sistêmica com alto grau de letalidade. Essa condição se assemelha ao quadro clínico observado na GvH humana. As lesões entéricas causadas pelos regimes de condicionamento acabam por permeabilizar a barreira epitelial do intestino, permitindo a entrada de bactérias na circulação. A presença de LPS nos tecidos potencializa ainda mais as reações inflamatórias periféricas decorrentes da GvH, contribuindo também para a letalidade (Nestel *et al.*, 1992; Price *et al.*, 1997). Assim, percebe-se mais uma vez que as

reações imunológicas dependem de algo mais do que a presença de células ou antígenos; deve-se considerar o ambiente no qual essas reações ocorrem (Cohen, 1992).

Como mostrado pelas análises histopatológicas (Fig.8; Fig.9), pelos gráficos de massa corpórea (Fig.4; Fig.5) e índice esplênico (Fig.6; Fig.7), pelos dados morfométricos (Fig.10; Fig.11) e pela cinética da leucopenia (Fig.12), a GvHR induzida com o modelo semi alogênico em nossos experimentos, apesar de não ter sido letal, foi capaz de causar uma patologia significativa nos animais. Chamam a atenção, entretanto, os dados de sobrevivência ilustrados pela Figura 3. Nesse experimento obtivemos um extraordinário índice de letalidade. Com a análise da histologia desses camundongos, observamos um inesperado quadro inflamatório, de causa desconhecida, nos animais do grupo controle normal. Com base no que foi discutido acima e no trabalho de Chakraverty (Chakraverty *et al.*, 2006), é bastante provável que essa inflamação previamente presente nos camundongos tenha possibilitado uma maior penetrância da GvHR, levando a um quadro grave de inflamação sistêmica e debilidade, acarretando a morte. Conseguimos com esse experimento comparar, então, a taxa de sobrevivência entre os diferentes grupos de camundongos com GvHR. Apesar de ter ocorrido apenas um óbito no grupo de animais tolerantes com GvHR contra três e quatro óbitos nos grupos controles doentes sem e com imunização, respectivamente, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Tentativas posteriores falharam em desencadear uma GvHR letal, por motivos já discutidos nesse trabalho.

Além da sobrevivência, avaliamos também a massa corpórea dos camundongos com GvHR, já que a perda de peso é um dos sinais clínicos dessa doença. Como é possível visualizar nas figuras 4 e 5, animais com GvHR apresentaram perda de massa independente do tratamento realizado concomitantemente à indução da doença. A injeção do antígeno tolerado não foi, então, capaz de amenizar a perda de massa corpórea. Comparando o perfil de perda de massa corpórea dos dois experimentos realizados, observamos que a GvHR letal promoveu

maior perda de massa (Fig.4) do que a GvHR não letal (Fig.5). Ainda, é possível observar que a intensidade da perda de massa corpórea foi maior por volta do décimo quarto dia após a injeção i.v. das células dos parentais nos animais F1. Quando se observa, junto com esses dados, a cinética da leucopenia (Fig.13), é possível observar que esse décimo quarto dia foi, assim como o segundo dia, marcado por leucopenia grave no sangue periférico. Dados da literatura mostram que em camundongos receptores irradiados, após a injeção i.v. de leucócitos alogênicos, as células naive do doador são retidas em órgãos linfóides secundários, sendo aí ativadas por APCs do hospedeiro e sofrendo proliferação. Três a quatro dias depois, os linfoblastos entram na circulação periférica, sendo então capazes de penetrar em tecidos não linfóides de várias regiões do corpo, desencadeando aí as lesões cutâneas, hepáticas, entéricas e outras, que são características da doença (Baker *et al.*, 1996; Chakraverty & Sykes, 2007; Ichiki *et al.*, 2006). Quando transpomos essa informação para os nossos resultados, podemos imaginar que a leucopenia inicial (Fig.13) se deveu ao recrutamento das células transplantadas para os órgãos linfóides periféricos, nos quais ocorreu apresentação de antígenos e ativação. Diferentemente, a leucopenia visível no dia 14 após a indução da GvHR se deveu, provavelmente, à infiltração celular nos tecidos periféricos. E foi justamente nesse momento que observamos, nos camundongos, os sinais clínicos mais intensos da doença (pêlo eriçado e postura encurvada) e a partir daí a mortalidade. Os sinais clínicos resultantes da GvHR pareceram menos intensos nos camundongos tolerantes quando comparados aos animais dos grupos controles com ou sem a imunização (grupos *GvHR* e *GvHR+IM*). Entretanto, essas alterações, além de terem sido muito mais brandas que nos modelos que utilizam a irradiação para condicionar os animais, elas desapareceram rapidamente.

A análise histopatológica foi outro parâmetro que se mostrou diferente entre os animais tolerantes e controles submetidos à GvHR. Quatorze dias após a indução da doença, os infiltrados inflamatórios hepáticos (Fig.8) e entéricos (Fig.9) decorrentes da patologia se

mostraram diminuídos nos camundongos tolerantes, assim como outros parâmetros, como a proporção v:c (Fig.10). Ainda, as mitoses na base da cripta, a apoptose dos enterócitos e o número de linfócitos intraepiteliais estavam, aparentemente, mais próximos do normal nos camundongos tolerantes, e pareciam aumentados nos controles doentes. Entretanto, como a análise quantitativa desses parâmetros não foi ainda realizada, esses dados não foram apresentados. A utilização de técnicas que marquem células em divisão e células apoptóticas poderia auxiliar nessas análises. A imunização com Ova em adjuvante pareceu ter um papel benéfico na patologia. Vários parâmetros histológicos mostraram-se semelhantes nos grupos de animais tolerantes e imunes, ambos submetidos à GvHR. A contagem de células calciformes no intestino delgado dos camundongos desse grupo evidenciou, por exemplo, um número mais próximo do normal do que dos outros grupos com GvHR (Fig.11). Ainda não sabemos explicar esse possível papel da imunização. Vale lembrar, entretanto, que essa aparente melhoria conferida pela imunização não foi visível no perfil de sobrevivência demonstrado no presente trabalho (Fig.3) e em trabalhos anteriores (da Silva, 2000; Vaz & Carvalho, 1994).

Análises da massa corpórea (Fig.4 e 5) e da histopatologia (Fig. 14, 15, 17 e 18) mostraram que os camundongos que sobreviveram à fase aguda da GvHR, representada como o período iniciado 14 dias após a indução da doença, apresentaram uma recuperação. Esses animais sobreviventes não alcançaram, entretanto, os padrões apresentados pelos controles normais. Pode ser que nestes animais esteja ocorrendo a reação crônica da GvHR. Tschetter mostrou que no modelo de GvHR no qual a transferência de células é realizada de camundongos parentais C57BL/6 para animais (C57BL/6 x BALB/c)F1, a GvHR apresenta, inicialmente, um perfil agudo, tornando-se posteriormente crônica (Tschetter *et al.*, 2000). Apesar de termos utilizado um modelo experimental diferente, o qual normalmente induziria uma patologia aguda e letal, a observação dos gráficos com o perfil de massa corpórea (Fig.4 e 5), com a morfometria de intestino delgado (Fig.16), além dos resultados histopatológicos (Fig.14,

15, 17 e 18), nos leva a crer que houve uma cronificação da GvHR induzida em nossos camundongos, parecido com o que foi descrito por Tschetter. De modo semelhante, trabalhos com EAE em camundongos (PLxSjL)F1 mostraram uma fase aguda da doença, seguida por um período de remissão espontânea ao longo do tempo observado (Faria *et al.*, 2003). De acordo com Cohen não é possível, nesses casos, induzir a doença autoimune novamente, como se o sistema imune só pudesse ser “enganado” uma vez (Cohen, 1992). Observa-se também aqui a fisiologia conservadora do sistema imune (Vaz *et al.*, 2003; Vaz *et al.*, 2006).

Trabalhos tão antigos quanto o de Murphy (Murphy, 1916) já demonstravam a esplenomegalia decorrente do transplante de células hematopoiéticas para embriões de galinha, apesar de a GvH ainda não ter sido descrita na época. Nossos experimentos corroboram esses dados. Os gráficos retratam dois experimentos: um deles que não apresentou uma letalidade significativa (Fig.6), e outro no qual a GvHR aguda foi letal (Fig.7). Os índices esplênicos apresentados determinam a proporção que a massa do baço representa em relação à massa corpórea. Na ausência de mortalidade, animais com GvHR apresentaram elevado índice esplênico em relação ao grupo controle normal, que demonstra a esplenomegalia. Chamamos a atenção para o grupo controle doente, que não foi estatisticamente diferente do normal. Isso se deveu à presença de um camundongo com índice esplênico muito abaixo da média (*outlier*). Os outros animais do grupo apresentaram-se semelhantes à média dos demais grupos com GvHR (*GvHR+EI* e *GvHR+IM*). Quando a GvHR foi aguda o suficiente para eliminar grande parte dos animais, o índice esplênico dos sobreviventes não mais se mostrou diferente do valor normal. Vale ressaltar que, nesse caso, o índice esplênico apresentado correspondeu apenas aos camundongos que sobreviveram à fase aguda da doença e se recuperaram. Assim, os animais que provavelmente apresentariam elevado índice morreram antes da data de coleta dos baços. Na análise morfológica dos baços, observou-se que, quatorze dias após a indução da GvHR, houve um aumento da população de células na polpa vermelha (Fig.12). Provavelmente a maior

parte delas é de origem do doador, já que nas fases iniciais da patologia ocorre grande proliferação celular e um maior enxertamento dessas células no organismo receptor (Tschetter *et al.*, 2000). Entretanto, como mostrado por Tschetter, à medida que a patologia vai se tornando crônica, a quantidade de células do doador diminui e as células do receptor vão novamente povoando o órgão (Fig.18).

Os dados apresentados nesse trabalho mostram que os efeitos indiretos da tolerância oral modificaram várias alterações causadas pela reação de GvH. Entretanto, os mecanismos por meio dos quais os efeitos indiretos atuam são ainda desconhecidos. A maioria dos estudos coloca que respostas do tipo supressoras seriam responsáveis por esse fenômeno.

Há uma grande tendência da Imunologia atual em colocar a auto-reatividade como danosa. Assim sendo, deveriam existir mecanismos supressores ou regulatórios que fossem responsáveis pela inibição da autoimunidade. Essa maneira de pensar é embasada pela Teoria da seleção clonal (Burnet, 1959; Burnet, 1976), a qual propôs também a existência de uma tolerância (natural) aos auto-componentes. De acordo com Burnet, esse evento seria gerado pela deleção de linfócitos auto-reativos muito cedo na ontogenia, prevenindo a ocorrência de doenças autoimunes. Mecanismo semelhante deveria acontecer na tolerância a aloenxertos induzida em camundongos neonatos (Billingham *et al.*, 1953).

Apesar da sua grande aceitação, a Teoria de seleção clonal apresenta falhas conceituais graves. A idéia de linfócitos impedidos de reagir fisiologicamente com o organismo e com outros linfócitos bloqueia a visão do sistema imune como um verdadeiro sistema (Vaz *et al.*, 2006). Esse modo de pensar sugerido por Burnet tornou a Imunologia – ciência essa originalmente complexa – extremamente simplista e linear.

O que acontece é que até hoje não se vê a necessidade de colocar na fisiologia do sistema imune as interconexões entre linfócitos, e dessa forma a auto-reatividade acaba sendo encarada como um fenômeno intrinsecamente patogênico. O funcionamento real desse sistema

complexo envolve conexões e desconexões de um conjunto de componentes, formando uma rede dinâmica e, ao mesmo tempo, extremamente robusta, estável. Dessa forma, a auto-reatividade se torna uma propriedade intrínseca do sistema, sendo fundamental para sua existência. A patologia advém do desequilíbrio dessas interações, quando então a diversidade de interações da rede (policlonalidade) dá lugar a um conjunto mais restrito de interações. Isso resulta em expansões oligoclonais de linfócitos T, vistas, por exemplo, na síndrome de Omenn e em transplantes de uma diversidade sub-ótima de linfócitos para indivíduos imunodeficientes. Em experimentos com camundongos, mostrou-se que animais neonatos timectomizados permanecem imunodeficientes, enquanto a timectomia realizada aos três dias de vida leva ao desenvolvimento de lesões autoimunes (Sakaguchi, 2000).

Nesse sentido, a publicação da Teoria da rede idiotípica de Jerne foi um marco na história da Imunologia básica. Pela primeira vez apareceram idéias engendrando uma visão sistêmica dos fenômenos imunológicos (Jerne, 1974). Em seu trabalho, Jerne propôs uma rede de interações entre imunoglobulinas (idiotipo e anti-idiotipo), e dessas com materiais antigênicos (epitopos) tanto exógenos quanto do próprio corpo. A ligação de um anticorpo anti-idiotípico ao idiotipo de uma imunoglobulina apresentaria efeito supressor sobre essa última, e efeito estimulador sobre a primeira. Assim, as imunoglobulinas estariam ligadas entre si e com as células, formando uma rede dinâmica e estável de interações (Jerne, 1974). É importante notar que nessa nova abordagem, o sistema imune passou a ter uma função voltada para si mesmo, passou a ser um sistema fechado em sua organização, mas aberto para interações com moléculas contatadas pelo organismo. Isso em muito difere da idéia de um sistema imune voltado para a função de defesa, que normalmente lhe é atribuída (Vaz & Varela, 1978).

A ocorrência de relações invariantes entre alguns de seus componentes é um requisito essencial para a organização de qualquer sistema. Sistemas são determinados em sua estrutura, e as mudanças sofridas por eles são, então, guiadas pela sua própria estrutura, e não

por interações com elementos externos (antígenos, no caso do sistema imune). A conservação de uma organização é o que confere a robustez, a estabilidade do sistema imune (Vaz *et al.*, 2006). Essa idéia de conservação é oposta à idéia de processos aleatórios. A tolerância oral não é uma inibição da resposta, mas uma estabilização (ou, em outros termos, conservação) do nível de reatividade após a imunização secundária (Verdolin *et al.*, 2001). Estudos mostraram que animais “parcialmente tolerantes” produzem menos imunoglobulinas que animais controles, mas respondem com altos níveis de anticorpos específicos, os quais se mantêm, entretanto, num patamar estável mesmo após diversas imunizações (Vaz *et al.*, 2006; Verdolin *et al.*, 2001).

Se a auto-imunidade fosse causada por clones auto-reativos gerados aleatoriamente, como explicar o limitado espectro de doenças auto-imunes? Os clones autorreativos “proibidos” de um indivíduo deveriam diferir dos outros casos, implicando a existência de diversos quadros de doenças auto-imunes (Cohen & Young, 1991). Além disso, como explicar a ocorrência de auto-anticorpos nos indivíduos normais?

A inibição das respostas imunes a antígenos tolerados, detectadas pela metodologia imunológica atual, retrata a maneira de ver dominante. Bandeira e Coutinho demonstraram que a tolerância oral se correlaciona a um nível mais elevado de reatividade leucocitária (Bandeira *et al.*, 1989). Da mesma forma, a inibição de respostas imunes **específicas** pelos efeitos indiretos não implica, necessariamente, uma supressão da reatividade **global** do sistema. Entretanto, muitos pesquisadores postulam que os efeitos indiretos constituiriam sim uma reação do tipo *bystander suppression* (Miller *et al.*, 1991). Evidências experimentais contradizem essa possibilidade quando mostram que a presença da proteína tolerada apenas na imunização secundária não é capaz de inibir a produção de imunoglobulinas específicas para o antígeno não tolerado. Dessa forma, é improvável que os efeitos indiretos dependam unicamente de um ambiente supressor rico em IL-4, IL-10 e TGF- β (Carvalho & Vaz, 1996; Carvalho *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 1997). Acreditamos que a explicação dos efeitos indiretos dependa da visão

integrada do sistema imune, baseada em redes de linfócitos funcionalmente interconectados (Cohen, 1992; Cohen & Young, 1991; Jerne, 1974), ao invés de uma visão de discriminação self-nonsel e independência linfocitária.

6. CONCLUSÕES

A imunização intraperitoneal com 10 μ g de Ova em 1,6mg de Al(OH)₃ concomitante com a transferência de células de camundongos parentais C57BL/6 tolerantes a Ova para camundongos B6D2F1 também tolerantes a Ova amenizou as reações inflamatórias agudas decorrentes da GvHR, como foi visível na histologia hepática e entérica. A sobrevivência foi aumentada pelos efeitos indiretos da injeção de uma proteína tolerada, mas a perda de massa corpórea e a leucopenia resultantes da GvHR não foram alteradas. Essa melhoria na GvHR desencadeada pelos efeitos indiretos da injeção de uma proteína tolerada não foi notada na patologia crônica.

A imunização intraperitoneal com 10 μ g de Ova em 1,6mg de Al(OH)₃ em animais não tolerantes também teve repercussões sobre as reações inflamatórias agudas decorrentes da GvHR, como foi visível na análise histopatológica.

A transferência de células de camundongos parentais C57BL/6 para camundongos B6D2F1 nem sempre resulta em alta taxa de mortalidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LOHR, J., KNOECHEL, B. and NAGABHUSHANAM, V. (2004). T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, **3**, 471-475.
- ANASETTI, C. (2004). Advances in the prevention of graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *Transplantation*, **77**, S79-83.
- ANDERSON, B. E., MCNIFF, J. M., JAIN, D., BLAZAR, B. R., SHLOMCHIK, W. D. and SHLOMCHIK, M. J. (2005). Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood*, **105**, 2227-2234.
- AVRAMEAS, S. (1991). Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today*, **12**, 154-159.
- AZEVEDO-JÚNIOR, G. M. (2004). Efeitos indiretos da exposição parenteral a antígenos tolerados na formação de granulomas esquistossomóticos síncronos. In *Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas*, Vol. Dissertação de mestrado pp. 1-55. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BAKER, M. B., ALTMAN, N. H., PODACK, E. R. and LEVY, R. B. (1996). The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med*, **183**, 2645-2656.
- BANDEIRA, A., CARNAUD, C., COUTINHO, A., JACQUEMART, F. and FORNI, L. (1989). Transplantation tolerance correlates with high levels of T- and B-lymphocyte activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **86**, 272-276.
- BILLINGHAM, R. E., BRENT, L. and MEDAWAR, P. B. (1953). Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, **172**, 603-606.

- BLEAKLEY, M. and RIDDELL, S. R. (2004). Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer*, **4**, 371-380.
- BRANNSTROM, M. and ENSKOG, A. (2002). Leukocyte networks and ovulation. *J Reprod Immunol*, **57**, 47-60.
- BRODY, N. I. and SISKIND, G. W. (1969). Studies on antigenic competition. *J Exp Med*, **130**, 821-832.
- BRODY, N. I., WALKER, J. G. and SISKIND, G. W. (1967). Studies on the control of antibody synthesis. Interaction of antigenic competition and suppression of antibody formation by passive antibody on the immune response. *J Exp Med*, **126**, 81-91.
- BURNET, F. M. (1959). The clonal selection theory of immunity. *Cambridge University Press*.
- BURNET, F. M. (1976). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin*, **26**, 119-121.
- CARVALHO, C. R., LENZI, H. L., CORREA-OLIVEIRA, R. and VAZ, N. M. (2002). Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. *Braz J Med Biol Res*, **35**, 1195-1199.
- CARVALHO, C. R. and VAZ, N. M. (1990). Specific responses to two unrelated antigens in mice made orally tolerant to one of them. *Braz J Med Biol Res*, **23**, 861-864.
- CARVALHO, C. R. and VAZ, N. M. (1996). Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. *Scand J Immunol*, **43**, 613-618.
- CARVALHO, C. R., VERDOLIN, B. A., DE SOUZA, A. V. and VAZ, N. M. (1994). Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J Immunol*, **39**, 533-538.
- CARVALHO, C. R., VERDOLIN, B. A. and VAZ, N. M. (1997). Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand J Immunol*, **45**, 276-281.
- CHAKRAVERTY, R., COTE, D., BUCHLI, J., COTTER, P., HSU, R., ZHAO, G., SACHS, T., PITSILLIDES, C. M., BRONSON, R., MEANS, T., LIN, C. and SYKES, M. (2006). An

- inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med*, **203**, 2021-2031.
- CHAKRAVERTY, R. and SYKES, M. (2007). The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Blood*, **110**, 9-17.
- CHAO, N. J. (1992). Graft versus host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*, **4**, 571-576.
- COHEN, I. R. (1992). The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today*, **13**, 490-494.
- COHEN, I. R. and YOUNG, D. B. (1991). Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol Today*, **12**, 105-110.
- CUNHA, A. P. V., N. M.; CARVALHO, C. R. (2004). Study of oral tolerance and its indirect effects in adoptive cell transfer experiments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1029**, 321-327.
- DA SILVA, V. P. (2000). Avaliação das alterações imunológicas celulares desencadeadas pelos efeitos indiretos da tolerância oral à Ovalbumina. In *Departamento de Bioquímica e Imunologia - Instituto de Ciências Biológicas*, Vol. Dissertação de mestrado pp. 1-80. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FARIA, A. M., GARCIA, G., RIOS, M. J., MICHALAROS, C. L. and VAZ, N. M. (1993). Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology*, **78**, 147-151.
- FARIA, A. M., MARON, R., FICKER, S. M., SLAVIN, A. J., SPAHN, T. and WEINER, H. L. (2003). Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun*, **20**, 135-145.

- FARIA, A. M. and WEINER, H. L. (1999). Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol*, **73**, 153-264.
- FARIA, A. M. and WEINER, H. L. (2005). Oral tolerance. *Immunol Rev*, **206**, 232-259.
- HOLLER, E. (2007). Progress in acute graft versus host disease. *Curr Opin Hematol*, **14**, 625-631.
- ICHIKI, Y., BOWLUS, C. L., SHIMODA, S., ISHIBASHI, H., VIERLING, J. M. and GERSHWIN, M. E. (2006). T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun Rev*, **5**, 1-9.
- JERNE, N. K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)*, **125C**, 373-389.
- KAUFMANN, S. H. (2008). Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol*, **9**, 705-712.
- LEE, S. J. (2005). New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood*, **105**, 4200-4206.
- LIN, M. T., TSENG, L. H., FRANGOUL, H., GOOLEY, T., PEI, J., BARSOUKOV, A., AKATSUKA, Y. and HANSEN, J. A. (2000). Increased apoptosis of peripheral blood T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, **95**, 3832-3839.
- MACDONALD, T. T. and MONTELEONE, G. (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, **307**, 1920-1925.
- MAPARA, M. Y., LENG, C., KIM, Y. M., BRONSON, R., LOKSHIN, A., LUSTER, A. and SYKES, M. (2006). Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biol Blood Marrow Transplant*, **12**, 623-634.

- MATTE, C. C., LIU, J., CORMIER, J., ANDERSON, B. E., ATHANASIADIS, I., JAIN, D., MCNIFF, J. and SHLOMCHIK, W. D. (2004). Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med*, **10**, 987-992.
- MILLER, A., LIDER, O. and WEINER, H. L. (1991). Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med*, **174**, 791-798.
- MOALEM, G., LEIBOWITZ-AMIT, R., YOLES, E., MOR, F., COHEN, I. R. and SCHWARTZ, M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*, **5**, 49-55.
- MULLER-WERDAN, U. (2007). Inflammation and ageing. *Z Gerontol Geriatr*, **40**, 362-365.
- MURAI, M., YONEYAMA, H., EZAKI, T., SUEMATSU, M., TERASHIMA, Y., HARADA, A., HAMADA, H., ASAKURA, H., ISHIKAWA, H. and MATSUSHIMA, K. (2003). Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol*, **4**, 154-160.
- MURPHY, J. B. (1916). The effect of adult chicken organ grafts on the chick embryo. *J Exp Med*, **24**, 1-5.
- NAKAMURA, H., NAKAO, T., UJIIE, H., KARASUNO, T., TESHIMA, H., KOMATSU, K., ISHIGURO, S., HIRAOKA, A. and MASAOKA, T. (1999). Induction of autologous graft-versus-host disease after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, S457-461.
- NESTEL, F. P., PRICE, K. S., SEEMAYER, T. A. and LAPP, W. S. (1992). Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med*, **175**, 405-413.
- OWEN, R. D. (1945). Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomoses between Bovine Twins. *Science*, **102**, 400-401.

- PARNES, O. (2003). 'Trouble from within': allergy, autoimmunity, and pathology in the first half of the twentieth century. *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci.*, **34**, 425-454.
- PEDERSEN, B. K. and TOFT, A. D. (2000). Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*, **34**, 246-251.
- PRICE, K. S., NESTEL, F. P. and LAPP, W. S. (1997). Progressive accumulation of bacterial lipopolysaccharide in vivo during murine acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol*, **45**, 294-300.
- RAMOS, G. C. R., C. M.; AZEVEDO-JR, G. M.; PINHO, V.; CARVALHO, C. R.; VAZ, N. M. (in press). Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. *Immunology*.
- REDDY, P. and FERRARA, J. L. (2003). Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev*, **17**, 187-194.
- RODRIGUES, C. M., MARTINS-FILHO, O. A., VAZ, N. M. and CARVALHO, C. R. (2006). Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. *Immunology*, **117**, 517-525.
- SAKAGUCHI, S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, **101**, 455-458.
- SCHWARTZ, M. and COHEN, I. R. (2000). Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today*, **21**, 265-268.
- SHLOMCHIK, W. D., COUZENS, M. S., TANG, C. B., MCNIFF, J., ROBERT, M. E., LIU, J., SHLOMCHIK, M. J. and EMERSON, S. G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, **285**, 412-415.
- SIMONSEN, M. (1957). The impact on the developing embryo and newborn animal of adult homologous cells. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **40**, 480-500.

- STROBEL, S. and MOWAT, A. M. (1998). Immune response to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today*, **19**, 173-181.
- TAUBER, A. I. (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 897-901.
- TSCHETTER, J. R., MOZES, E. and SHEARER, G. M. (2000). Progression from acute to chronic disease in a murine parent-into-F1 model of graft-versus-host disease. *J Immunol*, **165**, 5987-5994.
- VAZ, N. and CARVALHO, C. R. (1994). Assimilation, tolerance and the end of innocence. *Ciencia e Cultura*, **46**, 351-357.
- VAZ, N. M., DE FARIA, A. M., VERDOLIN, B. A., SILVA NETO, A. F., MENEZES, J. S. and CARVALHO, C. R. (2003). The conservative physiology of the immune system. *Braz J Med Biol Res*, **36**, 13-22.
- VAZ, N. M., MAIA, L. C., HANSON, D. G. and LYNCH, J. M. (1981). Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **76**, 83-91.
- VAZ, N. M., RAMOS, G. C., PORDEUS, V. and CARVALHO, C. R. (2006). The conservative physiology of the immune system. A non-metaphoric approach to immunological activity. *Clin Dev Immunol*, **13**, 133-142.
- VAZ, N. M. and VARELA, F. J. (1978). Self and non-sense: an organism-centered approach to immunology. *Med Hypotheses*, **4**, 231-267.
- VERDOLIN, B. A., FICKER, S. M., FARIA, A. M., VAZ, N. M. and CARVALHO, C. R. (2001). Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz J Med Biol Res*, **34**, 211-219.
- VOGELSANG, G. B., LEE, L. and BENSON-KENNEDY, D. M. (2003). Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*, **54**, 29-52.

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](#)