



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARISTELA RUBERTI

**Caracterização fenotípica e funcional das células
imunocompetentes da mucosa intestinal envolvidas na tolerância
oral a ovalbumina**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MARISTELA RUBERTI
Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro
Aprovada pela Comissão Julgadora.

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

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

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

R823c Ruberti, Maristela, 1975-
Caracterização fenotípica e funcional das células
imunocompetentes da mucosa intestinal envolvidas na
tolerância oral a ovalbumina / Maristela Ruberti. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Linfócitos intraepiteliais. 2. Mucosa intestinal.
3. Tolerância oral. 4. Imunidade nas mucosas. 5.
Citocinas. I. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha,
1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Phenotypic and functional characterization from mucosal immunocompetent cells in the oral tolerance

Palavras-chave em Inglês:

Intraepithelial lymphocytes

Intestinal mucosa

Oral tolerance

Mucosal immunity

Cytokines

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro [Orientador]

Ana Maria Caetano de Faria

Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

José Alexandre Marzagão Barbuto

Paulo Pinto Joazeiro

Data da defesa: 12-03-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 12/03/2012.

BANCA EXAMINADORA

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

Wirla msc Tamashiro

Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Anamariacaetano

Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

José Alexandre Marzagão Barbuto

Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

MH Blotta

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Paulo Pinto Joazeiro

Prof. Dr. Liana Maria Cardoso Verinaud

Prof. Dr. Dagmar Ruth Stach-Machado

Prof. Dr. José Orivaldo Mengele Jr.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Deus, nosso Senhor, por me fazer constante na fé.

À minha família, meus pais Antonio Carlos (*in memoriam*) e Ana Madalena e aos meus irmãos Isabela e Júlio pelo esforço coletivo, pelo amor e carinho.

"A grandeza não consiste em receber honras, e sim em merecê-las".

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Wirla Maria Silva Tamashiro por ter aberto seu laboratório para que eu pudesse realizar meu doutoramento, pela orientação, pela paciência e pela seriedade no desenvolvimento desse projeto, fator primordial para a realização de um trabalho científico.

Aos membros da banca, por participarem e opinarem neste trabalho dando sua honrosa contribuição.

Aos professores do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Departamento de Histologia e Embriologia e Departamento de Biologia Estrutural e Funcional que me permitiram realizar algumas etapas desse trabalho em seus laboratórios, fornecendo suporte material e intelectual, meus agradecimentos. Pelo carinho e amizade demonstrada, agradeço especialmente aos professores: Aureo T. Yamada, Paulo P. Joazeiro, Liana Maria Cardoso Verinaud, Dagmar Ruth Stach-Machado, Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Maria Alice da Cruz Höfling, Hernandes F Carvalho, Valéria Helena Alves C. Quitete.

Ao Rodrigo N. Lima, por seu amor, carinho, apoio, paciência, auxílio, presença e por cumprir sua promessa, minha eterna gratidão.

Aos companheiros de laboratório e jornada Patricia Ucelli Simioni e Luis Gustavo Romani Fernandes pelo auxílio em algumas etapas do trabalho e pela amizade.

À querida e amada Dirce Lima Gabriel pelo auxílio e apoio durante o trabalho e, principalmente, por seu carinho e amizade, meu especial muito obrigada.

Aos queridos Marcos César Meneghetti, José Raimundo Ribeiro dos Reis e Célia Aparecida Almeida Chaves Garcia, funcionários do antigo DMI, pelo auxílio e apoio durante o trabalho e, principalmente, por sua amizade, meu especial muito obrigada.

À querida amiga e agora Profa. Dra. Jacy Gameiro (e também ao Érico), por tudo e mais um pouco, principalmente por seu carinho e amizade, meu especial muito obrigada.

À querida amiga Eliana Mara Oliveira Lippe pelo auxílio, pelo apoio e por sua amizade.

Aos companheiros de pós-graduação Lóren, Carla, Ellen, Luis Peroni, Rodolfo, Marcela, Patrícia Nagib, Carolzinha, Carolina, Aline, Patricia Lima, Juliete, Danilo, Sheila (representando todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório) pelo auxílio em algumas etapas do trabalho e pela amizade.

Às eternas amigas Adriana Paula e Morghana simplesmente por existirem.

À querida amiga Beatriz Rossetti Santos por tudo, mas principalmente pelo seu apoio e amizade, meu especial muito obrigada.

Aos meus amigos da faculdade, turma da UNESP-RC, por todo o tempo que estivemos juntos, pelas brincadeiras e momentos sérios, bioencontros semestrais e anuais, casamentos, aniversários, etc. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos meus alunos e orientados da UNIP, pelo apoio incondicional sem o qual eu não teria conseguido prosseguir nessa jornada, meus sinceros agradecimentos.

A todos que aqui não citei, mas que foram importantes nessa jornada por terem contribuído direta ou indiretamente para realização deste trabalho, meus agradecimentos.

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 <i>Tolerância oral</i>	8
2.2 <i>Mucosa gastrintestinal</i>	14
2.3 <i>Linfócitos Intraepiteliais</i>	17
3. OBJETIVOS	25
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 <i>Animais</i>	30
5.2 <i>Indução da tolerância e desafio com a proteína ovalbumina</i>	30
5.3 <i>Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos específicos contra a proteína ovalbumina (OVA)</i>	31
5.4 <i>Isolamento e purificação dos linfócitos intraepiteliais</i>	32
5.5 <i>Análises fenotípicas por citometria de fluxo</i>	34
5.6 <i>Análises Histológicas</i>	36
5.7 <i>Ensaio para detecção de citocinas por análise quantitativa do RNA mensageiro (mRNA) através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time qPCR)</i>	37
5.8 <i>Estatística</i>	38
6. RESULTADOS	39

6.1	<i>Efeito da ingestão de OVA sobre a resposta imune humoral sistêmica de camundongos BALB/c e DO11.10</i>	40
6.2	<i>Análise histológica de segmentos de intestino delgado e avaliação da distribuição dos linfócitos intraepiteliais (IELs) na mucosa intestinal de camundongos BALB/c e DO11.10 tratados com ovalbumina</i>	42
6.3	<i>Análise da frequência de IELs CD8⁺ e CD4⁺ após o tratamento com ovalbumina</i>	48
6.4	<i>Análise fenotípica de IELs após os tratamentos com ovalbumina</i>	51
6.4.1	<i>Frequência de IELs CD4⁺ e CD8⁺ expressando TCRα:β e TCRγ:δ</i>	51
6.4.2	<i>Frequência de IELs CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD103</i>	54
6.4.3	<i>Frequência de IELs CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD25</i>	54
6.4.4	<i>Frequência de IELs CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺ expressando a molécula Foxp3, após o tratamento com a proteína ovalbumina</i>	60
6.5	<i>Expressão de citocinas em IELs, após os tratamentos com ovalbumina.</i>	63
7	DISCUSSÃO	67
8	CONCLUSÃO	79
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10	ANEXOS	97
ANEXO I	DADOS ADICIONAIS DE ANÁLISES FENOTÍPICAS	98
ANEXO II	PROTOCOLOCEUA/UNICAMP	99
ANEXO III	PROTOCOLO CIBio/UNICAMP.....	100
ANEXO IV	DECLARAÇÃO DE COMISSÕES DE ÉTICA.....	101
ANEXO V	ARTIGO.....	102

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução	Pág.
Figura 1.1 - Microscopia eletrônica de transmissão (A) e microscopia eletrônica de varredura (B) mostrando os linfócitos intraepiteliais IELs e o epitélio da mucosa do intestino delgado	17
Resultados	
Figura 6.1 Níveis de anticorpos séricos em camundongos BALB/c e DO11.10 imunizados com OVA	41
Figura 6.2 Análise histológica de cortes transversais do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 após tratamentos com OVA	44
Figura 6.3 Análise por imunofluorescência da distribuição de linfócitos em cortes transversais do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 após tratamentos com OVA	45
Figura 6.4 Frequência de IELs OVA-específicos isolados do intestino delgado de camundongos DO11.10, após tratamentos com OVA	46
TABELA 6.1. Número de células recuperadas do intestino delgado de camundongos DO11.10 e BALB/c tratados ou não com ovalbumina	47
Figura 6.5 Frequência de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os diferentes tratamentos com OVA	49
Figura 6.6 Avaliação das subpopulações de IELs CD4 ⁺ , CD8 α ⁺ , CD8 β ⁺ e CD25 ⁺ /CTLA-4 ⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 após os diferentes tratamentos com OVA	52

Figura 6.7	Frequência de linfócitos portadores de TCR $\alpha:\beta$ e TCR $\gamma:\delta$ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os diferentes tratamentos com OVA	53
Figura 6.8	Frequência de células CD103 ⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os tratamentos com OVA.....	56
Figura 6.9	Frequência de células CD25 ⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os tratamentos com OVA.....	58
Figura 6.10	Frequência de células Foxp3 ⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os tratamentos com OVA.....	62
Figura 6.11	Análise quantitativa da expressão das citocinas em IELs do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após tratamentos com OVA	65

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs: Células apresentadoras de antígenos

CD: Conjunto de diferenciação

DC: Célula dendrítica

DCT: Ciclo limiar comparativo usado na quantificação relativa

DTT: Ditionitreitol

EPM: Erro padrão da média

ELISA: Ensaio imunoenzimático

GALT: Tecido linfóide associado ao intestino

IBD: Doença Inflamatória do intestino

IELs: Linfócitos intraepiteliais

IECs: Células epiteliais do intestino

IFN- γ : Interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL-: interleucina

LP: Lâmina própria

mAb: Anticorpo monoclonal

MALT: Tecido linfocitário associado à mucosa

MHC: Complexo maior de histocompatibilidade

MLN: Linfonodo mesentérico

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

OPD: Ortofenilenodiamina

OVA: Ovalbumina

PP: Placa de Peyer

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

SBF: Soro bovino fetal

SCID: Imunodeficiência severa combinada

TCR: Receptor da célula T

TGF- β : Fator de crescimento e transformação beta

TGN: Camundongo transgênico

TNF- α : Fator de necrose tumoral alpha

Treg: Célula T reguladora

RESUMO

Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que camundongos transgênicos DO11.10, cuja maioria dos linfócitos T expressam TCR específico para ovalbumina (OVA) no contexto de I-A^d, não são sensíveis à tolerância oral a essa proteína. Dados de literatura mostram que a administração intraperitoneal de OVA ou do fragmento peptídico 323-339 de OVA (OVA323-339) leva à deleção de timócitos imaturos (CD4⁺CD8⁺TCR^{low}) e à drástica redução de timócitos maduros (CD4⁺CD8⁺TCR^{high}) no timo de camundongos DO11.10. No entanto, os efeitos da administração oral de OVA sobre as células T da mucosa intestinal desses animais são desconhecidos. Neste trabalho, investigamos os efeitos da ingestão de OVA sobre a modulação dos diferentes subgrupos células T e expressão de mRNA de citocinas em linfócitos intraepiteliais (IELs) de camundongos transgênicos DO11.10 (TGN) e camundongos selvagens BALB/c. Para isso, os animais das duas linhagens foram tratados com OVA por via oral por sete dias consecutivos e em seguida parte de cada grupo foi desafiada com OVA por via intraperitoneal (ip). Camundongos naïve e imunizados com OVA apenas por via i.p. constituíram os grupos controles. Segmentos de intestino delgado (jejuno) desses animais foram processados para análise histológica, isolamento e fenotipagem de IELs e avaliação da expressão de citocinas em IELs isoladas. Observamos que a histoarquitetura do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 apresentava diferenças pronunciadas na sua organização. Enquanto o intestino de camundongos BALB/c mostrava-se bem preservado e inalterado pelos tratamentos com OVA, o de camundongos DO11.10 apresentava expressiva redução da túnica muscular, bem como discretas mas bem definidas alterações histológicas de vilosidades e da lâmina

própria (LP), condições que foram acentuadas pela administração de OVA por via oral e/ou ip. A ingestão de OVA induziu acentuada redução no número de IELS no intestino delgado do TGN, mas não alterou a frequência de células TCD8⁺ e TCD4⁺. Administração de OVA via oral + ip aumentou a frequência de células CD103⁺ entre os IELs CD4⁺ de ambos os tipos de camundongos BALB / c e TGN e elevou a expressão de CD103 em IELs CD8β⁺ de TGN. A frequência de células Foxp3⁺ aumentou em todos os subconjuntos de IELS de BALB/c tratados com OVA; em IELS de TGN, a frequência de células Foxp3⁺ aumentou apenas no subconjunto CD25⁺. IELS de camundongos BALB/c tolerantes à OVA apresentaram menor expressão de todas as citocinas estudadas, enquanto que os de TGN que ingeriram OVA apresentaram elevada expressão de citocinas inflamatórias, especialmente de IFN-γ, TGF-β e TNF-α. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a inabilidade de camundongos transgênicos DO11.10 se tornarem tolerantes à OVA pode estar relacionada com a desorganização e com as alterações nas proporções de células T inflamatórias/reguladoras na mucosa intestinal.

ABSTRACT

Previous work from our laboratory showed that DO11.10 transgenic mice, in which the most of T lymphocytes express TCR specific for ovalbumin (OVA) in the context of I-A^d, are not sensitive to oral tolerance to this protein. Literature data show that intraperitoneal administration of OVA or OVA peptide fragment 323-339 (OVA323-339) leads to the deletion of immature thymocytes (CD4⁺ CD8⁺ TCR^{lo}) and the drastic reduction of mature thymocytes (CD4⁺ CD8⁻TCR^{high}) in the thymus of DO11.10 mice. However, the effects of oral administration of OVA on T cells of the intestinal mucosa of these animals are unknown. In this study, we investigated the effects of ingestion of OVA on the cellular profile and the expression of cytokines in intraepithelial T lymphocytes (IELs) of transgenic mice (TGN) and wild-type mice BALB/c. For this, mice were treated with OVA orally for seven consecutive days, and then challenged intraperitoneally (ip). Segments of small intestine (jejunum) from naïve mice or mice treated with OVA orally and/or ip were processed for histological analysis, extraction and phenotyping IELS and evaluation of the expression of cytokines in isolated IELS. We observed that the histoarchitecture of the small intestine of mice BALB/c and DO11.10 showed pronounced differences in their organization. While the jejunum of BALB/c mice showed an well-preserved structure that was unaltered by treatment with OVA, the small intestine of DO11.10 mice showed significant reduction of the muscular tunica and discrete but well-defined histological changes of lamina propria (LP) villous, conditions which were accentuated by the administration of OVA orally and/or ip. The ingestion of

OVA induced a reduction in the number of IELs in small intestines of TGN, but it did not change the frequencies of CD8⁺ and CD4⁺ T cell subsets. Administration of OVA via oral + ip increased the frequency of CD103⁺ cells in CD4⁺ T cell subset in IELs of both BALB/c and TGN mice and elevated its expression in CD8β⁺ T cell subset in IELs of TGN. The frequency of Foxp3⁺ cells increased in all subsets in IELs of BALB/c treated with OVA; in IELs of TGN, it increased only in CD25⁺ subset. IELs from BALB/c tolerant mice had lower expression of all cytokines studied, whereas those from TGN showed high expression of inflammatory cytokines, especially of IFN-γ, TGF-β, and TNF-α. Overall, our results suggest that the inability of TGN to become tolerant may be related to disorganization and altered proportions of inflammatory/regulatory T cells in its intestinal mucosa.

1 - INTRODUÇÃO

As mucosas constituem interfaces entre organismo e ambiente e representam as principais portas de entrada para os antígenos estranhos que adentram o organismo pelas vias respiratórias, geniturinária e gastrointestinal. Para vencer esse desafio, mais de 60% do tecido linfoide periférico humano está localizado nas mucosas, mesmo que a maioria dos antígenos presentes na região não seja nociva. Mais de 100 quilogramas de antígenos presentes nos alimentos são processados a cada ano pela mucosa gastrointestinal. As reações adversas a esses antígenos são evitadas porque o sistema imune das mucosas é capaz de responder de modo diferenciado aos antígenos da dieta / organismos comensais e aos agentes infecciosos / moléculas nocivas. Uma falha no equilíbrio desse sistema pode levar a reações de hipersensibilidade como nas enteropatias ou a doenças severas causadas por agentes patogênicos. A compreensão dos mecanismos empregados pelo sistema imune das mucosas permanece como o principal desafio para o desenvolvimento de vacinas e tratamentos de doenças inflamatórias, alergias e doenças autoimunes (WIEDERMANN, 2003; ANJUÈRE & CZERKINSKY, 2007).

O sistema imune do trato intestinal compreende as placas de Peyer (PP), os agregados linfoides do intestino delgado, grosso e apêndice e os linfonodos mesentéricos (MLNs), além de linfócitos T e B, plasmócitos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e células dendríticas (DCs) dispersos na lâmina própria (LP) e os linfócitos intraepiteliais (IELs) dispostos entre as células do epitélio intestinal. As respostas imunes ou de tolerância desencadeadas no intestino são iniciadas pelas populações

celulares desses tecidos linfoides, dotadas de mecanismos efetores ou reguladores (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004).

Os linfócitos intraepiteliais do intestino representam a maior coleção de linfócitos do organismo e, somados às células T presentes na lâmina própria, constituem a primeira e principal barreira imunológica para os antígenos liberados nas mucosas. Os IELs também têm sido caracterizados como células com função reguladora do sistema imune (LEFRANCOIS, 1991a; CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004).

Os IELs localizam-se justapostos às células do epitélio das mucosas, na proporção de um IEL para cada cinco a dez enterócitos, ao longo de suas faces laterais (HERSHBERG & MAYER, 2000) e possuem fenótipo de célula ativada ou de células de memória efetora (SHIRES et al., 2001; WANG et al., 2002, WANG et al., 2004). Essas células apresentam alta expressão da integrina $\alpha_E\beta_7$ que interage com a E-caderina expressa pelas células epiteliais, em interação que permite a retenção dos IELs no epitélio intestinal (CEPEK et al., 1994). O tráfico de IELs pelo organismo já foi considerado insignificante. No entanto, estudos recentes demonstram que mesmo associadas ao epitélio, os IELs podem sofrer expansão clonal e voltar à recircular pelo corpo, contribuindo para a manutenção do pool de células do organismo, principalmente os IELs com TCR $\gamma\delta$ (STANKOVIC et al., 2007).

Os IELs presentes na mucosa do intestino delgado compreendem uma população bastante heterogênea de linfócitos. Normalmente são classificados como linfócitos convencionais e não convencionais. Os IELs convencionais apresentam TCR

$\alpha\beta$ e moléculas co-receptoras convencionais CD4 ou CD8 $\alpha\beta$. Os IELs não convencionais podem ter TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$ e expressar o homodímero CD8 $\alpha\alpha$ ou ainda serem células duplo-positivas CD8⁺CD4⁺ ou duplo-negativas CD8⁺CD4⁻ (LEFRANCOIS, 1991b; HAYDAY, 2001).

As células dendríticas (DCs) dispersas na lâmina própria do intestino constituem uma população não usual que se caracteriza pela produção preferencial de IL-10, capaz de polarizar as células T para um fenótipo regulador, isto é, produtoras de IL-4, IL-10 e TGF (*transforming growth factor*)- β . Desta forma, o microambiente das mucosas favorece a tolerância local e sistêmica ao prevenir o desenvolvimento de respostas imunes efectoras contra os antígenos inócuos que adentram o organismo (MOWAT, 2003; SAMSOM et al., 2005).

Células T reguladoras também estão presentes na lâmina própria e se caracterizam pela expressão das moléculas CD25 e Foxp3 (linfócitos TCD25⁺Foxp3⁺) e estão diretamente envolvidas no processo de indução de tolerância pela via das mucosas. Protocolos para a indução de células T reguladoras têm sido sugeridos como estratégia no tratamento de doenças alérgicas (WINKLER et al., 2006) e inflamatórias do intestino (KRAUS & MAYER, 2005).

A administração oral de antígenos exógenos também leva à supressão da imunidade sistêmica específica em um fenômeno conhecido como tolerância oral. Embora não sejam totalmente conhecidos, postula-se que deleção clonal, anergia e supressão ativa da resposta imune sistêmica sejam os principais mecanismos

envolvidos no estabelecimento da tolerância oral (FRIEDMAN & WEINER, 1994). A deleção de células T antígeno específica na mucosa é observada quando altas doses do antígeno proteico são administradas, muitas vezes em condições não fisiológicas (CHEN; INOBE; MARKS, 1995). A anergia também foi observada após administração oral de antígeno em altas doses e se dá em virtude da inativação funcional de células T antígeno-específicas. Já a supressão é mais comumente observada após a administração contínua de baixas doses de antígeno. Os dados experimentais sugerem que a imunossupressão é mediada por citocinas reguladoras como o TGF- β , IL-10 e IL-4 (LEE & BARRET, 2000).

Em trabalhos anteriores de nosso laboratório verificamos que, diferentemente de sua contraparte selvagem, o camundongo transgênico DO11.10 - um animal com background genético de BALB/c, que expressa TCR transgênico derivado do hibridoma DO11.10, específico para o peptídeo OVA₃₂₃₋₃₃₉ no contexto de I-A^d (MURPHY; HEIMBERGER; LOH, 1990) - não se torna tolerante à OVA administrada por via oral. Nesses transgênicos, o desafio intraperitoneal que se segue à administração oral de OVA é sempre acompanhado de elevação dos níveis séricos de anticorpos específicos e aumento da atividade proliferativa de linfócitos esplênicos (SIMIONI et al., 2004).

No presente trabalho, avaliamos a estrutura do intestino delgado e a distribuição das diversas populações de IELs em camundongos selvagens da linhagem BALB/c tornados tolerantes por ingestão voluntária de OVA, bem como de camundongos transgênicos DO11.10 submetidos ao mesmo tratamento oral e desafio parenteral. A expressão de mRNA de citocinas pró- e anti-inflamatórias em IELs isolados de animais

das duas linhagens também foi investigada. Nossas observações mostraram a ocorrência de alterações significativas na organização do intestino delgado do camundongo DO11.10 em comparação com os camundongos selvagens BALB/c. Nesse sentido, os intestinos delgados dos TGN naïve apresentavam expressiva redução da túnica muscular bem como alterações de celularidade nas vilosidades e lâmina própria (LP), que se acentuaram após os tratamentos com OVA. Vimos também que camundongos DO11.10 e BALB/c diferiam na distribuição das diferentes populações de IELs do intestino delgado e que essas diferenças se acentuaram após tratamento oral com OVA. As alterações mais significativas na frequência de IELs em DO11.10 tratados com OVA foram: redução de células $CD8\alpha\beta^+$, aumento de células $CD4^+/CD8^+$ e a redução da expressão de $CD103^+$ em todas as subpopulações de IELs. Em BALB/c, as alterações decorrentes do tratamento oral com OVA foram: aumento de células $CD8\alpha\beta^+$ e da expressão de $CD103^+$ em todas as subpopulações de IELs. Em ambas as linhagens, a ingestão de OVA resultou em aumento da frequência de IELs $Foxp3^+$ e IELS $CD8\alpha\beta^+/CD25^+$. Contudo, o tratamento oral com OVA resultou em aumento da expressão de mRNA de citocinas com perfil inflamatório (IL-6, TGF- β , IL-17, IFN- γ e TNF- α) em IELs isoladas de camundongos DO11.10. Em conjunto, nossos resultados indicam que a inabilidade de camundongos transgênicos DO11.10 se tornarem tolerantes à OVA pode estar relacionada com a desorganização e com as alterações nas proporções de células T inflamatórias/reguladoras de sua mucosa intestinal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tolerância oral

Os mecanismos que levam à tolerância central estão relacionados com a eliminação de células T que passaram por uma seleção positiva no córtex tímico, mas que apresentam uma forte avidéz para os complexos peptídeo-MHC (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) exibidos por células apresentadoras de antígenos (APCs) medulares do timo (MURPHY et al., 1990, MONDINO et al., 1996, KLEIN & KYEWSKI 2000, TOUSSIROU, 2002). Experimentos empregando camundongos transgênicos para o receptor de célula T (TCR) têm demonstrado que a deleção clonal pode ocorrer no início da diferenciação das células T no córtex, com as células T no estágio duplo positivo (linfócitos T CD4⁺CD8⁺) ou então mais tarde, na medula tímica, quando as células já se encontram no estágio simples positivo (linfócitos T CD4⁺CD8⁻ ou T CD8⁺CD4⁻) (MURPHY et al., 1990). Embora grande parte dos clones autoreativos seja eliminada no timo, trabalhos mais recentes têm mostrado que alguns desses clones adquirem a expressão de CD25 e se tornam células T reguladoras naturais, e como tal são exportadas para a periferia (JORDAN et al, 2001; FONTENOT et al., 2005).

Os linfócitos T autoreativos que não foram eliminados pelos processos de seleção tímica poderiam, em princípio, ser ativados na periferia. Geralmente isso não ocorre porque faltam os níveis de co-estimulação necessários para a sua completa ativação na periferia, o que leva essas células T à anergia (MONDINO et al.,1996). Outros mecanismos que garantem a tolerância ao próprio na periferia incluem a supressão de células T naïve por células T reguladoras e a morte de células T efetoras por apoptose (CHEN; INOBE; MARKS, 1995; KLEIN & KYEWSKI 2000; LIPSCOMB &

MASTEN, 2002).

Embora os fatores específicos que levam à quebra da tolerância periférica a antígenos próprios ainda não tenham sido totalmente esclarecidos, o conhecimento acumulado nas últimas décadas tem contribuído para o entendimento dos mecanismos envolvidos em diversas doenças autoimunes, como a diabetes, a artrite reumatóide, a esclerose múltipla e as alergias, e para a proposição de algumas intervenções terapêuticas (WEINER et al.,1994; MONDINO et al.,1996; KLEIN & KYEWSKI 2000; TOUSSIROU, 2002; LIPSCOMB & MASTEN, 2002; MAUL & DUCHMANN, 2008).

O contato com antígenos exógenos também pode resultar em tolerância imune, que pode se desenvolver tanto de forma natural quanto experimental. Entre as formas mais estudadas de tolerância natural a antígenos exógenos destaca-se a tolerância oral ou de mucosas.

As mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital representam a primeira porta de entrada para a maioria dos patógenos que invadem o organismo, sendo alvo de intensa proteção e controle por parte do sistema imunológico. A presença de patógenos nas mucosas geralmente desencadeia respostas locais e sistêmicas que resultam na sua eliminação, enquanto microrganismos comensais e antígenos proteicos da dieta são “assimilados” pelo sistema imune. Esse fenômeno é designado como tolerância oral ou de mucosas (HOGAN & ROTHENBERG, 2008; ARTIS, 2008; ROUND & MAZMANIAN, 2009). De fato, as respostas imunes que se iniciam nas mucosas diferem bastante da imunidade desenvolvida a partir de um

contato com o antígeno por via parenteral, apresentando efeitos muitas vezes opostos aos observados em outros sítios (DU PRÉ & SAMSOM, 2011).

Sabe-se, no entanto, que o contato com antígenos pela via digestiva pode resultar no desenvolvimento de severas reações de hipersensibilidade em indivíduos alérgicos e que esta via pode ser utilizada para a administração de vacinas de grande valor profilático (MESTECKY et al., 2007). Por isso, o entendimento do funcionamento do sistema imune associados às mucosas, em particular na tolerância oral, é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e profiláticas de manifestações clínicas diversas (BURKS et al., 2008).

A tolerância oral é uma forma de tolerância periférica na qual os linfócitos maduros de indivíduos que ingeriram previamente o antígeno não respondem ou respondem fracamente a desafio parenteral subsequente com o mesmo antígeno. Esse fenômeno imunológico descrito pela primeira vez em 1911 por Wells, em modelo animal de anafilaxia, requer a ativa participação do tecido linfóide associado ao intestino, como as placas de Peyer, os folículos linfóides e as células M (OGRA, 2003). As células M localizadas no epitélio intestinal que recobre os folículos linfóides e placas de Peyer são responsáveis pela captura de antígenos do lúmen intestinal e sua entrega para células apresentadoras de antígenos profissionais (TOUSSIROU, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que, a depender da dose e frequência de administração, antígenos proteicos introduzidos pela via digestiva podem induzir um estado duradouro e específico de tolerância imunológica (WEINER, 1994; FRIEDMAN &

WEINER, 1994; MARTH et al., 2000). Altas doses de antígeno administradas pela via oral podem levar a anergia ou a deleção clonal das células T, enquanto repetidas doses de pequenas quantidades de antígeno levam a uma ativação e expansão de células T produtoras de citocinas supressoras, particularmente TGF- β e IL-10 (CHEN; INOBE; MARKS, 1995; MARTH et al., 1996; MARTH et al., 2000). Em modelos transgênicos, a tolerância oral por ingestão de proteína nativa ou de peptídeo tolerogênico também tem sido relacionada com a anergia das células T pelo aumento da expressão de CTLA-4 ("*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*") após a ativação e proliferação de células T antígenos específicas (SUN et al., 1999).

As células dendríticas (DCs) maduras são as mais importantes apresentadoras de antígenos para células T virgens. DCs imaturas estão presentes na pele, no epitélio gastrointestinal e no sistema respiratório (STEINMAN, ADAMS, COHN, 1975; STEINMAN & BANCHEREAU, 2007). As DCs imaturas - cuja função principal é capturar e transportar antígenos para os linfonodos - expressam inicialmente baixos níveis de moléculas de superfície envolvidas na ativação de linfócitos T. Durante a migração para os linfonodos, as DCs maturam e passam a expressar moléculas de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias (B7-1 e ICAM-I), além de vários receptores para citocinas e quimiocinas, receptores de Fc e receptores de manose (MR), tornando-se eficientes apresentadoras de antígenos para células T virgens. Células dendríticas maduras residem em regiões ricas em linfócitos T nos linfonodos e interstícios de vários órgãos (CELLA et al., 1997)

DCs também parecem desempenhar um papel importante na tolerância. Estudos

recentes têm demonstrado que células T que reconhecem complexos peptídeos-MHCII com baixa afinidade, sem receber nenhuma co-estimulação pelas células dendríticas, tomam-se anérgicas ou sofrem apoptose. As moléculas co-estimulatórias expressas na superfície das APCs exercem um papel primordial na ativação das células T virgens, fornecendo o segundo sinal necessário ao processo de ativação (MULLER et al.,1989). A ausência de moléculas co-estimuladoras B7 na superfície das APCs, pode induzir a tolerância de linfócitos T antígeno-específico por favorecer a interação entre moléculas CD28 e CTLA-4 (KRUMMEL & ALLISON, 1995). O papel da CD40 e de outras moléculas co-estimulatórias expressas em células dendríticas também tem sido investigado na tolerância, porém com resultados contraditórios (HAASE et al., 2004; CHUNG et al., 2004). O tratamento de camundongos normais e transgênicos DO11.10 com antígeno e com anticorpo anti-CD40, um agonista da molécula co-estimulatória de DCs, não foi capaz de interferir com a tolerância induzida pela administração oral de OVA (CHUNG et al., 2004). Por outro lado, o tratamento com anticorpos bloqueadores anti-D40-L garantiu a sobrevivência do enxerto em indivíduos transplantados sem a necessidade de tratamento com imunossupressores (GRACA et al.,2003). Células dendríticas imaturas tratadas com IL-10 não passam pelos processos de maturação, isto é, não expressam níveis significativos das moléculas co-estimulatórias em sua superfície e como resultado induzem a anergia nas células imunocompetentes (LIPSCOMB & MASTEN, 2002). Uma vez geradas, as células T anérgicas podem suprimir o desenvolvimento de uma resposta imune através da inibição da expressão de MHC de classe II, CD 80 e CD86 (*B7-1 / B7-2*, respectivamente) na superfície das células dendríticas (VENDETTI et al.,2000, STEINMAN & BANCHEREAU, 2007).

Outro aspecto importante na indução da tolerância é a diferenciação de células T reguladoras (Treg). As células Treg secretam fatores de supressão como a IL-10, TGF- β , CTLA-4 e inibem a proliferação de células T efetoras antígeno-específicas (SALOMON et al.,2000; KRISTEN & KHORUTS, 2001; WALKER et al.,2003; KOHYAMA et al.,2004).

A estimulação das células reguladoras pelas células dendríticas vem sendo amplamente discutida na literatura (VON BOEHMER, 2003, YAMAZAKI et al.,2003). No ambiente das mucosas as células dendríticas desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase. Essencialmente, as DCs CD103⁺ no ambiente intestinal podem dirigir a diferenciação de células T para um fenótipo regulador (Treg Foxp3⁺) ou efetor (TH17, secretoras de IL-17), além de atuarem na troca de isotipo de IgM para IgA em células B secretoras de anticorpos. DCs produtoras de ácido retinóico - um produto da degradação metabólica da vitamina A - parecem ser responsáveis pela transformação de células T naïve em células Treg produtoras de TGF- β e sua migração para o intestino (COOMBES et al., 2007; MUCIDA et al., 2007; VON BOEHMER, 2007; RESCIGNO & DI SABATINO, 2009). DCs isoladas das mucosas e cultivadas *in vitro*, no entanto, parecem perder sua capacidade reguladora se tornando altamente imunogênicas, demonstrando assim o importante papel do microambiente na modulação funcional dessas células (RESCIGNO & DI SABATINO, 2009).

2.2. Mucosa gastrintestinal

As superfícies das mucosas possuem organização complexa, constituída por componentes celulares e não celulares que formam uma barreira à disseminação de patógenos vindos do ambiente externo.

A mucosa do trato digestório é recoberta por uma espessa camada de muco produzido pelas células caliciformes do epitélio e por uma grande quantidade da proteína imunoglobulina A (IgA). Estima-se que 40mg de IgA / Kg de massa corporal seja secretada diariamente, especialmente no trato gastrointestinal dos seres humanos (OGRA, 2003).

Pesquisas recentes têm demonstrado que microrganismos da microbiota normal humana estimulam o sistema imune de mucosas a produzir IgA, mas de um modo peculiar. De fato, tem sido observado que esses antígenos induzem a produção oligômeros de IgA₂ de baixa afinidade e resistentes a protease de microrganismos, provavelmente a partir de células B IgM de memória localizadas na lâmina própria (CERUTTI, 2008). A IgA₂ produzida nas mucosas favorece a retenção de microrganismos comensais na superfície luminal do intestino, protegendo o organismo contra a penetração microbiana nos tecidos do hospedeiro, bem como inibindo o crescimento de uma flora patogênica no intestino (STECHEER, 2007; VAISHNAVA et al., 2008).

Sob a camada de muco encontram-se as células epiteliais do intestino, fortemente unidas no ápice e na base por junções de adesão e oclusão (*“tight*

junctions”). Esse tipo de organização funciona como uma eficiente barreira física contra os patógenos e os diversos antígenos que adentram o organismo, pois só permitem a passagem de pequenas moléculas de até 2 kDa. Em locais inflamados e durante o parto, no entanto, essas junções se tornam menos adesivas e permitem a passagem de macromoléculas para a lâmina própria (OGRA, 2003; ANDERSON, 2001). As células epiteliais do intestino, ou enterócitos, apresentam uma borda contendo microvilosidades, conhecida como borda em escova, e são recobertas pelo glicocálix, que contém grandes quantidades de anticorpos IgA, enzimas e peptídeos anti-microbianos (MAYER, 2003).

Os linfócitos estão presentes em três regiões essenciais do GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*), isto é, distribuídos na camada epitelial (IELs), espalhados pela lâmina própria (LP) ou localizados nos folículos linfoides e placas de Peyer (PP) (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004).

As placas de Peyer são agregadas de folículos linfoides, semelhantes aos nódulos linfoides, distribuídos pelo intestino delgado, particularmente no íleo. Aproximadamente 30 a 40 placas ocorrem no intestino delgado de um indivíduo, e elas aparecem como áreas de espessamento alongadas, nas quais faltam as vilosidades típicas do epitélio intestinal. Entre as células epiteliais que recobrem as regiões das placas de Peyer encontram-se células altamente especializadas denominadas células M. As células M endocitam antígenos proteicos e peptídicos do lúmen intestinal, e os transportam sem digeri-los até os macrófagos e células dendríticas situados nas camadas mais profundas do intestino (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004;

MOWAT, 2003; BAUMGART & DIGNASS, 2003). Por outro lado, as células dendríticas presentes na mucosa intestinal são capazes de estender seus processos citoplasmáticos através das junções de adesão do epitélio e capturar antígenos diretamente do lúmen intestinal (RESCIGNO et al., 2001). A integridade da barreira é mantida durante esse processo porque as junções de adesão são refeitas por proteínas que são expressas pelas células do epitélio e pelas próprias células dendríticas (ANDERSON, 2001; BURKS et al., 2008; ARTIS, 2008).

As células epiteliais do intestino (IECs) também têm sido associadas com a iniciação da resposta imunológica nas mucosas (ANDERSON, 2001; MAYER, 2003; ILIEV et al., 2009). Após infecções bacterianas, as células epiteliais passam a produzir, via ativação do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B), citocinas e quimiocinas como interleucina-8 (IL-8), MIP2 α e MIP3 α e outras moléculas que ativam ou recrutam células efectoras para o local da infecção (HAYDAY & VINEY, 2000). As IECs também secretam citocinas como a IL-7 e IL-15 que determinam o desenvolvimento dos linfócitos residentes no intestino (IELs) aos quais estão justapostas (HAYDAY & VINEY, 2000), além de poderem funcionar como células apresentadoras de antígenos não profissionais (BLUMBERG et al., 1999; HERSHBERG & MAYER, 2000; ARTIS, 2008). Os linfócitos intraepiteliais do intestino, particularmente os linfócitos T $\gamma\delta$, podem reconhecer sinais de estresse liberado pelas IECs, por uma via não clássica de apresentação antigênica envolvendo as moléculas MICA e MICB (GROH, et al., 1996; SHAO et al., 2005). Recentemente, demonstrou-se a indução de fenótipo tolerogênico em DCs isoladas de linfonodos mesentéricos e cultivadas na presença de meio

condicionado de IECs obtidos de indivíduos saudáveis. Sob a ação do ácido retinóico e de TGF- β , as DCs tolerogênicas aumentaram a expressão de CD103⁺ e foram capazes de induzir a diferenciação de células Treg Foxp3⁺. IECs de indivíduos portadores de doença de Crohn falharam em produzir o mesmo efeito (ILIEV et al., 2009).

2.3. Linfócitos Intraepiteliais

Os linfócitos intraepiteliais (IELs) são primariamente células T (>90% CD3⁺) que estão dispersas individualmente entre a camada de células epiteliais dos vilos da mucosa intestinal numa proporção de, aproximadamente, um IELs para cada cinco a dez células epiteliais do intestino (**Figura 1**). Dada a imensa área de cobertura do epitélio intestinal, os IELs residentes constituem uma fração substancial do total de células T do organismo (HAYDAY, 2001).

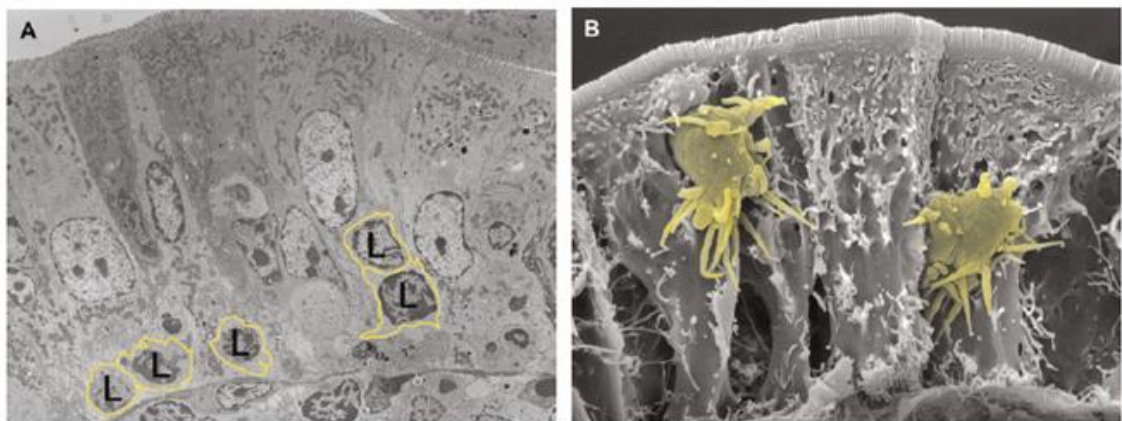


Figura 1.1. Microscopia eletrônica de transmissão (A) e microscopia eletrônica de varredura (B) mostrando os linfócitos intraepiteliais IELs e o epitélio da mucosa do intestino delgado (FOTO: ISHIKAWA et al., 2007)

A controvérsia sobre a origem dos linfócitos intraepiteliais da mucosa do intestino delgado parece ter chegado ao fim com o advento de novas tecnologias, como a utilização da proteína verde fluorescente (*gfp*, *green fluorescent protein*), que permitiram o mapeamento dessas células no intestino (EBERL & LITTMAN, 2004). Também contribuíram para isso, as descobertas recentes de que, no período perinatal, muitos IELs migram do timo para o intestino em um estágio imaturo, antes de passar pela seleção tímica. Essas células são consideradas “precursoras comprometidas” derivadas de células triplo-positivas (TP, células duplo-positivas que expressam o homodímero $CD8\alpha\alpha$) que terminam seu processo de maturação nos vilos da mucosa intestinal (LAMBOLEZ et al., 2006; HAYDAY & GIBBONS, 2008). O local exato de diferenciação dos IELs na mucosa intestinal ainda não foi determinado. Porém, acredita-se que as criptas intestinais, onde estão presentes as células troncos que dão origem às células epiteliais, seja o local de maturação e diferenciação dos IELs (SAITO, 1998; ISHIKAWA et al., 2007). A presença de células $T\gamma\delta$ de origem extratímica em camundongos atímicos ou timectomizados, também confirmaram a existência de uma população discreta de linfócitos no intestino, remanescente do desenvolvimento embrionário, oriunda de outros tecidos (GUY-GRAND et al., 2003; LOCKE et al., 2006; HAYDAY & GIBBONS, 2008).

Os IELs têm sido divididos em dois grandes grupos celulares: o primeiro grupo denominado de células “Tipo a” consiste de IELs $TCR\alpha\beta^+$ restritos ao MHC de classe II (linfócitos $CD4^+$) ou ao MHC de classe I (linfócitos $CD8\alpha\beta^+$), semelhantes às células T

convencionais selecionadas no timo encontradas no sangue, baço e outros órgãos linfóides secundários. Após a ativação em resposta ao seu antígeno cognato encontrado nos locais de indução na periferia, essas células T ativadas migram para o local efetor do intestino, onde residem permanecendo como células T efetoras e de memória. O segundo grupo, que é referido como "Tipo b", pode expressar tanto o TCR $\alpha\beta$ quanto o TCR $\gamma\delta$. Esses linfócitos frequentemente expressam o homodímero CD8 $\alpha\alpha$ e não expressam as moléculas coreceptoras típicas CD4 ou CD8 $\alpha\beta$ (HAYDAY, et al, 2001).

A distribuição das populações de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ é bastante distinta nos diversos microambientes da mucosa intestinal (epitélio versus lâmina própria; intestino delgado versus intestino grosso) e sua distribuição em roedores depende da idade, da linhagem e das condições do biotério onde são criados (STATON et al., 2006; Van WIJK & CHEROUTRE, 2009).

Os linfócitos T presentes no baço, no sangue periférico e linfonodos são em sua maioria células T $\alpha\beta$ CD4⁺ e em menor proporção células T $\alpha\beta$ CD8⁺. Já no epitélio intestinal a maior parte dos IELs (>70%) são células T CD8⁺ (LEFRANÇOIS, 1991; BHARHANI et al., 2007). As células T CD8⁺ da mucosa intestinal apresentam grânulos citotóxicos e são predominantemente células que expressam o homodímero CD8 $\alpha\alpha$. A grande quantidade de linfócitos citotóxicos nas mucosas garante o rápido reconhecimento e eliminação das células epiteliais infectadas (HAYDAY et al., 2001; BAUMGART & DIGNASS, 2003, MASOPUST et al., 2006, ISAKOV et al., 2009).

Em camundongos, os linfócitos intraepiteliais do intestino delgado são constituídos por células T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ na proporção de 20 a 35% e 65 a 80%, respectivamente. No intestino grosso murino, a maioria dos linfócitos intraepiteliais são T $\alpha\beta$ CD4⁺ (CAMERINI et al.,1993). No intestino delgado humano, a proporção de IELs portadores de TCR $\gamma\delta$ é relativamente menor, isto é, cerca de 10% do total de IELs (FAURE et al.,1988). Na lâmina própria do intestino de murinos, a proporção assemelha-se àquela encontrada no sangue periférico, que é de 95% de células T $\alpha\beta$ e de 1 a 5% de células T $\gamma\delta$ (BAUMGART & DIGNASS, 2003).

O papel dos linfócitos T $\gamma\delta$ do MALT ainda não está totalmente esclarecido. Alguns estudos, no entanto, mostram a participação dessas células no controle da resposta imune local, através da secreção de citocinas que impedem a entrada de células T efectoras da imunidade sistêmica (HAYDAY, 2001). Camundongos deficientes em células T $\gamma\delta$ apresentam uma resposta imune exacerbada às infecções bacterianas e por protozoários (ROBERTS et al.,1996; WEINTRAUB et al.,1997; HAMADA et al., 2008) e também parecem ser mais susceptíveis à inflamações no epitélio intestinal (INAGAKI-OHARA et al.,2004).

Embora as propriedades antiinflamatórias dos linfócitos intraepiteliais tenham sido sugeridas há 25 anos, pouco é conhecido acerca das interações entre as diferentes populações de IELs com o epitélio das mucosas e com os tecidos linfóides circundantes, como as placas de Peyer e a lâmina própria. Essas interações parecem

contribuir de maneira direta para o desenvolvimento de células com características reguladoras (KUNISAWA, 2007).

Os IELs situam-se entre as células do epitélio das mucosas e a membrana basal e, mesmo não formando um tecido linfoide fechado e organizado, estão entre as primeiras células do sistema imune a encontrar os antígenos de patógenos que adentram o organismo pelas vias aéreas ou por via oral (KUNISAWA et al., 2007). Essas células participam diretamente do reconhecimento e início de uma resposta imune de defesa e também da regulação dessa resposta (CARDING & EGAN, 2000; ANDERSON, 2001). Também desempenham um importante papel na manutenção da homeostase das mucosas através de um estado fisiológico de tolerância (IWEALA & NAGLER, 2006), inibindo as respostas imunes geradas contra antígenos da dieta e revertendo as respostas alérgicas iniciadas no MALT, além de promover a renovação da camada epitelial (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004). Tais funções dos IELs têm sido atribuídas à secreção de TGF- β e IL-10, citocinas envolvidas na supressão da resposta imune (KAPP et al., 2004).

Linfócitos intraepiteliais da mucosa do intestino, pulmão e pele que expressam constitutivamente $\alpha_E\beta_7$ têm sido identificados com uma população de IELs com características reguladoras (PARKER et al., 1992; LEHMANN et al., 2002; KANG et al., 2009). A integrina $\alpha_E\beta_7$ (CD103), que tem como função reter os linfócitos dentro de compartimentos epiteliais, foi descrita como marcador para duas populações de IELs: células T α_E^+ CD4⁺ CD25⁺ que expressam CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), descritas inicialmente como células T reguladoras (SAKAGUCHI, 2005) e células T α_E^+

CD4⁺ CD25⁻ que também exibem atividade reguladora. A transferência adotiva de células T α_E^+ inibiu o desenvolvimento de colite em camundongos SCID (*severe combined immunodeficient*) (LEHMANN et al., 2002). Células T CD103^{high} CD8 $\alpha\beta$ (α_E^{high}) também foram capazes de inibir o crescimento de linfócitos T CD4⁺ *in vitro* e apresentaram um papel regulador *in vivo* durante o desenvolvimento da ileíte crônica em modelo animal (HO et al., 2008). Dados da literatura clínica e experimental apontam a diminuição ou ausência de células com função reguladora/supressora, principalmente IELs CD8⁺, como causa principal das doenças inflamatórias do intestino, seja em manifestações de caráter autoimune ou alérgico (BRIMNES et al., 2005; VIGHI et al., 2008), (VON HERRATH & HARRISON, 2003; KRAUS & MAYER, 2005; VIGHI et al., 2008; BIZARRO & TONUTTI, 2008). A ausência de regulação permite o acúmulo de células inflamatórias como células de padrão Th1 (secretoras da interleucina IFN- γ) (NIESS et al., 2008) e células Th17 (secretoras de interleucina IL-17) (TARGAN & KARP, 2005; ROVEDATTI, 2009) que causam dano tecidual. Resultados clínicos têm demonstrado a importância do monitoramento constante dos linfócitos intraepiteliais nas inflamações crônicas da mucosa intestinal (FORSBERG, 2007; VIDALI et al., 2010; LIU et al., 2010).

Os camundongos transgênicos DO11.10 (MURPHY et al., 1990; YAMAZAKI et al., 2003) têm sido usados para elucidar diversos aspectos da tolerância central e periférica. Contudo, resultados obtidos no nosso laboratório mostraram que esses animais desenvolvem resposta imune humoral específica após a ingestão de ovalbumina nativa (OVA), enquanto os camundongos BALB/c (linhagem “background”

dos camundongos transgênicos) tornam-se tolerantes à OVA pela aplicação do mesmo regime. A proliferação celular e a secreção de citocinas em culturas de células T virgens conduzidas na presença de DCs do baço de camundongos BALB/c tolerantes à OVA foram sempre significativamente mais baixas do que em culturas realizadas na presença de DCs coletadas de BALB/c imunizados por via i.p. ou de DO11.10 tratados com OVA por via oral ou i.p. Os camundongos DO11.10 imunizados por via i.p. bem como os que ingeriram OVA, apresentaram um padrão de resposta imune humoral influenciado por Th1 e Th2, produzindo tanto anticorpos IgG1 como IgG2a específicos para OVA. O mesmo protocolo de imunização levou os camundongos BALB/c a produzir apenas anticorpos IgG1 OVA-específicos, cujos níveis foram significativamente mais reduzidos nos grupos pré-tratados com OVA por via oral. Após a ingestão do antígeno, foi possível verificar que os camundongos DO11.10 apresentaram uma redução significativa no número de células definidas pelo anticorpo KJ1-26 (anti-TCR OVA específico), tanto no baço como no sangue periférico. No entanto, as células T remanescentes foram bastante eficazes em montar uma resposta imune humoral OVA-específica nos camundongos transgênicos. As células dendríticas dos camundongos DO11.10 tratados ou não com OVA foram igualmente capazes de estimular a produção das citocinas IL-2, INF- γ , IL-4 e IL-10 em co-culturas de células T naïve. Entretanto, os níveis de TGF- β produzidos foram significativamente mais reduzidos nessas culturas em comparação com as conduzidas na presença de DCs de camundongos BALB/c tolerantes (SIMIONI et al.,2004).

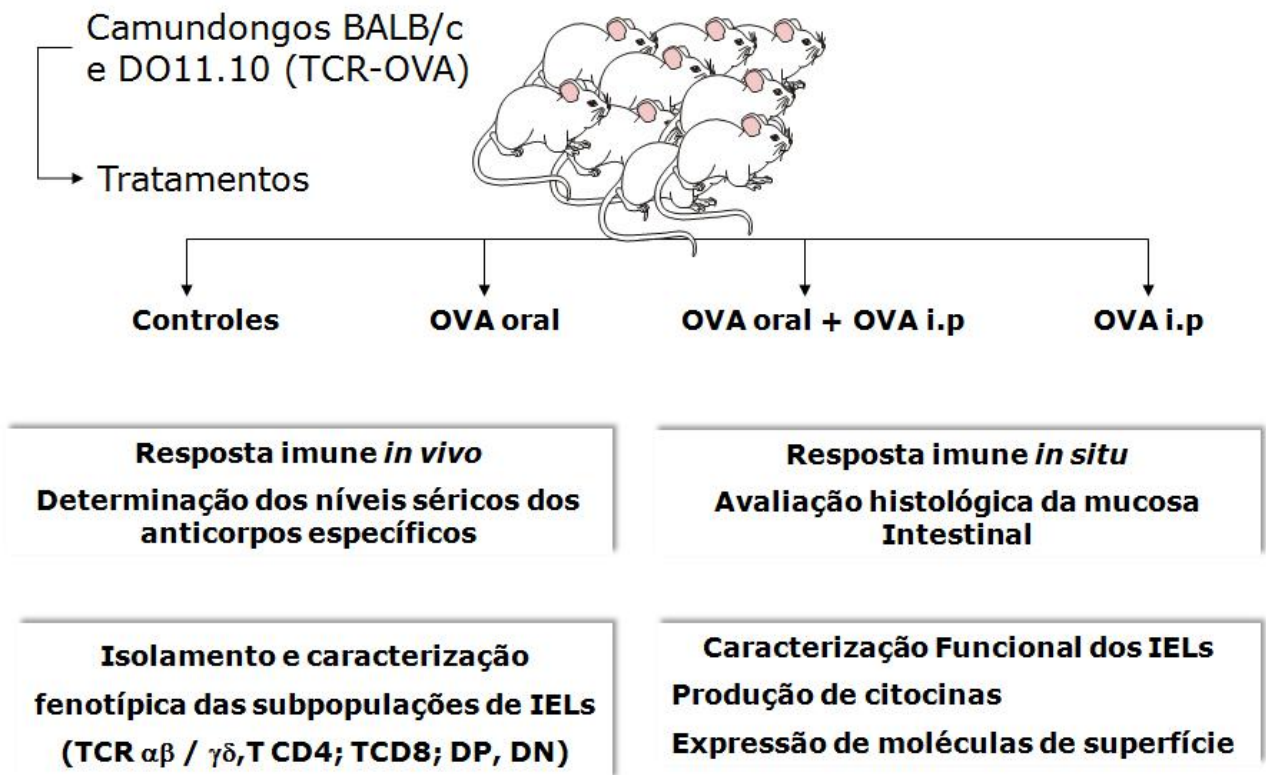
Para compreendermos melhor as diferenças descritas acima entre as linhagens

de camundongos BALB/c e DO11.10, nos propusemos estudar as populações de IELs presentes na mucosa do intestino delgado dos grupos de animais submetidos ao protocolo de ingestão voluntária de ovalbumina, bem como a avaliar localmente as respostas imunológicas que ocorrem após a absorção da proteína.

3. OBJETIVO

Avaliar os efeitos da ingestão e/ou da imunização parenteral com OVA sobre o fenótipo de linfócitos da mucosa intestinal e sobre a expressão de citocinas em IELs de camundongos transgênicos DO11.10 e camundongos selvagens BALB/c.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos das linhagens BALB/c e D011.10, cujas matrizes foram adquiridas dos Laboratórios Jackons (Bar Harbor, ME, E.U.A), foram reproduzidos no Centro Multinstitucional de Investigações Biológicas (CEMIB) da UNICAMP. Com 4 semanas de idade, os camundongos foram transferidos para o Biotério da área de Imunologia do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia, UNICAMP, onde foram mantidos em microisoladores, em ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados, com água e ração esterilizados em livre demanda. Os grupos usados nos experimentos foram constituídos por cinco animais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP, sob o protocolo No. 736-2.

5.2 Indução da tolerância e desafio com a proteína ovalbumina

Camundongos, machos e fêmeas com 6 a 8 semanas de idade, foram tratados com OVA (Rhostrer Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista, SP, Brazil) para indução de tolerância oral e/ou imunizações parenterais, conforme descrito anteriormente por SIMIONI e colaboradores (2004). Os grupos experimentais foram assim constituídos: 1) Grupo OVA oral. Os camundongos foram alimentados com OVA dissolvida na água de beber (4mg/mL), por sete dias consecutivos; 2) Grupo OVA ip. Os camundongos foram imunizados com duas doses de OVA por via ip, em intervalo de sete dias entre cada dose. A primeira dose foi constituída por 10 μ g de OVA e 1mg de adjuvante hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] diluída em solução salina (NaCl 0,15M). A

segunda dose continha 10µg de OVA em solução salina; 3) Grupo OVA oral + ip. Os camundongos receberam OVA na água de beber como o grupo 1. Sete dias após a interrupção da dieta com OVA, os animais foram desafiados com a proteína por via ip conforme descrito para o grupo 2; 4) Grupo controle naïve. Os camundongos não receberam qualquer tratamento com OVA. Quinze dias após a última dose de antígeno administrada por via ip, os animais de todos os grupos foram sacrificados.

Antes de qualquer tratamento, os camundongos foram sangrados pelo plexo retro-orbital para a obtenção do soro pré-imune. No dia do sacrifício, o sangue venoso foi colhido de todos os animais por punção cardíaca e deixado coagular. Os soros obtidos por centrifugação foram armazenados -20°C até o momento do uso.

5.3 Ensaio de ELISA para detecção de anticorpos específicos contra a proteína ovalbumina (OVA).

Os níveis de anticorpos anti-OVA foram determinados por ELISA segundo o protocolo descrito anteriormente por SIMIONI e colaboradores (2004). Brevemente, placas de ELISA (Falcon, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) foram sensibilizadas com 50µL de uma solução de OVA (Sigma) a 20µg/mL (em tampão carbonato/bicarbonato de sódio, pH 9,6) e mantidas por 1 hora à 37°C e, em seguida, por 18 horas à 4°C. Após a incubação, os poços foram lavados com solução salina tamponada (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Em seguida, os sítios livres de reação foram bloqueados pela adição de PBS contendo 5% de leite desnatado

(Nestlé) e as placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de três lavagens, as amostras de soros de camundongos imunizados, tratados ou não tratados com OVA, foram adicionadas aos poços da placa, em diluições seriadas de 1/100 a 1/12.800. Após mais um ciclo de lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de camundongo conjugada com peroxidase (HRPO) (275 ng/mL). Após 1 hora de incubação, os reagentes foram removidos por lavagem e a reação foi revelada pela adição de 50 µL do substrato/cromógeno, (H₂O₂ 0,03% (Merck) e ortofenilenodiamina 0,04% (OPD) (Sigma), em tampão ácido cítrico/fosfato bibásico de Sódio, pH 5,5). Após 30 minutos no escuro, 25 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N foram adicionados aos poços da placa, para o bloqueio das reações. As placas foram lidas utilizando-se o leitor automático de placas de ELISA (Multiskan II, MS, Labsystem, Helsinki, Finland), a 492nm. Os valores dos ELISA foram calculados através das somas das densidades ópticas obtidas em cada ponto das diluições dos soros (1:100 até 1:12.800) dos camundongos, e foram expressos como a média e erro padrão da média (EPM) de cada grupo experimental.

5.4 Isolamento e purificação dos linfócitos intraepiteliais

Os linfócitos intraepiteliais (IELs) foram extraídos do intestino delgado dos camundongos BALB/c e DO.11.10 segundo o protocolo descrito previamente por MONTUFAR-SOLIS & KLEIN (2006), sem modificações. Brevemente, os intestinos delgados foram removidos com o auxílio de pinça e tesoura estéreis, o corte foi feito

após o estômago e nas proximidades do ceco. Foram então lavados com PBS livre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ contendo antibiótico gentamicina (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) na concentração de $20\mu\text{g/mL}$, com o auxílio de uma seringa de 20mL acoplada a uma ponteira de $100\mu\text{L}$, para a retirada do conteúdo interno.

Após a lavagem, fez-se a remoção cuidadosa das placas de Peyer e das gorduras do mesentério. Os fragmentos de intestino foram colocados em uma placa de petri contendo meio RPMI (Sigma-Aldrich) completo, isto é, meio RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (SBF, Nutricell, Campinas, SP, Brazil), e gentamicina na concentração de $20\mu\text{g/mL}$. Os fragmentos de intestino foram abertos longitudinalmente e, em seguida, cortados em pedaços de 1,0 a 1,5 cm. Os pedaços foram transferidos para tubos estéreis e lavados com PBS contendo 2% de SBF e $20\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, sendo revolidos com o auxílio de uma pipeta de 10 mL. O líquido foi removido e adicionado nova alíquota de PBS/SFB/Gentamicina; este procedimento foi repetido por 4 vezes. Para a extração dos linfócitos do tecido epitelial, os pedaços lavados de intestino foram colocados em um erlenmeyer contendo 50mL de tampão PBS, contendo $70\mu\text{g/mL}$ de DTT (ditiotritol, Calbiochem; Cleveland's reagent; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 5 mM de EDTA (Sigma-Aldrich) e $20\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, e incubados por 30 a 35 minutos a 37°C em banho maria (Dubnoff - MARCONI), sob agitação constante. Os fragmentos foram colhidos em peneira de aço sobre uma placa de Petri e então descartados. As células extraídas no tampão foram filtradas em coluna de lã de nylon (130mg de lã/ seringa de 20 mL), previamente lavada com PBS/Gentamicina. As células eluídas da coluna foram sedimentadas por

centrifugação a 200g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 3 mL de PBS e misturada a igual volume de uma solução isotônica de Percoll (Amersham and Sigma-Aldrich) preparada com 9 partes de Percoll 100% [1.130 g/ml] e 1 parte de solução 1,5M de NaCl. A suspensão de células em 45% de Percoll foi depositada gentilmente (com o auxílio de uma pipeta Pasteur) sobre uma camada de 4 mL de Percoll a 70%, em um tubo de centrífuga de vidro de 15mL, e então centrifugadas a 600 g, a 20°C, por 20 minutos. As células no anel formado na interface do gradiente foram coletadas cuidadosamente, transferidas para outro tubo de centrífuga contendo meio RPMI completo (20mL) e submetidas à centrifugação a 200g, por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram novamente ressuspensas em 2-5 mL de RPMI completo e uma alíquota foi retirada e corada em azul de Trypan para a contagem de células em câmara de Neubauer. Os IELs de camundongos BALB/c foram adicionalmente purificados por passagem em colunas de separação de células contendo microesferas imunomagnéticas conjugadas com o anticorpo monoclonal anti-CD90 (Thy 1.2) (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany), seguindo-se as recomendações do fabricante.

5.5 Análises fenotípicas por citometria de fluxo

Os IELs obtidos foram incubadas com sobrenadante de cultura contendo o anticorpo anti-CD16/32 (clone 2.4G2) por 45 minutos, a 4°C, para bloquear a possível ligação dos anticorpos específicos a receptores Fc presentes em linfócitos. Em seguida,

as suspensões celulares (5×10^5 a 1×10^6 /células) foram incubadas com os anticorpos monoclonais especificados abaixo, durante 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz. Para retirar o excesso de anticorpos, as células foram lavadas com 2,5 mL de tampão para citometria (PBS contendo 2% de SBF) por centrifugação a 200g, por 10 minutos e posteriormente ressuspensas em 300 µL de PBS contendo 1% de formaldeído (Sigma-Aldrich). Os seguintes anticorpos adquiridos da BD-PharMingen foram utilizados: anti-CD3 (clone 145-2C11)-PerCP Cy5.5 ou FITC; anti-CD4 (clone GK1.5)-FITC, PE ou PE-Cy7; anti-CD4 (clone RM4-5)-PE-Cy7; anti-CD8 α (clone 53-6.7)-FITC ou PE; anti-CD8 β (clone 53-5.8)-FITC; anti-TCR β (clone H57-597)-PE; anti-TCR $\gamma\delta$ (clone GL3)-FITC ou PE; anti-CD152 (CTLA-4) (clone UC10-4F10-11)-PE; anti-CD25 (clone 7D4)-FITC ou PE; anti-CD103 (α IEL) (clone M290)-PE; anti-OVA TCR (clone KJ1-26)-PE. Anticorpos anti-Foxp 3 (clone FJK-16s)-PE ou FITC foram comprados da eBioscience (San Diego, CA, USA). As células foram examinadas em citômetro de fluxo FACSaria (Becton and Dickinson). As análises foram feitas com o software FCS express V3. Também foram feitas as análises dos respectivos controles isotípicos de cada uma das moléculas de superfície estudadas. Tais controles foram utilizados para traçar os quadrantes nas análises do *Dot Blot* e são apresentados em conjunto com as moléculas de interesse nos resultados das análises apresentados como histogramas.

5.6 Análises Histológicas

Para as análises por imunofluorescência indireta, fragmentos de aproximadamente 0,5cm de intestino delgado (porções do jejuno) de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram congelados em meio OCT (LEICA) e mantidos a -70°C até o dia do processamento. As secções transversais do intestino foram feitas por crio-secção (criostato, Microm HM 505 E) e fixadas em acetona (Merck) por 10 minutos a 4°C. A marcação dos linfócitos intraepiteliais foi feita com 1,2µg/µL anti-CD3 (clone 2C11) conjugado à fluoresceína diluído em PBS/BSA 1% (Albumina Bovina fração V, Alamar Técnico-Científica LTDA, INLAB). O tecido epitelial foi contra-corado com 0,5µg/µL de Faloidina conjugada com TRITC [isotiocianato de tetrametil rodamina B (Sigma-Aldrich)] diluída em PBS. As lâminas foram montadas com Vectashield H-1000 (Mounting Médium for fluorescence) e a análises e fotos foram feitas no microscópio Eclipse E-800 (NIKON, Tóquio Japan) usando programa de captura das imagens (Image Pró-Plus).

Para as análises histológicas, as peças de intestino delgado (porção do jejuno), foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) diluído volume a volume em solução de PBS pH7,2. Após lavagem com solução de PBS contendo 1% de Glicina (JT Baker, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, E.U.A.), as peças foram incluídas em parafina. Secções 5 µm (cortes transversais) feitas no micrótomo (LEICA) foram coradas com hematoxilina/eosina (H/E, Sigma-Aldrich). As lâminas foram observadas em microscópio óptico (microscópio Eclipse E-800, NIKON, Tóquio Japão). A captura de imagens e as fotos foram feitas utilizando o software Image Pro-plus.

5.7 Ensaio para detecção de citocinas por análise quantitativa do RNA mensageiro (mRNA) através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time qPCR*).

O RNA total foi extraído do IELs dos grupos de camundongos BALB/c e DO11.10, purificados conforme descrito no item 2.2, usando-se o kit reagente PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Brazil, LTDA), de acordo com as instruções do fabricante. As transcrições reversas (cDNA) foram feitas usando-se os reagentes do kit SuperScript III First-Strand Syntesis Supermix (Invitrogen), com hexâmeros randômicos. Os ensaios para detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17, IFN- γ , TGF- β e TNF- α por reação em cadeia da polimerase em tempo real, foram feitos em quadruplicatas usando-se a sonda (*probe*) presente no reagente 2x TaMan Master Mix (Applied Biosystems) e as sequências iniciadoras (*primers*) presentes no reagente TaqMan Gene Expression Assays Assay-on-Demand (Applied Biosystems). Os ensaios foram realizados no equipamento 7500 FAST – Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). O primer 18S RNA ribossomal (18S rRNA) foi usado como controle endógeno. Todos os primers foram adquiridos como Inventoried Assays – sequências iniciadoras pré definidas e pré fabricadas disponíveis sob os códigos: IL-2 (Mm00434256_m1); IL-4 (Mm00445259_m1); IL-10 (Mm00439614_m1); TGF-beta 1 (Mm00441729_g1); TNF- α (Mm00443258_m1); IL-6 (Mm00446190_m1); IFN- γ (Mm01168134_m1); IL-17 (Mm00439618_m1); 18S rRNA (Hs03928990_g1). As amostras experimentais e controles foram feitas em

quadruplicatas. A expressão relativa do RNA mensageiro foi calculada usando o método comparativo $2(-\Delta\Delta C(T))$ descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). Brevemente, os valores Delta CT (DCT) para cada citocina foram calculados subtraindo-se a média dos sinais de PCR encontrados nas amostras do grupo experimental da média encontrada nas amostras de controle endógeno (18S rRNA). Desta forma, $DCT = CT(\text{citocina}) - CT(18S \text{ rRNA})$, onde CT se refere ao *comparative threshold cycle*. O DCT de cada citocina nos diferentes grupos experimentais foi então subtraído dos respectivos DCT obtidos na amostra de referência (grupo controle naïve) para gerar o Delta Delta CT (DDCT). Desta forma, $DDCT = DCT \text{ da amostra experimental} - DCT \text{ da amostra de referência}$. O valor de DDCT assim obtido foi usado para calcular a expressão relativa dos genes das citocinas em comparação à amostra de referência. Para a normalização, atribuiu-se o valor arbitrário de 1 aos mRNA de citocinas em IELs do grupo controle. Os mRNA nos grupos experimentais foram plotadas em gráfico em relação ao valor atribuído ao controle.

5.8 Estatística

Para comparações entre os grupos controles e experimentais utilizou-se a análise de variância ANOVA (One-way e Two-way) seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efeito da ingestão de OVA sobre a resposta imune humoral sistêmica de camundongos BALB/c e DO11.10

Os efeitos da ingestão de ovalbumina sobre a resposta imune humoral específica foi avaliada em camundongos transgênicos DO11.10 e sua contraparte selvagem, o camundongo BALB/c. Para isso, os camundongos foram alimentados durante sete dias consecutivos com solução de OVA (4mg/mL), além de ração em livre demanda. Duas semanas após a interrupção do tratamento oral com a proteína, parte do grupo foi desafiada com duas doses 10 μ g de OVA/1mg de Al(OH)₃ administradas por via intraperitoneal, em intervalo de sete dias. Uma semana após a última dose ip, os níveis de anticorpos séricos específicos foram examinados por ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA indireto. A **Figura 6.1** ilustra os resultados obtidos em três experimentos independentes. Conforme se pode observar, camundongos BALB/c tratados previamente com OVA por via oral e depois desafiados por via parenteral apresentaram níveis séricos de anticorpos específicos significativamente mais reduzidos ($p \leq 0,001$) do que os camundongos controles imunizados apenas por via ip (**Figura 6.1A**). Em camundongos DO11.10, no entanto, o tratamento oral com OVA não inibiu a produção de anticorpos séricos anti-OVA. Ao contrário, o consumo de OVA parece ter funcionado como via sensibilizante, uma vez que níveis significativamente mais elevados de anticorpos específicos foram observados em soros de transgênicos que receberam OVA por via oral + ip, em comparação aos controles imunizados apenas por via ip ($p \leq 0,001$) (**Figura 6.1B**).

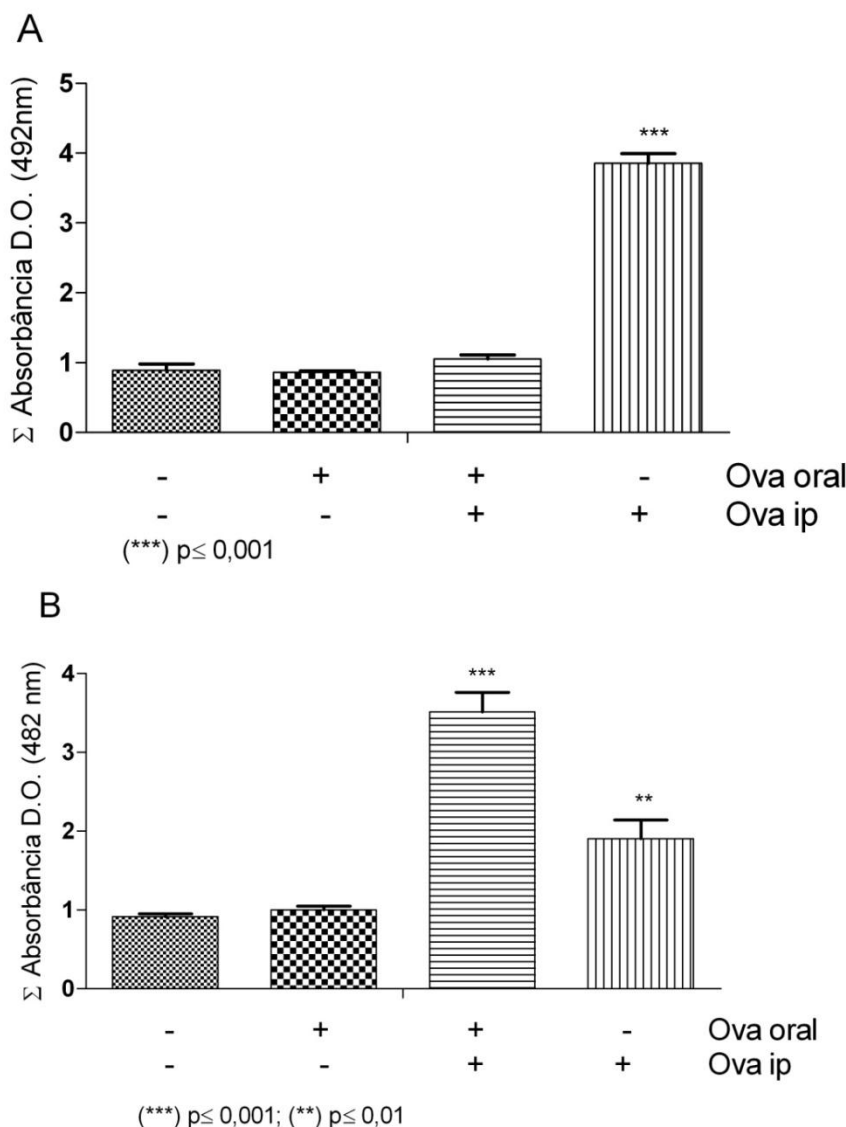


Figura 6.1. Níveis de anticorpos séricos em camundongos BALB/c e DO11.10 imunizados com OVA. Camundongos BALB/c (Painel A) e DO11.10 (Painel B) receberam 4mg/mL de OVA dissolvida na água de beber, durante sete dias consecutivos (OVA oral). Os grupos controles receberam água livre de proteínas. Quatorze dias depois da interrupção do tratamento oral, a metade dos animais em cada grupo foi desfiado por via ip com uma dose de 10 μ g de OVA em solução salina contendo 1mg de Al(OH)₃. Sete dias depois foi realizado novo desafio ip com a mesma dose do antígeno em solução salina por via ip. As barras representam as médias das somatórias (Σ) das densidades ópticas (Dos) obtidas quando os soros imunes foram testados nas diluições de 1:100 até 1:12.8000 por ELISA contra OVA. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA utilizando-se o teste a posteriori de Bonferroni. (**) e (***) indicam os valores de p .

6.2 Análise histológica de segmentos de intestino delgado e avaliação da distribuição dos linfócitos intraepiteliais (IELs) na mucosa intestinal de camundongos BALB/c e DO11.10 tratados com ovalbumina

Após a interrupção dos tratamentos com OVA, os intestinos de camundongos BALB/c e DO11.10 foram removidos assepticamente e segmentos da região do jejuno foram processados para a avaliação histológica em cortes ultrafinos corados com H&E. A avaliação in situ de linfócitos T foi realizada em criosecções coradas com anticorpo anti-CD3 conjugado com FITC. Os segmentos de intestino delgado também foram empregados para o isolamento de IELs utilizados nas avaliações da distribuição desses tipos celulares nos dois tipos de camundongos submetidos aos diferentes tratamentos com OVA. As **Figuras 6.2, 6.3, 6.4** e a **Tabela 6.1** ilustram o conjunto de resultados obtidos em três experimentos independentes.

É possível observar na **Figura 6.2** que a camada muscular da mucosa do intestino delgado de camundongos DO11.10 apresentava-se mais fina do que a de camundongos BALB/c, mesmo em animais do grupo controle. Observa-se também, que o epitélio intestinal dos camundongos DO11.10 apresenta uma estrutura mais frouxa e com menos células do que os vilos do epitélio intestinal dos camundongos BALB/c. Após os tratamentos com OVA as diferenças se acentuaram entre as duas linhagens, com os vilos intestinais de camundongos transgênicos DO11.10 mostrando um edema discreto na lâmina própria (LP), não observável no respectivo grupo de camundongos BALB/c. De fato, o tratamento com OVA não resultou em qualquer alteração na mucosa intestinal de camundongos BALB/c.

Após os tratamentos com OVA, a incidência de células CD3 positivas diminuiu substancialmente nas vilosidades intestinais de camundongos transgênicos DO11.10, mas não nas de camundongos BALB/c (**Figura 6.3**). A análise por citometria de fluxo confirmou esses resultados (**Figura 6.4A**), mostrando redução de 65% para menos de 20% do clonotipo OVA-específico (células KJ1-26⁺) entre as IELs isoladas dos camundongos transgênicos controles e alimentados com OVA, respectivamente (**Figura 6.4B**).

Conforme resumido na **Tabela 6.1**, o número total de IELs isolados do intestino delgado de camundongos DO11.10 foi sempre menor do que o obtido de camundongos BALB/c, mesmo nos grupos controles sem tratamento. Além disso, observou-se que os tratamentos com OVA levaram a acentuada redução no número de células recuperadas de intestinos de camundongos transgênicos, o que não ocorreu nos grupos de camundongos BALB/c.

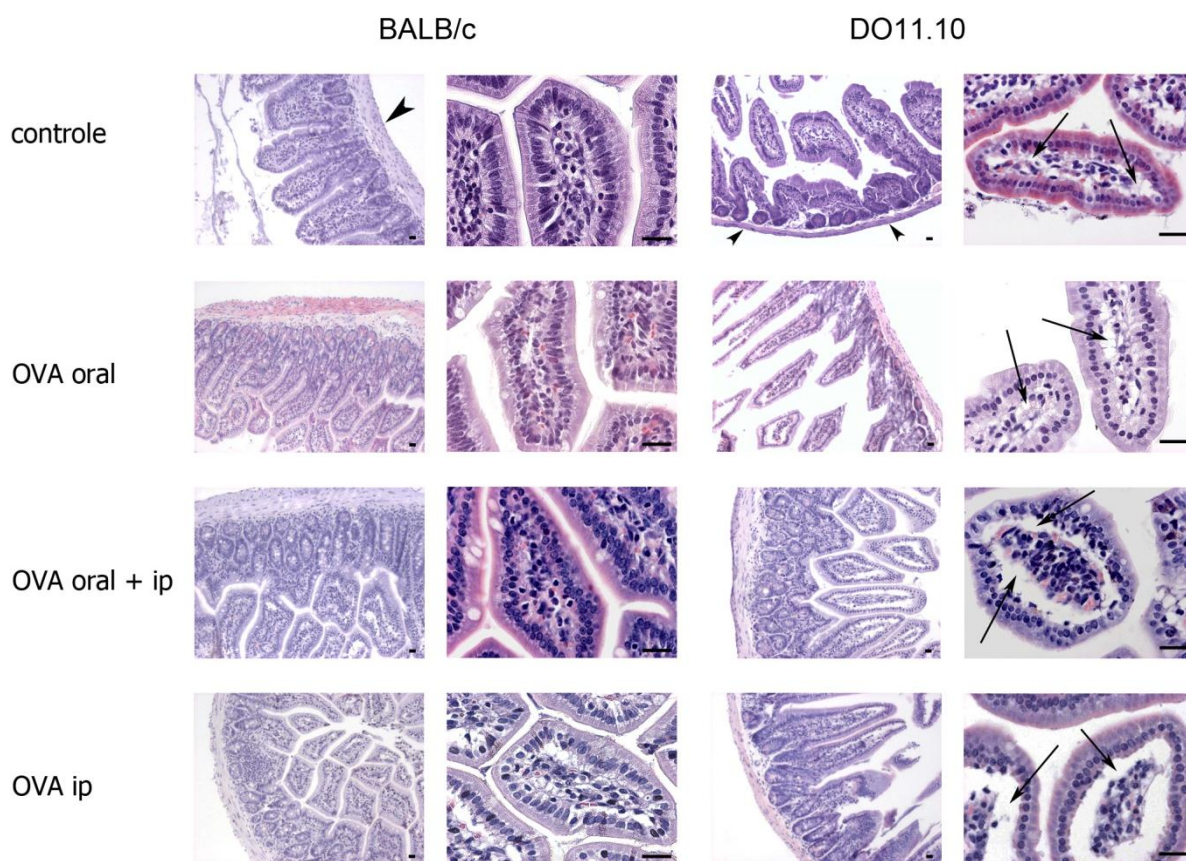


Figura 6.2. Análise histológica de cortes transversais do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 após tratamentos com OVA. Os camundongos receberam OVA misturada à água de beber, durante sete dias (OVA oral). Quatorze dias após a interrupção do tratamento oral, metade dos animais foi desfiado com duas dose de $10\mu\text{g}$ de OVA em solução salina contendo 1mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ pela via ip em intervalo de sete dias. Um grupo de camundongos recebeu OVA apenas por via intraperitoneal (OVA ip). Os animais do grupo controle não foram imunizados e receberam água livre de proteínas. Amostras do intestino delgado (jejuno) foram coletadas, fixadas em formol tamponado e então incluídas em parafina. Secções de $5\mu\text{m}$ foram coradas com Eosina e Hematoxilina. As cabeças de seta indicam a região da túnica muscular; as setas indicam regiões da lâmina própria com edema. Os achados histológicos são representativos de 3 experimentos independentes. (N=5). As barras nas figuras correspondem a $100\mu\text{m}$.

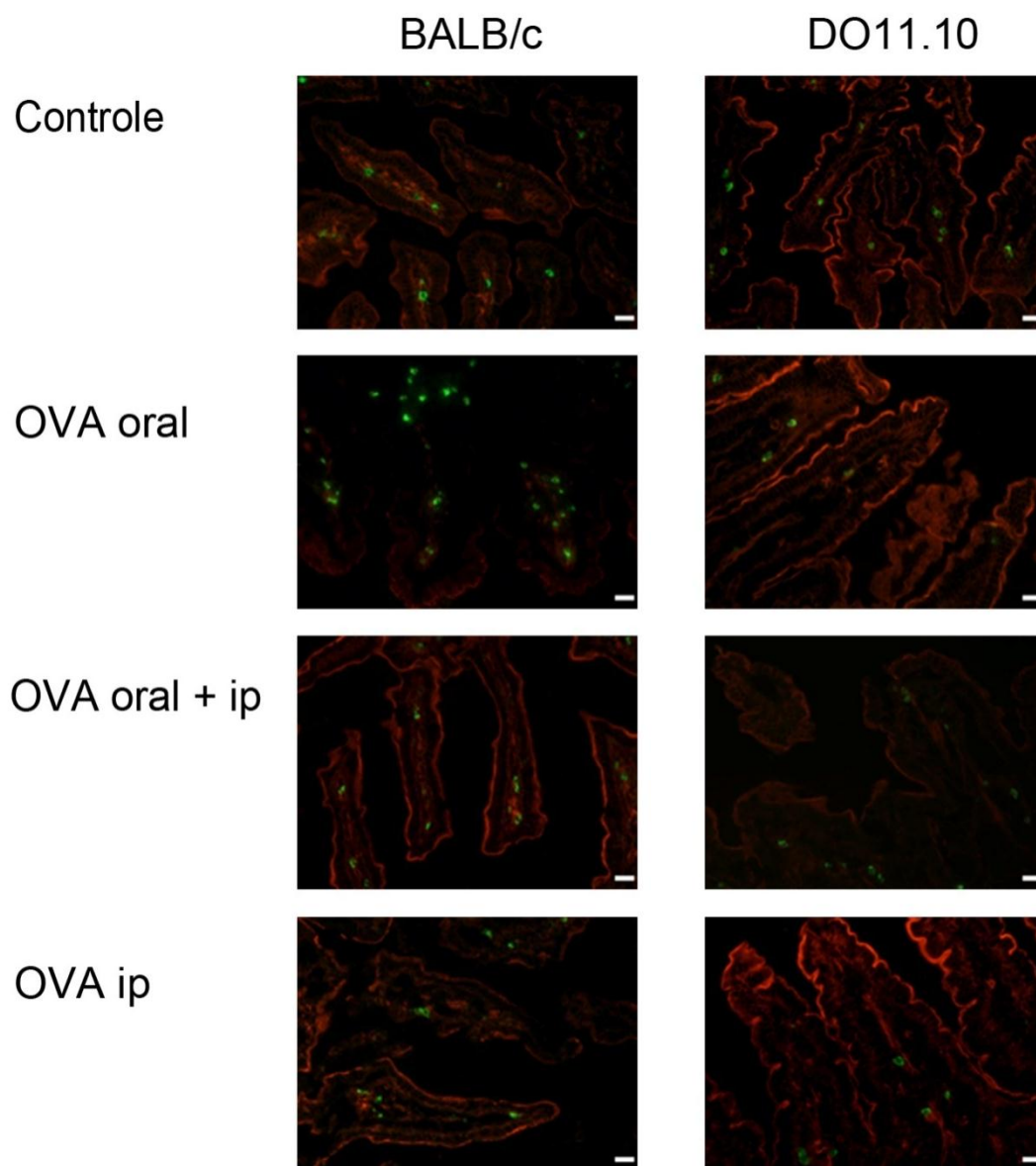


Figura 6.3. Análise por imunofluorescência da distribuição de linfócitos em cortes transversais do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 após tratamentos com OVA. Para evidenciar os linfócitos, criosecções de intestino delgado (jejuno) de camundongos DO11.10 e BALB/c tratados ou não com OVA foram fixadas em acetona, corados com anti-CD3conjugado com FITC (clone 2C11; coloração verde) diluído 1:200 em PBS/BSA 1%. Para evidenciar os vilos e as células epiteliais, as secções foram contra coradas com Faloidina conjugada com TRITC (coloração vermelha) na concentração de 0,5 μ g/ μ L. (N=5). Barra = 100 μ m.

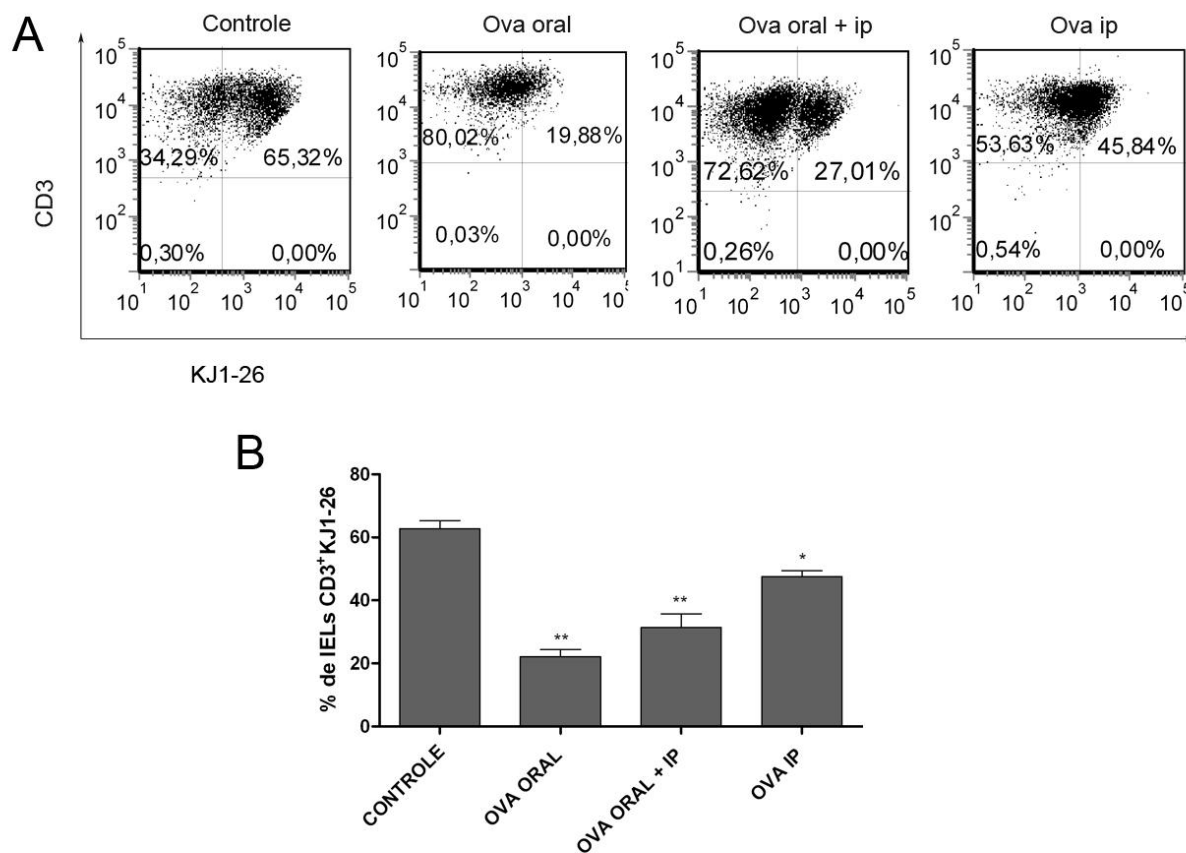


Figura 6.4. Frequência de IELs OVA-específicos isolados do intestino delgado de camundongos DO11.10, após tratamentos com OVA. IELs isolados de segmentos de intestino delgado de camundongos DO11.10 foram analisados por citometria de fluxo (FACSaria; Becton & Dickinson) para o marcador clonotípico KJ1-26⁺ expresso pelas células T transgênicas. (Painel A): Dot plots de frequência das células KJ1-26⁺ nos diferentes tratamentos. (Painel B) Gráficos de barras representando as análises estatísticas das frequências médias de células KJ1-26⁺ \pm E.P.M. obtidas em três experimentos independentes. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA utilizando-se o teste a posteriori de Bonferroni. (*) e (**) indicam os valores de $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente (N=5).

TABELA 6.1. Número de células recuperadas do intestino delgado de camundongos DO11.10 e BALB/c tratados ou não com ovalbumina.

	BALB/C		DO11.10	
TRATAMENTOS				
CONTROLE	7,07	±2,05	4,27	±1,51
OVA ORAL	6,50	±1,91	1,57*	±0,72
OVA ORAL + IP	11,62	±4,97	1,00*	±0,29
OVA IP	12,75	±3,41	0,55**	±0,08

^a Média ± EPM do número de células x 10⁷; ^b Os dados foram obtidos de três (DO11.10) e quatro (BALB/c) experimentos independentes; (*), $p \leq 0,05$; (**), $p \leq 0,01$.

6.3 Análise da frequência de IELs CD8⁺ e CD4⁺ após o tratamento com ovalbumina

Para avaliar a frequência de IELs expressando as diferentes moléculas co-receptoras CD8 $\alpha\alpha$, CD8 $\alpha\beta$ e CD4, as células extraídas do intestino delgado de camundongos BALB/c e D011.10, controles e tratados com OVA por via oral e /ou via ip, foram marcadas com anti-CD3-PerCP, -Cy5.5 ou -FITC, anti-CD8 α -FITC, anti-CD8 β -FITC, anti-CD4-FITC, -PE ou -PE-Cy7 e analisadas em citômetro de fluxo por tripla marcação (CD3 / CD8 α e CD8 β ; CD3 / CD8 α e CD4). Cerca de 90-97% das células obtidas no processo de extração preconizado para a obtenção de IELs foram marcadas pelo anticorpo anti-CD3, indicando a sua natureza linfocitária (**Figura 6.5, painéis A e B**). Não foram observadas diferenças significativas nas frequências de linfócitos CD8 $\alpha\alpha$, CD8 $\alpha\beta$, CD4⁺ e CD4⁺CD8⁺ extraídos do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, tanto dos grupos controles como dos submetidos aos diferentes tratamentos com OVA (**Figura 6.5, Painéis C-F**).

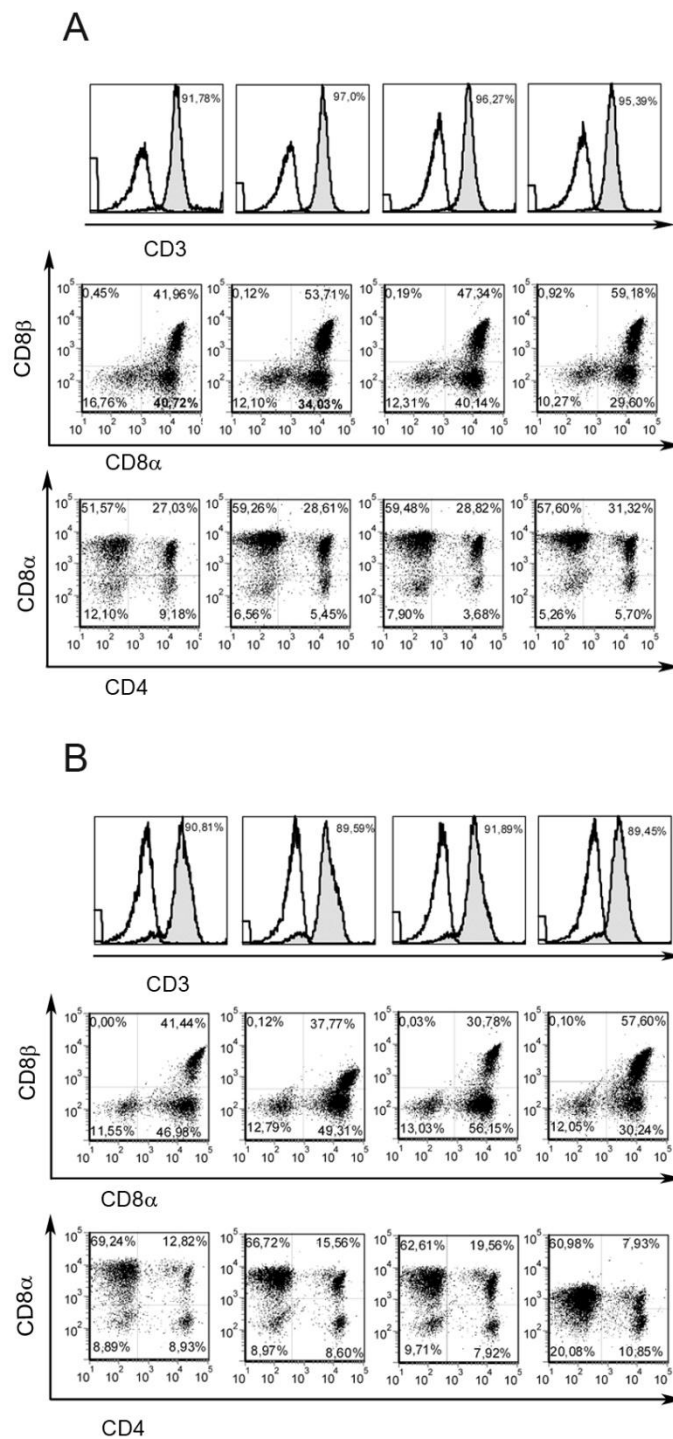


Figura 6.5 (continua)

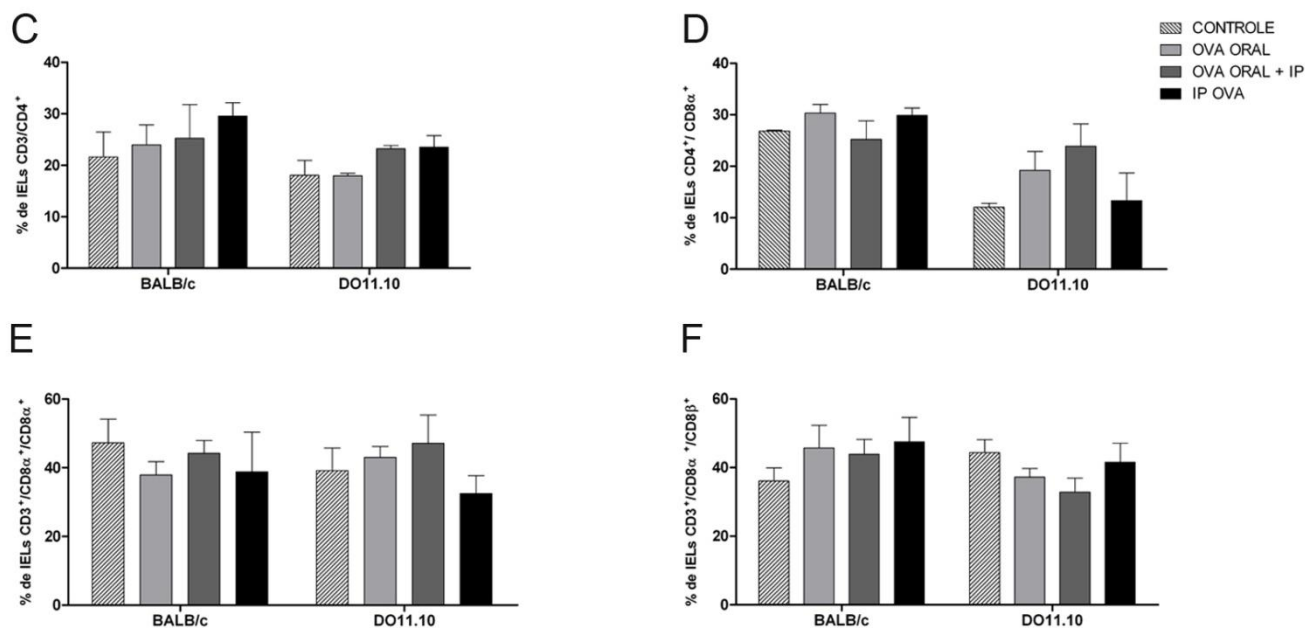


Figura 6.5. Frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os diferentes tratamentos com OVA. IELs foram isolados da mucosa do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 e marcados com anticorpos anti-CD3-PerCP, -Cy5.5 ou -FITC, anti-CD8 α -FITC, anti-CD8 β -FITC, anti-CD4-FITC, -PE ou -PE-Cy7 (eBioscience). As amostras foram analisadas por tripla marcação em citômetro de fluxo FACSaria (Becton & Dickinson) e pelo software FCS Express V3. Inicialmente, as células obtidas de camundongos BALB/c (Painel A) e DO11.10 (Painel B) foram analisadas em relação ao marcador de superfície CD3. Subsequentemente, as células dentro das gates CD3 foram analisadas para os co-receptores CD4, CD8 α , CD8 β . As porcentagens encontradas para cada subpopulação estão apresentadas dentro dos quadrantes traçados, usando como referência os valores obtidos nas análises dos respectivos isotipos controles. (Painéis C - F) Análise estatística das frequências médias \pm E.P.M. obtidas em três experimentos independentes (N=5). As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA.

6.4 Análise fenotípica de IELs após os tratamentos com ovalbumina

Para avaliar os efeitos da administração de OVA sobre a frequência de IELs expressando $\text{TCR}\alpha\beta$ e $\text{TCR}\gamma\delta$, CD103, CD25, CTLA-4 e Foxp3 dentro das subpopulações $\text{CD3}^+/\text{CD4}$, $\text{CD3}^+/\text{CD8}\alpha$ e $\text{CD3}^+/\text{CD8}\beta$ (**Figura 6.6**), as células isoladas do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 foram adicionalmente marcadas com os anticorpos anti- $\text{TCR}\beta$ -PE; anti- $\text{TCR}\gamma\delta$ -FITC ou -PE, anti-CD152 (CTLA-4)-PE; anti-CD25-FITC ou -PE; anti-CD103-PE e anti-Foxp 3-PE ou -FITC. As frequências de IELs expressando $\text{TCR}\alpha\beta$, $\text{TCR}\gamma\delta$, CD103 e CD25, estão ilustradas nas **Figuras 6.7 a 6.9**. A frequência de IEL $\text{CD25}^+/\text{CTLA-4}^+$ (**Figura 6.6 D, H**) foi sempre muito baixa (0,09 a 1,92%) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos com OVA, tanto em camundongos BALB/c quanto DO11.10 (dados não mostrados).

6.4.1 Frequência de IELs CD4^+ e CD8^+ expressando $\text{TCR}\alpha:\beta$ e $\text{TCR}\gamma:\delta$

Conforme se pode observar na **Figura 6.7**, nenhuma alteração relacionada aos diferentes tratamentos com OVA pode ser observada nas frequências de células $\text{T}\alpha\beta$ e $\text{T}\gamma\delta$ isoladas de intestino delgado de ambos os camundongos BALB/c (**Figura 6.7 A, C**) e DO11.10 (**Figura 6.7 B, D**).

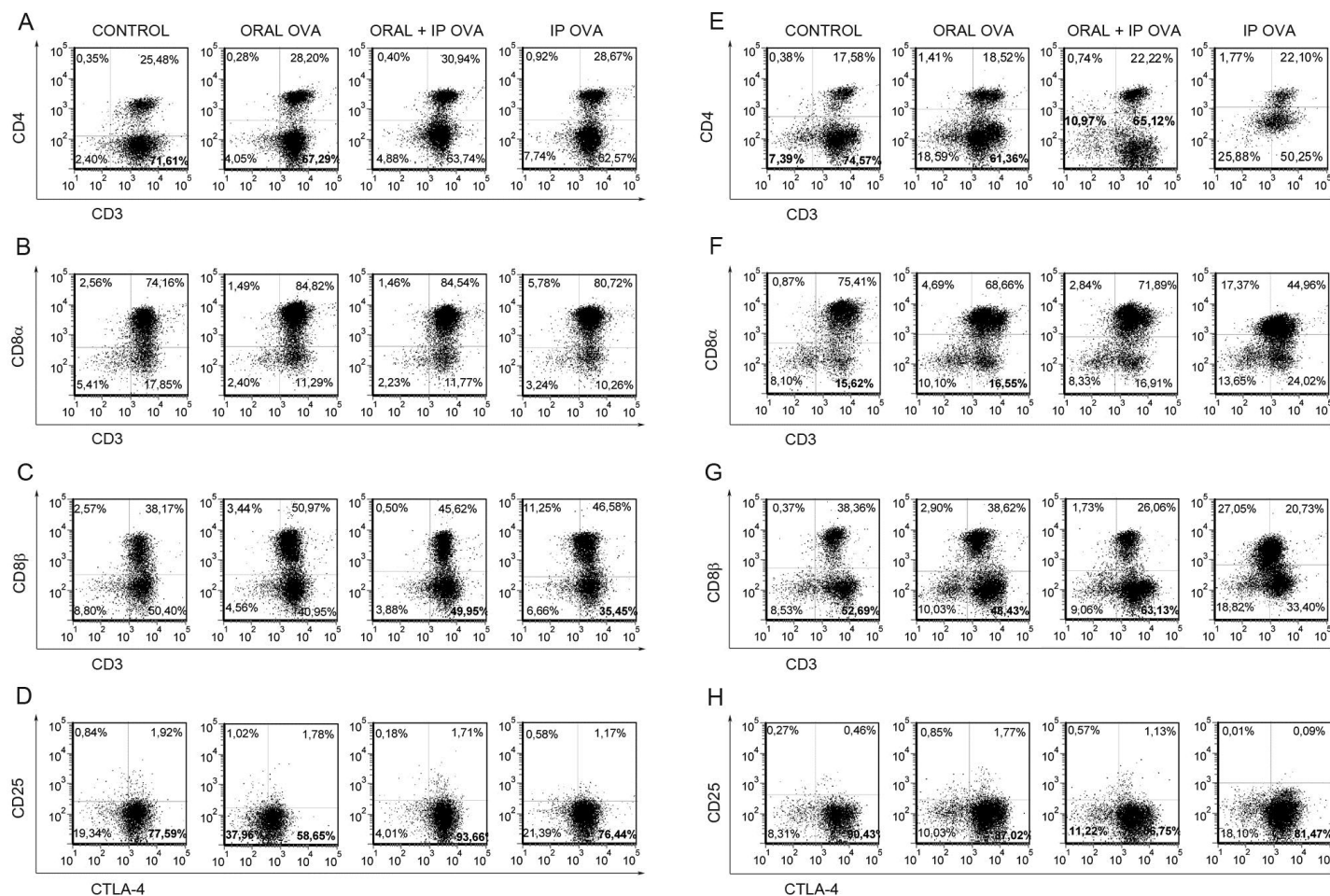


Figura 6.6. Avaliação das subpopulações de IELs CD4⁺, CD8α⁺, CD8β⁺ e CD25⁺/CTLA-4⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10 após os diferentes tratamentos com OVA. IELs foram isolados do intestino delgado dos camundongos BALB/c (Painéis de A-D) e DO11.10 (Painéis de E-H) e as frequências de células TCD4, TCD8α, TCD8β e TCD25/CTLA-4 foram analisadas por citometria de fluxo em sistema de tripla marcação, em comparação com os respectivos controles isotípicos. As análises foram conduzidas no FACSaria e aplicação do software FCS Express V3. As frequências das subpopulações estão apresentadas dentro dos quadrantes (N=5).

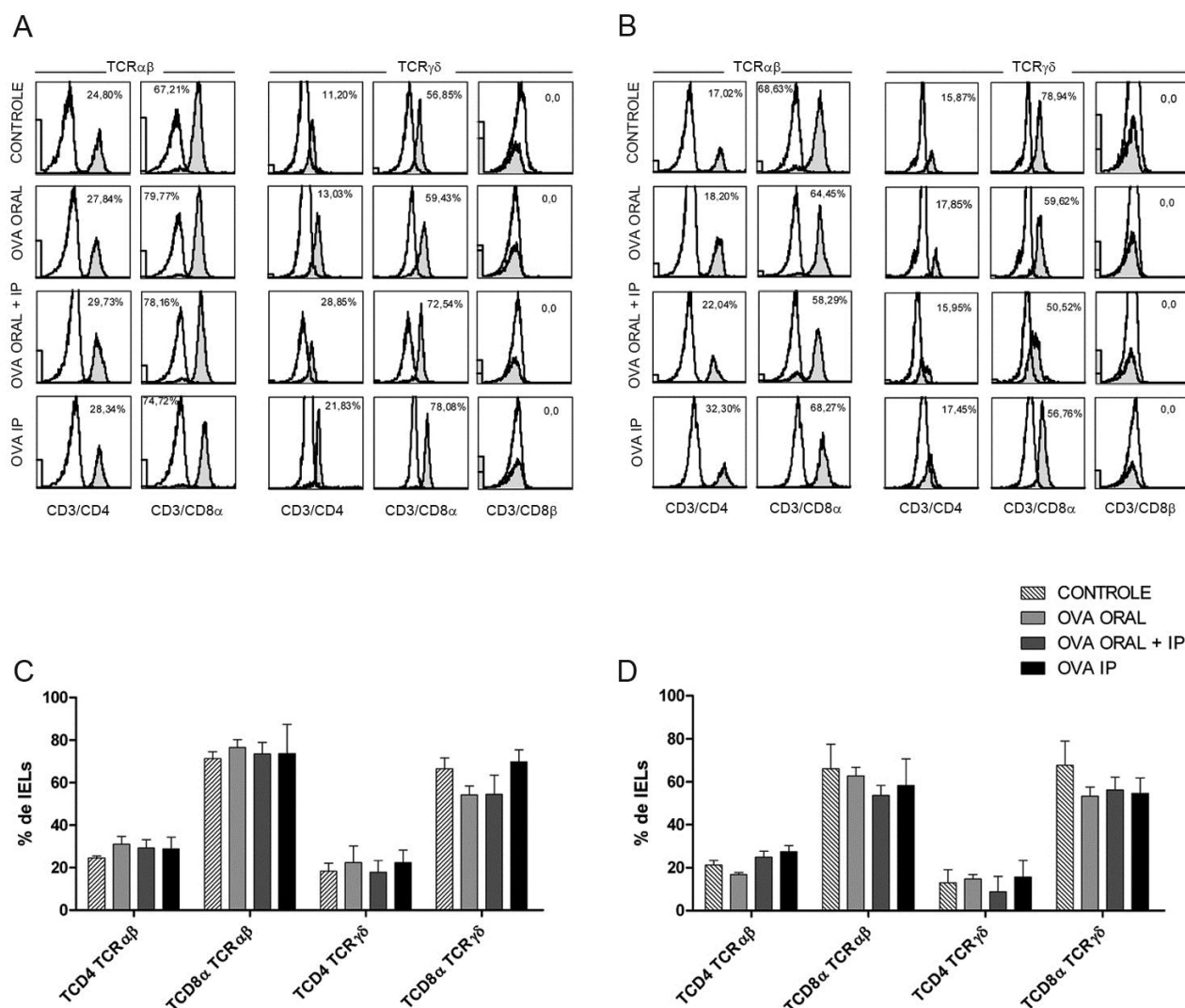


Figura 6.7. Frequência de linfócitos portadores de TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os diferentes tratamentos com OVA. A frequência de células expressando TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$ entre os IELs isolados do intestino delgado dos camundongos BALB/c (Painel A) e de camundongos DO11.10 (Painel B) foi avaliada por citometria de fluxo, dentro das subpopulações CD4 $^{+}$, CD8 α^{+} , CD8 β^{+} . Os histogramas em branco indicam os resultados obtidos com os controles isotípicos. As porcentagens de cada subpopulação estão apresentadas dentro dos histogramas. As análises estatísticas dos resultados encontrados em três experimentos independentes estão ilustradas nos Painéis C (BALB/c) e D (DO11.10) e representam a média das porcentagens celulares \pm E.P.M. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA (N= 5).

6.4.2 Frequência de IELs CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD103

Como é possível observar na **Figura 6.8**, a administração de OVA por via oral seguida pelo desafio parenteral resultou em elevação significativa da frequência de IELs expressando CD103 entre as células CD4⁺, tanto em camundongos BALB/c como DO1110 (**Figura 6.8, Painéis A, B e C**) sem, contudo, alterar o nível de expressão de CD103 nessa subpopulação (**Figura 6.8, Painele D**). Por outro lado, a expressão de CD103 aumentou significativamente nas subpopulações de IELs CD8 α ⁺ e CD8 β ⁺ dos camundongos BALB/c tratados com OVA por quaisquer das vias de administração (**Figura 6.8, Painéis F, H**). Todavia, IELs CD8 α ⁺ isolados de camundongos DO11.10 imunizados com OVA por via ip mostraram redução significativa na expressão da molécula CD103 em relação ao grupo controle (**Figura 6.8, Painele F**).

6.4.3 Frequência de IELs CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD25

Como ilustrado na **Figura 9**, células CD25⁺ estavam presentes em baixa frequência entre os IELs CD4⁺ (0,4%) e CD8 β ⁺ e (0,6%) isolados do intestino delgado de camundongos naïve da linhagem BALB/c (**Figura 6.9, Painele A**) e em IELs CD8 α ⁺ (0,4%) isolados de camundongos naïve da linhagem DO11.10 (**Figura 6.9, Painele B**). Após os tratamentos com OVA pelas vias oral e/ou ip, as frequências de células CD25⁺ se elevaram, mas não significativamente, tanto em IELs isoladas tanto de camundongos BALB/c como DO11.10 (**Figura 6.9, Painéis C, E, G**). Apenas a

expressão de CD25 em IELs CD8 β ⁺ obtidas de camundongos DO11.10 imunizados com OVA por via ip se elevou significativamente (**Figura 6.9, Painel H**).

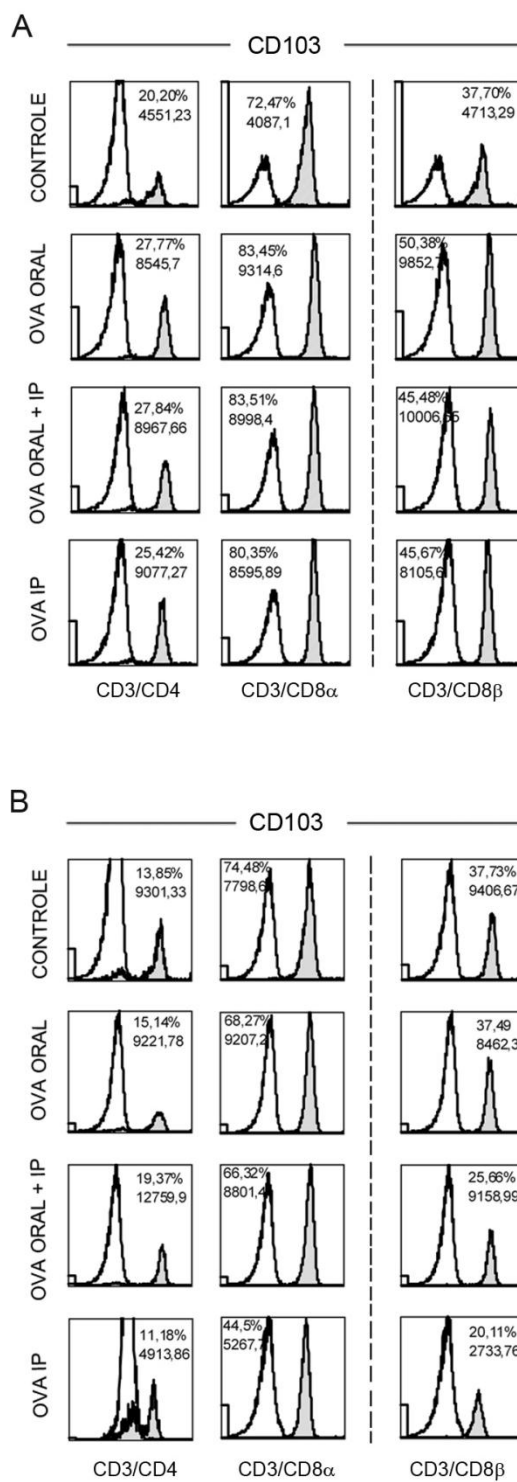


Figura 6.8 (continua)

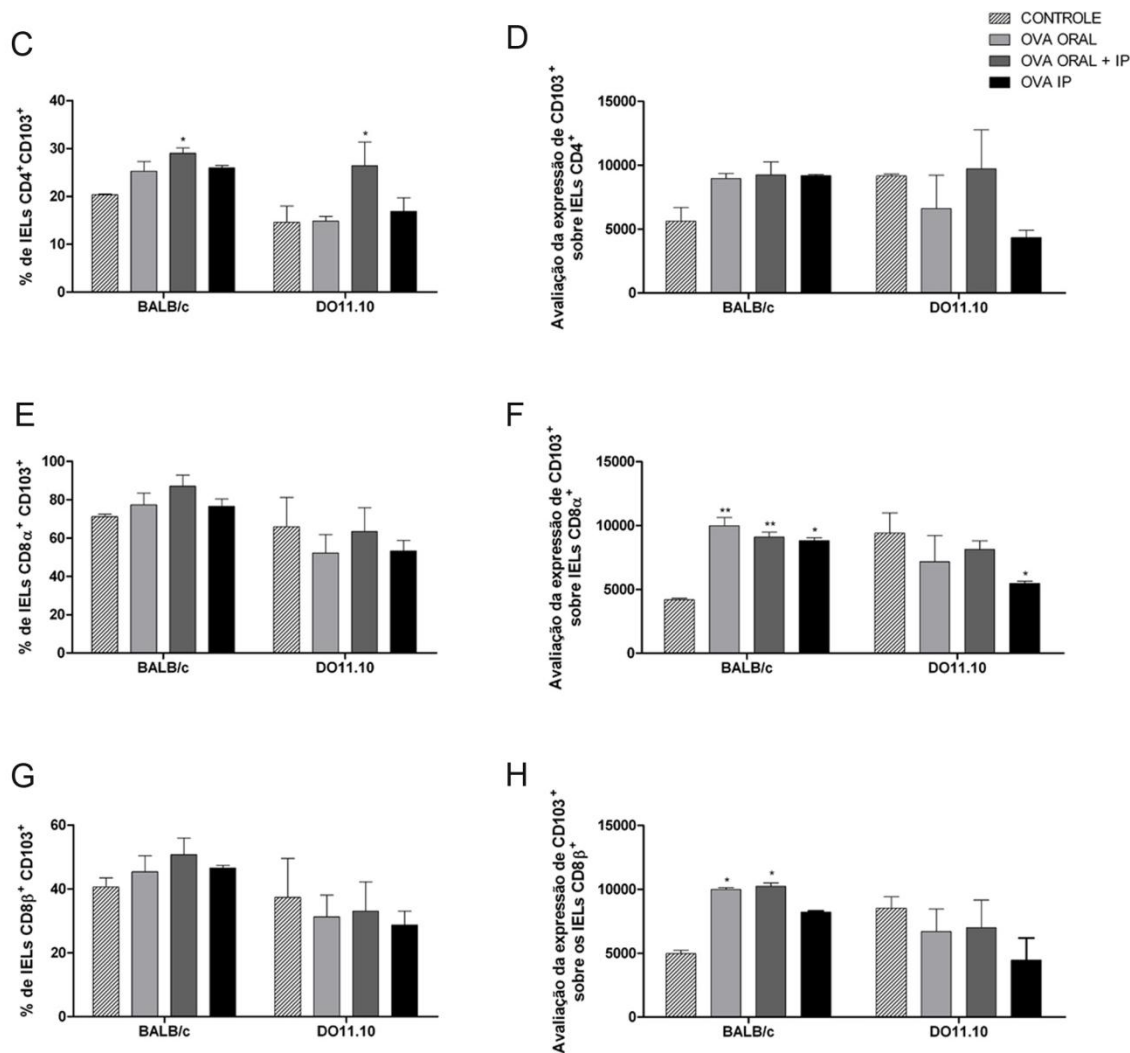


Figura 6.8. Frequência de células CD103⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os tratamentos com OVA. A frequência de células expressando a integrina CD103 entre os IELs isolados do intestino delgado dos camundongos BALB/c (Painel A) e DO11.10 (Painel B) foi avaliada por citometria de fluxo, dentro das subpopulações CD4⁺, CD8α⁺, CD8β⁺. Os histogramas em branco ilustram os resultados obtidos com os controles isotípicos. As porcentagens de cada subpopulação estão apresentadas dentro dos histogramas. Os gráficos de barras ilustram as análises estatísticas das frequências de células expressando CD103 (Painéis C, E, G) e de intensidade fluorescência para CD103 (Painéis D, F, H) realizadas com dados de três experimentos independentes. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA utilizando-se o teste a posteriori de Bonferroni. (*) indicam os valores de $p \leq 0,05$ e (**) $p \leq 0,01$ (N=5).

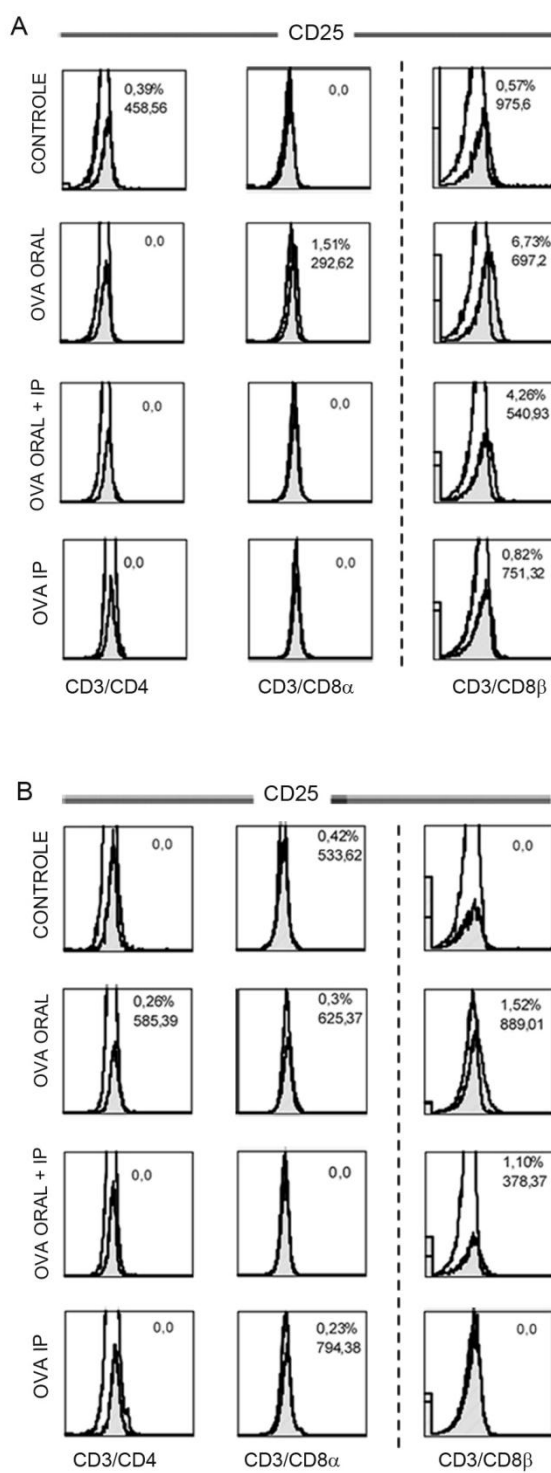


Figura 6.9 (continua)

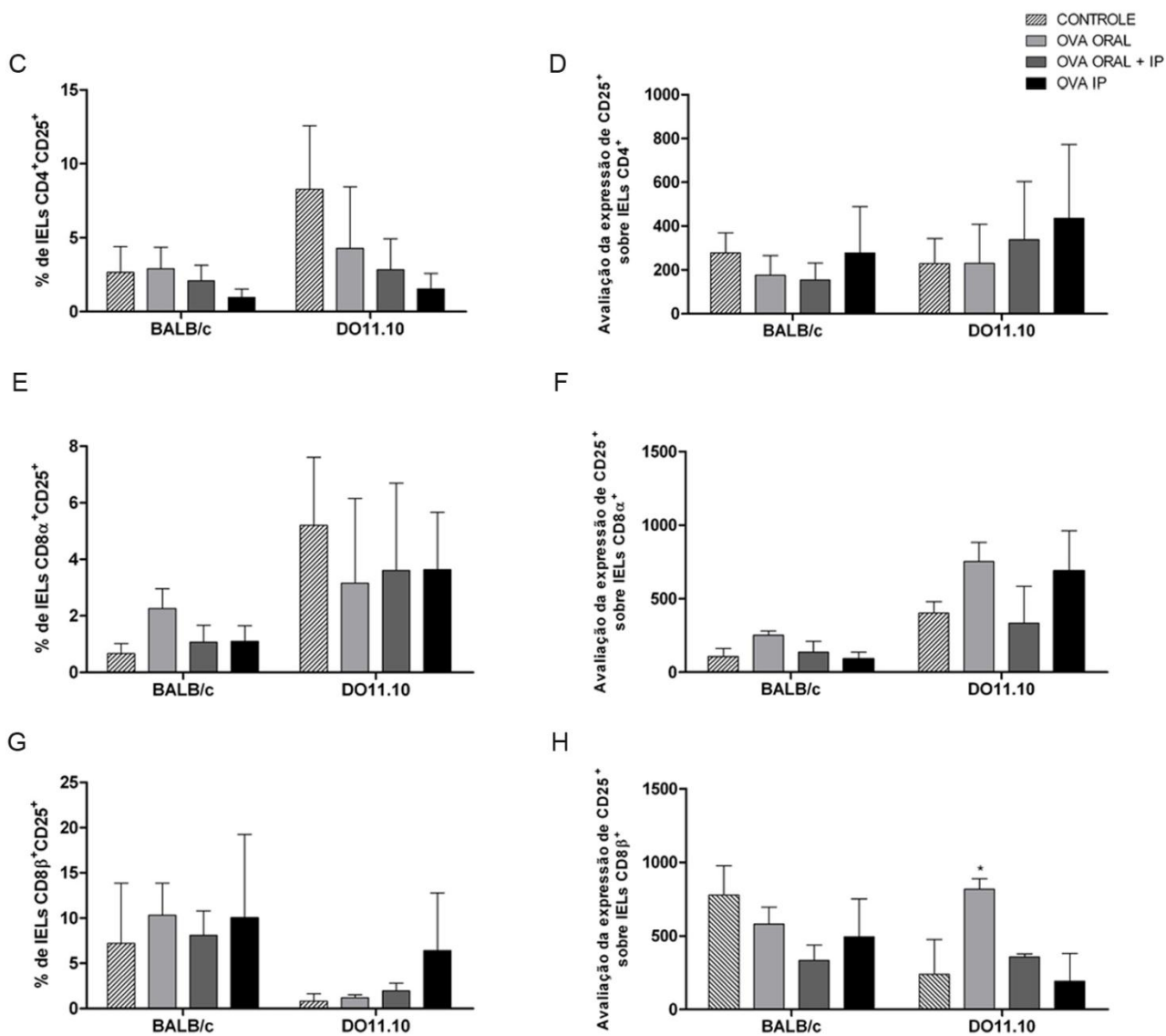


Figura 6.9. Frequência de células CD25⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os tratamentos com OVA. A frequência de células CD25⁺ entre os IELs isolados do intestino delgado dos camundongos BALB/c (Painel A) e DO11.10 (Painel B) foi avaliada por citometria de fluxo dentro das subpopulações CD4⁺, CD8α⁺ e CD8β⁺. Os histogramas em branco ilustram os resultados obtidos com os controles isotípicos. As porcentagens de cada subpopulação estão apresentadas dentro dos histogramas. Os gráficos de barras ilustram as análises estatísticas das frequências de células expressando CD25 (Painéis C, E, G) e de intensidade fluorecência para CD25 (Painéis D, F, H) realizadas com dados de três experimentos independentes. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA utilizando-se o teste a posteriori de Bonferroni. (*) indicam os valores de $p \leq 0,05$ (N=5).

6.4.4 Frequência de IELs CD4⁺, CD8⁺ e CD25⁺ expressando a molécula Foxp3, após o tratamento com a proteína ovalbumina

A **Figura 6.10** ilustra as frequências de células Foxp3⁺ entre as subpopulações de IELS CD4⁺, CD8 α ⁺, CD8 β ⁺ e CD25⁺ isoladas de camundongos BALB/c (**Figura 6.10, Painel A**) e DO11.10 (**Figura 6.10, Painel B**), naïve ou tratados com OVA por via oral e/ou ip. Em IELs de camundongos BALB/c, as análises estatísticas mostraram que a frequência de células Foxp3⁺ aumentou significativamente entre os IELs CD4⁺ e CD8 β ⁺ isoladas dos animais alimentados com OVA (**Figura 6.10, Painéis C, F**). Por outro lado, a imunização parenteral de camundongos BALB/c elevou a frequência de células Foxp3⁺ em IELs CD25⁺, CD8 α ⁺, CD8 β ⁺ (**Figura 6.10, Painel D-F**). Em IELs de camundongos DO11.10, observou-se aumento na frequência de células Foxp3⁺ na subpopulação CD25⁺ e apenas em células coletadas de animais tratados com OVA por via oral seguida pelo desafio parenteral (**Figura 6.10, Painel E**).

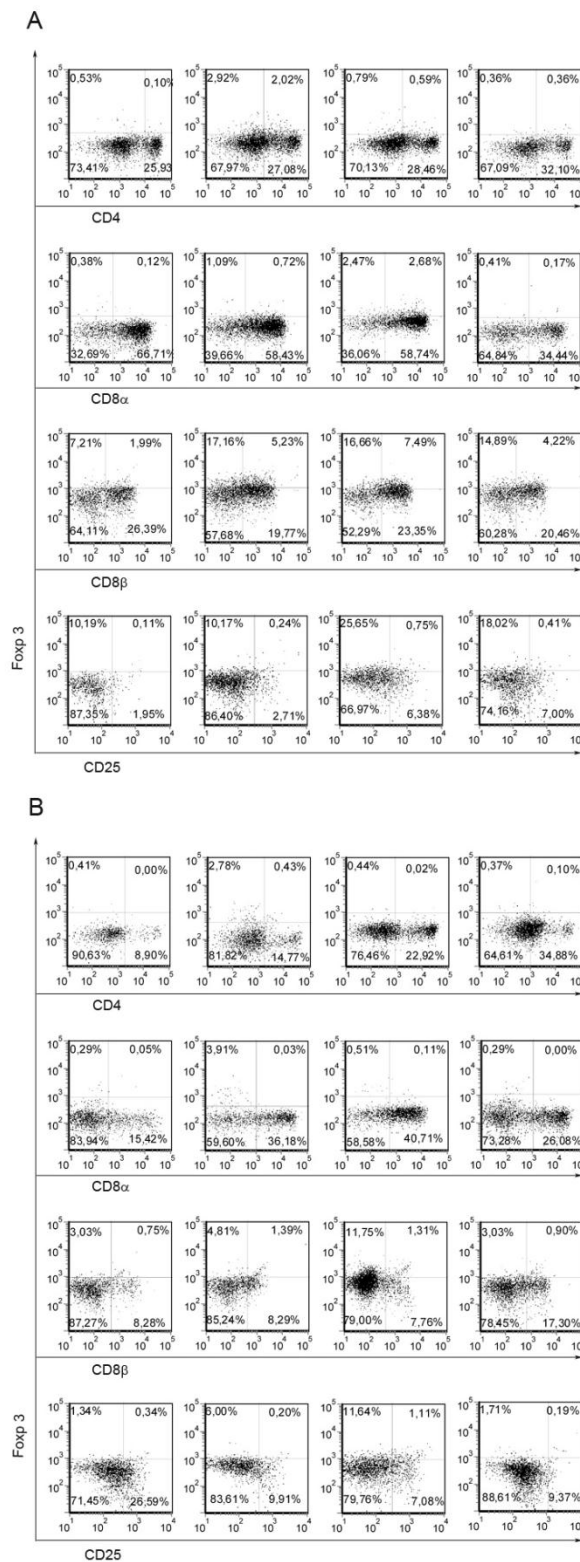


Figura 6.10 (Continua)

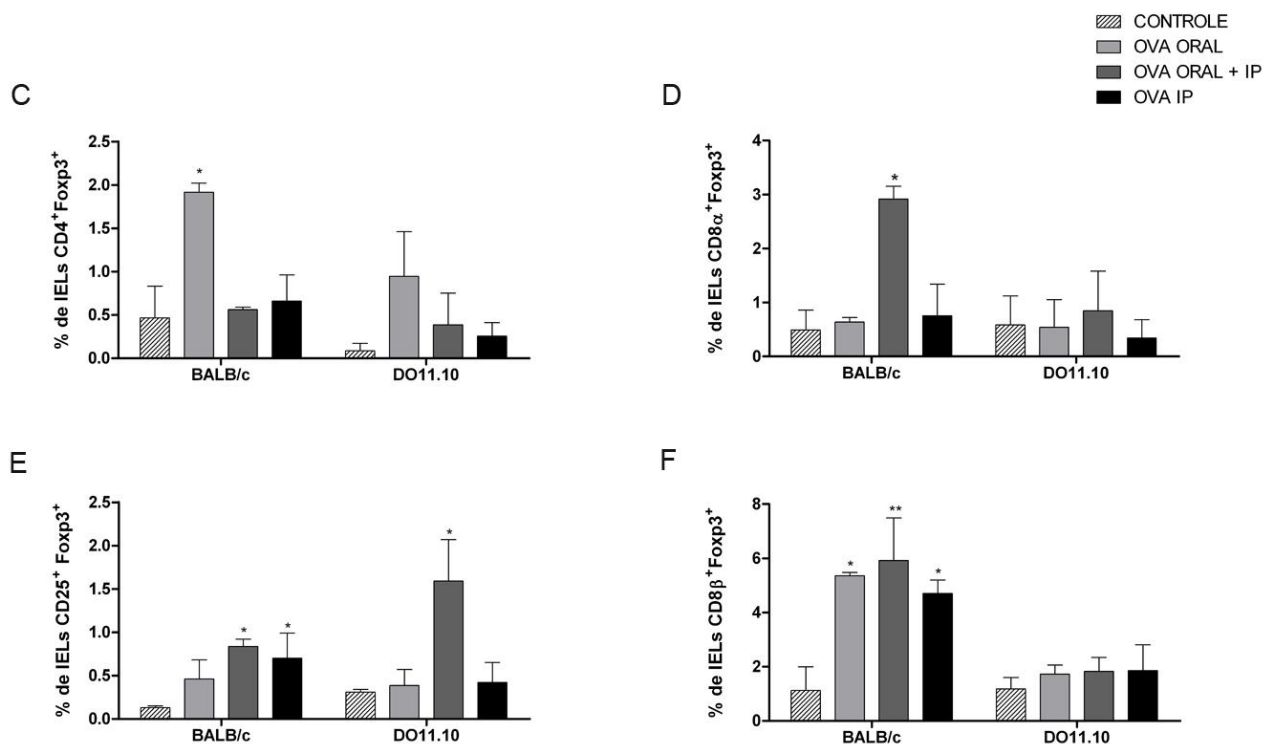


Figura 6.10. Frequência de células Foxp3⁺ no intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após os tratamentos com OVA. A frequência de células expressando Foxp3 entre os IELs isolados do intestino delgado dos camundongos BALB/c (Painel A) e DO11.10 (Painel B) foi avaliada por citometria de fluxo, dentro das subpopulações CD4⁺, CD8α⁺, CD8β⁺ e CD25⁺. As frequências das subpopulações estão apresentadas dentro dos quadrantes. Os gráficos de barras ilustram as análises estatísticas das frequências de células expressando Foxp3 realizadas com dados de três experimentos independentes. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA utilizando-se o teste a posteriori de Bonferroni. (*) e (**) indicam os valores de $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente (N=5).

6.5 Expressão de citocinas em IELs, após os tratamentos com ovalbumina

A expressão de RNA mensageiro (mRNA) para as citocinas pro- (IL-2, IFN- γ e IL-6, IL-17, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e TGF- β) foi quantificada através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), em amostras de RNA extraídas de *pools* de IELs isolados de camundongos BALB/c e DO11.10, tratados com OVA por via oral e/ou ip. Os resultados obtidos em três experimentos independentes estão resumidos na **Figura 6.11**, na qual é possível observar que IELs de camundongos BALB/c e DO11.10 tratados com OVA apresentam perfis distintos em relação à expressão gênica de citocinas.

Em diferentes níveis a depender do tratamento com OVA, IELs de camundongos BALB/c expressaram mRNA de todas as citocinas analisadas. Em nenhuma circunstância, IELs de camundongos DO11.10 expressaram mRNA das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10 (**Figura 6.11, Painéis A, B, E**).

IELs de camundongos BALB/c tolerantes à OVA pela ingestão da proteína, seguida ou não pelo desafio parenteral, apresentaram níveis de mRNA inferiores de todas as citocinas examinadas na comparação com os exibidos pelos IELs isolados de camundongos imunizados por via ip. Tais diferenças, no entanto, só foram significativas para as citocinas IL-10, IFN- γ , TGF- β e TNF- α (**Figura 6.11, Painéis E-H**).

Por outro lado, os IELs obtidos de camundongos DO11.10 que receberam OVA por via oral e/ou ip mostraram níveis de citocinas mais elevados do que os exibidos por

IELs tratados com OVA apenas por via oral. Tais diferenças, no entanto, só foram significativas para as citocinas IFN- γ , TGF- β e TNF- α de IELs provenientes dos transgênicos que receberam OVA por via oral+ip (**Figura 6.11, Painéis F-H**).

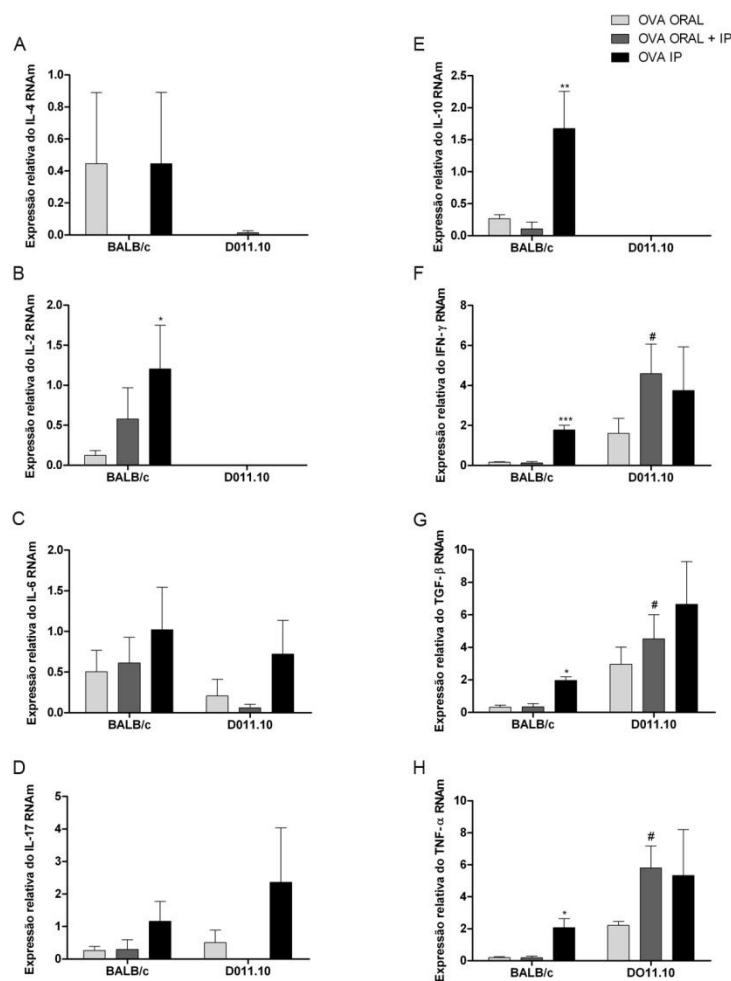


Figura 6.11. Análise quantitativa da expressão das citocinas em IELs do intestino delgado de camundongos BALB/c e DO11.10, após tratamentos com OVA. RNA total foi extraído de IELs de camundongos BALB/c e DO11.10 tratados com OVA por via oral e/ou ip, usando-se o kit reagente PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen). As transcrições reversas (cDNA) foram feitas usando-se os reagentes do kit SuperScript III First-Strand Syntesis Supermix (Invitrogen), com hexâmeros randômicos. A detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α e TGF- β foi feita usando-se as sequências iniciadoras adquiridas como Inventoried Assays (sequências iniciadoras pré definidas e pré fabricadas) e a sonda TaqMan Master Mix (Applied Biosystems). Os ensaios da reação em cadeia da polimerase em tempo real foram realizados em quadruplicatas no equipamento ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). A sequência iniciadora de RNA ribossomal 18S foi usada como controle endógeno. A expressão relativa de RNA mensageiro foi calculada usando o método comparativo 2^{-ΔΔC(T)}. Para normalização, foi atribuído o valor arbitrário de 1 aos RNAs de IELs dos grupos controles. As análises representam a média dos valores relativos de mRNA \pm E.P.M. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas através do teste One-way ANOVA, utilizando-se o teste a posteriori de Bonferroni. (*), (**) e (***) indicam os valores de $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. (#) $p \leq 0,05$ indica a diferença entre camundongos DO11.10 e BALB/c para o mesmo tratamento. (N=5).

7. DISCUSSÃO

A tolerância sistêmica para antígenos administrados oralmente é conhecida de longa data, mas os mecanismos envolvidos nesse fenômeno ainda são objeto de intensa investigação. Embora os requisitos necessários ao estabelecimento de tolerância oral para uma grande variedade de antígenos tenham sido demonstrados em modelos animais (FARIA & WEINER, 2005), os estudos em humanos mostram resultados controversos, tanto em relação às características do antígeno como ao tipo de imunidade envolvida, se celular ou humoral (HUSBY et al., 1994; KRAUS et al., 2004).

Embora a tolerância a antígenos da dieta seja a regra, eventuais falhas em sua indução podem ocorrer tanto em humanos quanto em animais de laboratório, com consequências deletérias para o hospedeiro. Tais falhas de tolerância parecem estar associadas com alterações na permeabilidade da mucosa gastrointestinal e, principalmente, com alterações de imunorregulação nesse ambiente (HUSBY et al., 1994; KRAUS et al., 2004; KUGATHASAN et al., 2007; SAURER & MUELLER, 2009). Falhas na tolerância também podem estar relacionadas com o tipo de antígeno envolvido, sua pureza e quantidade liberada, ou ainda com a forma pela qual o antígeno é apresentado ao sistema imune nas mucosas. Misturas heterogêneas de antígenos são menos efetivas em induzir tolerância oral do que antígenos purificados (MESTECKY et al., 2007).

Além das características associadas ao antígeno, a susceptibilidade à tolerância oral depende do background genético e da idade do hospedeiro humano ou animal (FARIA & WEINER, 2005). Resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório mostraram que mesmo camundongos de background genético muito semelhante, como

o BALB/c e o transgênico DO11.10, podem diferir entre si na resposta imune à OVA administrada por via oral. Enquanto camundongos selvagens BALB/c tornaram-se tolerantes ao desafio com OVA após o consumo da proteína por um período relativamente curto (uma semana, na água de beber), o mesmo tratamento induz uma resposta imune humoral sistêmica nos camundongos transgênicos DO11.10, caracterizada por elevação significativa dos níveis inicialmente baixos de anticorpos específicos ao antígeno (SIMIONI et al., 2004).

No presente estudo, investigamos as características da mucosa intestinal de camundongos BALB/c e DO11.10 antes e após a ingestão de OVA, com ênfase no perfil dos linfócitos intraepiteliais, que pudessem explicar os resultados previamente observados. Inicialmente, notamos que os camundongos DO11.10 apresentavam alterações morfológicas nos vilos intestinais e na camada muscular da mucosa antes mesmo do tratamento oral com a proteína. Entre as alterações mais importantes observadas destacam-se a desorganização da camada epitelial, com redução do número de enterócitos e IELs. Em sua maioria, os IELs são células com atividade citolítica, capazes de eliminar enterócitos infectados por patógenos intracelulares, promovendo assim a rápida restauração da integridade do epitélio. O reduzido número de IELs presente no intestino delgado do camundongo transgênico pode ser a causa primária das alterações estruturais observadas. Como consequência, alterações de permeabilidade local a macromoléculas e microorganismos podem gerar um processo inflamatório crônico que torna o camundongo DO11.10 incapaz de montar uma resposta imune de tolerância a antígenos da dieta. De fato, os tratamentos com OVA levaram ao aprofundamento das alterações no epitélio mucoso do intestino delgado de

camundongos DO11.10, condizentes com um processo inflamatório. Tais alterações não foram observadas no epitélio intestinal de camundongos BALB/c, que se apresentavam bem preservados após a ingestão de OVA.

Dados de literatura mostraram que a administração oral de OVA em camundongos DO11.10 leva a uma resposta imunológica de padrão TH2, com produção de IgE detectável tanto no soro como na superfície de mastócitos presentes na lâmina própria. A administração de OVA a esses camundongos resultou em degranulação de mastócitos e acúmulo de eosinófilos na lâmina própria, que foram responsabilizados pela inflamação observada nos vilos do epitélio do intestino delgado (NAKAJIMA-ADACHI et al., 2006). Resultados anteriores do nosso laboratório, no entanto, mostraram que os camundongos DO11.10 alimentados com OVA produzem resposta imune de padrão misto TH1/TH2 e, conseqüentemente, outros mecanismos podem estar envolvidos na inflamação observada após a ingestão de OVA (SIMIONI et al., 2004). WESTENDORF e colaboradores (2005) também reportaram que camundongos duplo-transgênicos para hemaglutinina do vírus influenza A (HA) e para o TCR específico (TCR-HA) apresentam processo inflamatório crônico, com infiltração linfocitária na lâmina própria e aumento de IELs no epitélio intestinal. Esse processo, no entanto, é mantido sob controle pela geração de células T reguladoras.

Diversos estudos mostraram que a deleção de linfócitos autoreativos constitui um dos principais mecanismos de indução de tolerância central e periférica (LIU & LEFRANÇOIS, 2004; LEE et al., 2007; MAGNUSSON et al., 2008). Falhas na apoptose de linfócitos autoreativos na mucosa intestinal se correlacionam com a inflamação intestinal observada na doença celíaca (DI SABATINO et al., 2001; LIU &

LEFRANÇOIS, 2004; LEE et al., 2007, MAGNUSSON et al., 2008). O papel da deleção de células T antígeno-específicas no estabelecimento da tolerância oral, no entanto, não está claramente definido (DUBOIS et al., 2005).

Dados de literatura mostraram que a inoculação parenteral de camundongos DO11.10 com OVA nativa ou com o fragmento peptídico OVA323-339 resulta em extensa deleção no timo de células T portadoras de TCR anti-OVA323-339, células do clonotipo detectado pelo anticorpo monoclonal K1-J26 (MURPHY et al., 1990). Em nossos estudos anteriores, mostramos que a administração oral de OVA também resultava em redução significativa do clonotipo K1-J26 no baço e sangue periférico dos camundongos DO11.10 que, no entanto, não impedia a montagem de resposta imune humoral e celular específica (SIMIONI et al., 2004).

Uma das hipóteses iniciais do nosso estudo era que a resistência à indução de tolerância oral à OVA nos camundongos DO11.10 fosse decorrente de uma falha na deleção de IELs K1-J26⁺ na mucosa intestinal após a ingestão do antígeno. Observamos, no entanto, que o tratamento com OVA por via oral e/ou ip resultou em acentuada redução no número total de IELs, particularmente IELs KJ1-26⁺, isolados de camundongos transgênicos.

Dados de literatura mostraram que parte substancial dos IELs e dos linfócitos T presentes na lâmina própria dos camundongos DO11.10 portam um segundo TCR não clonotípico, provavelmente, devido a exclusão alélica incompleta dos TCR α endógenos durante o processo de rearranjo no timo, e parte dos TCR alternativos no transgênico DO11.10 parece ser dirigida a antígenos do ambiente intestinal. (HURST et al., 1997;

LIU & LEFRANÇOIS, 2004). Corroborando, camundongos DO11.10/SCID ou DO11.10/RAG2^{-/-} não apresentam reatividade a antígenos da microbiota intestinal (SAPAROV et al., 1999; ZHOU et al., 2004). Desta forma, uma possível explicação para o escape de camundongos DO11.10 à tolerância oral, a despeito da ocorrência de deleção de células TCR OVA-específicas, seria a ativação de IELs portadores de TCRs alternativos por antígenos cognatos presente no ambiente intestinal. Tal ativação resultaria em resposta inflamatória crônica na mucosa, com eventual ativação de linfócitos T não transgênicos, portadores de TCR para outros epitopos da OVA.

Outra possível explicação para a resposta imune após desafio com OVA no transgênico que ingeriu previamente a proteína seria a ausência de um processo de supressão eficiente por células T reguladoras. Os IELs se assemelham às células efetoras e de memória efetora de outros órgãos linfóides periféricos (CHEROUTRE & MADAKAMUTIL, 2004), apresentando alta expressão do marcador CD103 ($\alpha_E\beta_7$) uma α integrina cuja ligação à E-caderina expressa pelas células epiteliais é responsável pela retenção dos IELs no epitélio intestinal (PARKER et al., 1992). Um subgrupo de células dendríticas CD103⁺ da mucosa intestinal parece estar envolvido com o tropismo de linfócitos T CD8 efetores CCR9⁺ e $\alpha_4\beta_7$ ⁺ para a mucosa intestinal (JOHANSSON-LIMDBOM et al., 2005). A expressão da molécula CD103, tanto por linfócitos TCD4⁺ e/ou TCD8⁺ como por células dendríticas, vem sendo associada com a regulação da resposta imune que ocorre nas mucosas (LEHMANN et al., 2002; HO et al., 2008) quanto de (ANNACKER et al., 2005; COOMBES et al., 2007; SIDDIQUI & POWRIE, 2008).

No presente trabalho, observamos aumento significativo na frequência de células CD103⁺, bem como na sua expressão, em todas as subpopulações de IELs (TCD4, TCD8 α e TCD8 β) isolados do intestino delgado de camundongos BALB/c tratados com OVA por via oral e/ou parenteral. Por outro lado, IELs de camundongos DO11.10 imunizados por via oral+ip apresentaram alterações na frequência de CD103 apenas na população de linfócitos T CD4⁺. Além disso, IELs dos camundongos transgênicos imunizados com OVA por via parenteral mostraram acentuada redução na expressão de CD103 na subpopulação TCD8 α .

Diversas populações de T células reguladoras têm sido descritas na tolerância oral, incluindo células produtoras de IL-10 denominadas de Tr1, células produtoras de TGF- β denominadas Th3 e células TCD4⁺/CD25⁺ (MOWAT, 2003; PICCIRILLO & SHEVACH, 2004; DUBOIS et al., 2005). A importância relativa de cada uma dessas populações no estabelecimento da tolerância oral ainda vem sendo estudada (MOTTET & GOLSHAYAN, 2007; SAURER & MUELLER, 2009). Mas há consenso na literatura que a tolerância oral se relaciona diretamente com ativação de células T reguladoras pelo antígeno específico ou por apresentação cruzada de antígenos provenientes dos enterócitos (SAURER & MUELLER, 2009; LIU & LEFRANÇOIS, 2004; LEE et al., 2007; RIMOLDI et al., 2005; HUIBREGTSE et al., 2007). Em IELs de camundongos BALB/c alimentados com OVA, observamos aumento significativo na frequência de células Foxp3⁺ nos subgrupos TCD4⁺, TCD8 α ⁺, TCD8 β ⁺ e TCD25⁺, indicando que o estabelecimento da tolerância nesses animais parece estar diretamente associado com o aumento de IELs reguladoras. Por outro lado, em IELs de camundongos transgênicos

DO11.10 somente no subgrupo CD25⁺ tratados com OVA por via oral+ip se observou aumento significativo de células Foxp3⁺. Tal aumento, porém, foi insuficiente para inibir a inflamação na mucosa do intestino delgado dos camundongos transgênicos, que se acentuou após os tratamentos com a proteína.

Dada a extensão abrangida pelas superfícies mucosas, particularmente, a do intestino delgado, os IELs compreendem uma considerável fração dos linfócitos presentes no organismo. Cerca de 1×10^9 IELs podem ser encontrados dispersos entre as células do epitélio do intestino delgado humano (HAYDAY, 2003). Os linfócitos T CD8 representam 70-80% dos IELs intestinais e sua reatividade aos antígenos endógenos da microbiota local é a principal responsável pelo fenótipo de células de memória efetora apresentado por essas células (MASOPUST et al., 2006). Os IELs CD8⁺ apresentam um papel importante na manutenção da homeostase do epitélio intestinal e as células TCD8 $\alpha\beta$ supressoras têm sido correlacionadas com o estabelecimento da tolerância oral antígeno específica (FEINBERG & SILVESTRI, 2002; WESTENDORF et al., 2006). Conforme destacado acima, observamos que a ingestão de OVA por camundongos BALB/c leva a um aumento na frequência de células reguladoras Foxp3⁺ nas subpopulações de IEL TCD8 $\alpha\beta$. O mesmo não foi observado em IELs TCD8 $\alpha\beta$ de camundongos DO11.10.

A redução de moléculas co-estimuladoras CD28 e CD40L também tem sido relacionada com a redução de respostas na tolerância oral (KRUMMEL & ALLISON, 1995; HAASE et al., 2004; CHUNG et al., 2004; GRACA et al., 2003). No nosso trabalho, no entanto, não foram observadas alterações na frequência e/ou expressão

dessas moléculas em quaisquer dos tratamentos com OVA, tanto em BALB/c como em camundongos DO11.10 (dados não mostrados).

Alguns estudos também ressaltam o papel dos IELs $CD8\alpha\alpha^+$ na imunorregulação que ocorre na mucosa intestinal (POUSSIER et al., 2002, MAKITA et al., 2003). Em nosso trabalho, também pudemos observar elevação significativa na frequência de IELs $Foxp3^+$ nas células $TCD8\alpha\alpha^+$ de camundongos BALB/c alimentados com OVA e depois desafiados com o antígeno por via ip, mas não em IELs de camundongos DO11.10 tratados da mesma forma.

Devido à exposição do epitélio mucoso a uma enorme quantidade antígenos estranhos, as citocinas $IFN-\gamma$ e IL-4 são regularmente produzidas pelos IELs (CAROL et al., 1998). Em IELs de camundongos BALB/c tolerantes à OVA (animais que ingeriram OVA e depois foram desafiados com a proteína por via ip), observamos uma expressão mais reduzida de mRNAs das citocinas IL-2, IL-10,, $IFN-\gamma$, $TGF-\beta$ e $TNF-\alpha$ do que em IELs de BALB/c imunizados apenas por via ip. Os níveis de mRNAs para IL-17 e IL-6 também se encontravam bastante reduzidos, embora a alteração não tenha sido estatisticamente significativa. Ao contrário, IELs de camundongos transgênicos tratados com OVA por via oral+ip apresentavam síntese de RNAm das citocinas IL-6, $IFN-\gamma$, $TGF-\beta$ e $TNF-\alpha$ em níveis similares ou mais elevados do que os animais imunizados apenas por via ip.

Citocinas pró e anti-inflamatórias são muitas vezes componentes de mesma resposta imunológica de modo que, além de combater a infecção, o organismo possa evitar o dano tecidual causado pela resposta imune. Dessa forma, as citocinas IL-10 e

TGF- β sempre foram relacionadas com reações anti-inflamatórias (O'GARRA et al., 2004; DUBOIS et al., 2005, ANDO et al., 2007; LI et al., 2007; SAURER & MUELLER, 2009). Mais recentemente, porém, essas citocinas vêm sendo associadas a reações inflamatórias pela ativação das vias de diferenciação de células Th17 (WYNN, 2005; LI et al., 2007).

Células TCD4⁺ que secretam IL-17, denominadas células Th17, estão presentes em processos inflamatórios diversos e sua expansão ocorre em resposta às citocinas IL-6, TGF-beta, IL-21, IL-1 e IL-23. (WYNN et al., 2005; SUTTON et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado que a mucosa intestinal contém número significativo de células TCD4⁺ produtoras de IL-17. Embora as células Th17 sejam importantes no estabelecimento de uma resposta imune protetora contra bactérias intestinais patogênicas (HONDA & TAKEDA, 2009; MANGAN et al., 2006), no ambiente das mucosas e na presença das citocinas IL-6 e/ou IL-23 elas também estão envolvidas no agravamento de doenças inflamatórias autoimunes e no desenvolvimento de desordens imunológicas (MANGAN et al., 2006; KITANI & XU, 2008; HONDA & TAKEDA, 2009). Corroborando, a inibição da via de sinalização da IL-6 pela administração de anticorpo monoclonal anti-IL-6R foi capaz de inibir a diferenciação de células Th17 e a inflamação mediada por células T CD4 em modelo experimental de colite sem, contudo, afetar o número de células T reguladoras Foxp3+CD25+ *in vivo* (NOGUCHI et al., 2007).

Apesar dos níveis naturalmente mais elevados de RNAm das citocinas IL-6, TGF- β and TNF- α em IELs dos camundongos DO11.10, comparados aos de IELS de camundongos BALB/c, não observamos alteração significativa na expressão de RNAm

para a citocina IL-17 após a administração de OVA por via oral e/ou ip em ambos os camundongos estudados.

Recentemente, demonstrou-se que células TCD8 podem suprimir respostas Th1 e Th17, mas não TH2, em modelo de tolerância oral à OVA (ARNABOLDI et al., 2009). Desta forma, o aumento que observamos na frequência de células $CD8\alpha\beta^+Foxp3^+$ em IELs isolados de camundongos BALB/c tratados com OVA poderia explicar a ausência ou a reduzida expressão das citocinas IL-6, TGF- β , IFN- γ e TNF- α nesses animais.

Embora trabalhos recentes indiquem que o desequilíbrio entre as células Th17/Treg talvez seja mais importante do que o desequilíbrio Th1/Th2 nas patologias autoimunes de natureza inflamatória (MCGEACHY & CUA, 2007; KITANI & XU, 2008), as respostas imunes do tipo Th1 são consideradas mediadoras primárias da maioria das doenças autoimunes e de doenças inflamatórias crônicas. Respostas imunes no ambiente das mucosas com predomínio de citocinas de padrão Th1 podem levar a diversas patologias como a doença de Crohn (“ulcerative colitis and Crohn's disease”) e gastrites induzidas por *Helicobacter pylori* (FORCHIELLI & WALKER, 2005). Estudos recentes têm mostrado que as doenças inflamatórias do intestino, como a colite ulcerativa que se observa na doença de Crohn, podem estar relacionadas com a perda da tolerância a antígenos próprios ou da microbiota normal (MAUL & DUCHMANN, 2008; BOIRIVANT et al, 2008). Da mesma forma, a doença celíaca se correlaciona com a perda da tolerância a antígeno da dieta, dependente de HLA (DE PAOLO et al., 2011).

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que a expressão elevada de RNAm para citocinas pro-inflamatórias em IELs dos camundongos transgênicos poderiam explicar, pelo menos em parte, a desordem estrutural observada nas vilosidades do epitélio mucoso desses animais, típicas de um processo inflamatório autoimune que se agrava após o tratamento oral com a OVA.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a exposição à OVA por via oral favorece a expansão de IELs com características inflamatórias no intestino delgado dos camundongos transgênicos DO11.10, ao passo que em camundongos BALB/c a ingestão do antígeno leva ao desenvolvimento de IELs com características de células reguladoras da resposta imune.

Acreditamos que a tolerância oral seja seriamente prejudicada nos camundongos transgênicos DO11.10 devido às alterações na quantidade e nas proporções entre os diferentes subgrupos de linfócitos T que se desenvolvem em sua mucosa intestinal, desde o período embrionário, direcionando a resposta imune que ocorreria no processo de absorção de antígenos inócuos da dieta de um padrão tolerogênico para um padrão inflamatório.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, N. C. Man the barrier! strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature Rev. Immunol.*, 1: 59-67, 2001.

ANDO, T, et al. Orally administered TGF- β is biologically bactive in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol.*, 120 (4): 916-923, 2007.

ANJUÈRE, F., CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccine development. *Médecine Sciences (Paris)*. 23(4):371-378, 2007.

ANNACKER, O, COOMBES, JL., MALMSTROM, V. et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.*, 202:1051–1061, 2005.

ARNABOLDI, P.M., ROTH-WALTER, F., MAYER, L. Suppression of Th1 and Th17, but not Th2, responses in a CD8+ T cell mediated model of oral tolerance. *Mucosal Immunol.*, 2(5): 427–438, 2009.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.*, 8: 411- 420, 2008.

BAUMGART, D. C., DIGNASS, A. U. Intestinal barrier function. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 5: 685-694, 2002.

BHARHANI, et al. Comprehensive phenotypic analysis of the gut intraepithelial lymphocyte compartment: perturbations induced by acute reovirus 1/L infection of the gastrointestinal tract. *Int Immunol.*, 19(4): 567–579, 2007.

BIZARRO, N., TONUTTI, E. Celiac disease In: Shoenfeld, Y., Cervera, R., M. Gershwin, E. (Eds). *Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases*, 1ªEd, Humana Press, USA, 2008. 598p.

BLUMBERG RS, et al. Antigen presentation by intestinal epithelial cells. *Immunol Lett*, 69 (1):7–11, 1999.

BOIRIVANT, M., AMENDOLA, A., BUTERA, A. A. Intestinal microflora and immunoregulation. *Mucosal Immunology*, 1 (Suppl 1): S47–S49, 2008.

BRIMNES, J., et al. Defects in CD8⁺ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J. Immunol.*, 174: 5814–5822, 2005.

BURKS, W., LAUBACH, S., JONES, S. M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol*, 121: 1344-1350, 2008.

CAMERINI, V., PANWALA, C., KRONENBERG, M. Regional specialization of the mucosal immune system. *J. Immunol.*, 151: 1765-1776, 1993.

CARDING, S. R., EGAN, P. J. The importance of $\gamma\delta$ T cells in the resolution of pathogen-induced inflammatory immune responses. *Immunol Rev*, 173: 98-108, 2000.

CAROL, M., et al. Spontaneous secretion of interferon γ and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut*, 42: 643-649, 1998.

CELLA, M., SALLUSTO, F., LANZAVECHIA, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 10-16, 1997.

CEPEK, K L. et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the αE b7 integrin. *Nature* 372, 190–193, 1994.

Cerutti, A. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Nature* 1, 8-10, 2008.

CHEN, Y. H, et al. Peripheral deletion of antigen-reactive in T cell in oral tolerance. *Nature*, 376: 177-180, 1995.

CHEROUTRE, H., MADAKAMUTIL, L. Acquired and natural memory t cells join forces at the mucosal front line. *Nature reviews immunology*; 4: 290-300, 2004.

CHUNG, Y., et al. Co-administration of CD40 agonistic antibody and antigen fails to overcome the induction of oral tolerance. *Immunology*, 111(1): 19-26, 2004.

COOMBES, J. L., et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cell via TGF- β and retinoic acid dependent mechanism. *J. Exp. Med.*, 204: 1757-1764, 2007.

DEPAOLO R. W., et al. Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature*, 471 (7337): 220-224, 2011.

DI SABATINO, A, CICCOCIOPOPO, R, D'ALÒ, S, et al. Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*, 49:380–386, 2001.

DUBOIS, B, GOUBIER, A, JOUBERT, G. AND KAISERLIAN, D. Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 62: 1322-1332, 2005.

du PRE´, M. F., SAMSOM, J. N. Adaptive T-cell responses regulating oral tolerance to protein antigen. *Allergy*, 66(4):478-90, 2011.

EBERL, G., LITTMAN, D. R. Thymic Origin of Intestinal $\alpha\beta$ T Cells Revealed by Fate Mapping of ROR γ t⁺ Cells. *Science*, 305: 248-251, 2004.

FARIA, A.M.C., WEINER, H.L. Oral Tolerance. *Immunol. Rev.*, 206: 232–259, 2005.

FAURE, F., et al. Characterization of human peripheral lymphocytes expressing the CD3-gamma/delta complex with antireceptor monoclonal antibodies. *J Immunol.*, 141:3357–60, 1988.

FEINBERG, MB, SILVESTRI, G. Ts cells and immune tolerance induction: a regulatory renaissance? *Nature Immunology*, 3(3): 215-217, 2002.

FONTENOT J.D., DOOLEY J.L., FARR A.G., RUDENSKY A.Y. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med.*, 202(7):901–6, 2005.

FORCHIELLI, M. L., WALKER, W. A. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *British Journal of Nutrition*, 93 (Suppl. 1): S41–S48, 2005.

FORSBERG, G., et al. Concomitant increase of IL-10 and pro-inflammatory cytokines in intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Int. Immunol.*, 19(8): 993–1001, 2007.

FRIEDMAN, A., WEINER, LH. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 6688-6692, 1994.

GRACA, L., et al. Antibody-induced transplantation tolerance: the role of dominant regulation. *Immunol. Rev.*, 28 (3): 181-191, 2003.

GROH, V. et al. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 12445–12450, 1996.

GUY-GRAND, et al. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J. Exp. Med.*, 197 (3): 333-341, 2003.

HAASE, C., MICHELSEN, B. K., JORGENSEN, T. N. CD40 is necessary for activation of naïve T cell by a dendritic cell line in vivo but not in vitro. *Scand. J. Immunol.*, 59(3): 237-245, 2004.

HAMADA, S., et al. Importance of murine V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells expressing interferon- γ and interleukin-17A in innate protection against *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology*, 125, 170-177, 2008.

HAYDAY, A, et al. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol.*, 2: 997-1003, 2001.

HAYDAY, A. VINEY, L. J. The Ins and Outs of body surface immunology. *Science*, 290: 97-100, 2000.

HAYDAY, A., GIBBONS, D. Brokering the peace: the origin of intestinal T cells. *Mucosal Immunology*, 1(3): 172-174, 2008.

HERSHBERG, R., MAYER L. F. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells – polarity and complexity. *Immunol.Today*, 21: 123-128, 2000.

HO, J, et al. A CD8⁺/CD103^{high} T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J.Immunol.*, 180: 2573–2580, 2008.

HOGAN, S. P., ROTHENBERG, M. E. Dietary allergenic proteins and intestinal immunity: a shift from oral tolerance to sensitization. *Clin Exp Allergy.*, 38(2):229-32, 2008.

HONDA, K, TAKEDA, K .Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunology*, 2 (3):187-196, 2009.

HUIBREGTSE, I. L., et al. Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. *Gastroenterology*, 133:517–528, 2007.

HURST, SD, SITTERDING, SM, JI, S, BARRETT, TA. Functional differentiation of T cells in the intestine of T cell receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 3920–3925, 1997.

HUSBY, S, MESTECKY, J, MOLDOVEANU, Z, HOLLAND, S, EISON, CO. Oral tolerance in humans: T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J. Immunol.*, 152: 4662-4670, 1994.

ILIEV, I. D., et al. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunology*, 2 (4): 30-350, 2009.

INAGAKI-OHARA, et al, Mucosal T cells bearing TCR $\gamma\delta$ play a protective role in intestinal inflammation. *J. Immunol.*, 173: 1390 – 1398, 2004.

ISAKOV, D., et al. Non-equilibrium and differential function between intraepithelial and lamina propria virus-specific TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\beta$ + T cells in the small intestinal mucosa. *Mucosal Immunol.*, 2(5): 450–461, 2009.

ISHIKAWA, H. et al. *Curriculum vitae* of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol. Rev.*, 215, 154-165, 2007.

IWEALA, O. I., NAGLER, C. R. Immune privilege in the gut: the establishment and maintenance of non-responsiveness to dietary antigens and commensal flora. *Immunol Rev.*, Vol. 213: 82–100, 2006.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M. et al. *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*, 6ª Edição, Editora Artmed, 2007. 824p.

JOHANSSON-LIMDBOM, B., et al. Functional specialization of gut CD103⁺ dendritic cells in the regulation of the tissue –selective T cell homing. *J. Exp. Med.*, 202: 1063-1073, 2005.

JORDAN, M. S., et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology*, 2: 301 – 306, 2001.

KAPP, J. A., et al. $\gamma\delta$ T cells clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses *ex vivo*. *Immunology*, 111: 155-164, 2004.

KANG, S. G., et al. High and Low Vitamin A Therapies Induce Distinct FoxP3⁺ T-Cell Subsets and Effectively Control Intestinal Inflammation. *GASTROENTEROLOGY* 137:1391–1402, 2009.

KITANI A, XU L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunology*, 1: 43-46, 2008.

KLEIN L., KYEWSKI, B. "Promiscuous" expression of tissue-antigens in the thymus: A key to T cell tolerance and autoimmunity? *J. Mol. Med.*, 78: 483-494, 2000.

KOHYAMA, M., et al. Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cell specific for self-antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(12): 4192-4197, 2004.

KRAUS T. A., MAYER L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 21:692– 696, 2005.

KRAUS, T. A., TOY, L, CHAN, L, CHILDS, J, MAYER,L. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*,126:1771–1778, 2004.

KRISTEN, M., KHORUTS, A Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25⁺ CD4 T Cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J. Immunol.*, 167: 188-195, 2001.

KRUMMEL, M. F., ALLISON, P. J. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cell to stimulation. *J. Exp. Med.*, 182: 459-465, 1995.

KUGATHASAN, et al. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late inflammatory bowel disease. *Gut*, 56: 1696-1705, 2007.

KUNISAWA, J. TAKAHASHI, I, KIYONO, H. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol Rev*, 215: 136–153, 2007.

LAMBOLEZ , F . et al. The thymus exports long-lived fully committed T cell precursors that can colonize primary lymphoid organs . Nat. Immunol., 7: 76 – 82, 2006.

LEE JW, EPARDAUD M, SUN J, et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T-cell tolerance to intestinal self. Nat Immunol., 8:181-190, 2007.

LEE, H., BARRETT, T. A. Oral tolerance therapy in an experimental model of colitis, Am J Gastroenterol., 95(4):966-73, 2000.

LEFRANÇOIS, L. Intraepithelial lymphocytes of the intestinal mucosa: curiouser and curiouser. Semin Immunol., 3:99. 1991a.

LEFRANÇOIS, L. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. J Immunol., 147:1746-1751, 1991b.

LEHMANN, J., et al. Expression of the integrin $\alpha_E\beta_7$ identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻regulatory T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99 (20): 13031-13036, 2002.

LI, M. O, WAN, Y.Y, FLAVELL, R. A. T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. Immunity, 26: 1-13, 2007.

LIPSCOMB, F. M., MASTEN, B.J. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. Physiol. Rev., 82: 97-130, 2002.

LIU, H., et al. Continual monitoring of intraepithelial lymphocyte immunophenotype and clonality is more important than snapshot analysis in the surveillance of refractory coeliac disease. Gut, 59: 452-460, 2010.

LIU, Z, LEFRANÇOIS, L. Intestinal epithelial antigen induces mucosal CD8 Tcell tolerance, activation, and inflammatory response. The Journal of Immunology, 173: 4324–4330, 2004.

LIVAK, K. J, SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. Methods, 25:402–408, 2001.

LOCKE, N. R., et al. TCR $\gamma\delta$ Intraepithelial Lymphocytes Are Required for Self-Tolerance. *J. Immunol.*, 176: 6553–6559, 2006.

MAGNUSSON, FC, LIBLAU, RS, VON BOEHMER, H, et al. Direct presentation of antigen by lymph node stromal cells protects against CD8 T-cell-mediated intestinal autoimmunity. *Gastroenterology*, 134:1028–1037, 2008.

MAKITA, S. et al The role of cryptopatch-derived intraepithelial lymphocytes in the development of chronic ileocectitis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58: 428–435, 2003.

MANGAN, PR., HARRINGTON, LE. O'QUINN, DB, et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature*, 441: 231-234, 2006.

MARTH, T., et al. Antigen-induced mucosal T cell activation is followed by Th1 T cell suppression in continuously fed ovalbumin TCR- transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, 30: 3478-3486, 2000.

MARTH, T., et al. High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: systemic neutralization of interleukin-12 augments TGF β secretion and T cell apoptosis. *J. Immunol.*, 157: 2348-2357, 1996.

MASOPUST, D., et al. Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J Immunol.*, 176: 2079-2083, 2006.

MAUL, J. DUCHMANN, R. Can Loss of Immune Tolerance Cause IBD? *Inflamm Bowel Dis.*, 14 (S2), S115-116, 2008.

MAYER, L. Mucosal Immunity. *Pediatrics*, 111(6): 1595-1600, 2003.

MCGEACHY, M. J., CUA, D. J. T cells doing it for themselves. TGF- β regulation of Th1 and Th17 cells. *Immunity*, 5:547-549, 2007.

MESTECKY, J., RUSSELL, M W., ELSON, C O. Perspectives on mucosal vaccines: is mucosal tolerance a barrier? *J Immunol.*, 179: 5633– 5638. 2007.

MONDINO, A, et al. The anatomy of T-cell activation and tolerance *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 2245-2252, 1996.

MONTUFAR-SOLIS, D., KLEIN, J. R. An improved method for isolating intraepithelial lymphocytes (IELs) from the murine small intestine with consistently high purity. *J. Immunol. Methods* 308: 251–254, 2006.

MOTTET, C., GOLSHAYAN, D. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *SWISS MED WKLY.*;137:625–634, 2007.

MOWAT, A. McL. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.*, 3:331-341, 2003.

MUSCIDA, D., et al. Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science*, 317: 256-269, 2007.

MULLER, D. L., JENKINS, K. M., SCHWARTZ, H. R. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.*, 7: 445-479, 1989.

MURPHY, KM, HEIMBERGER, AB, LOH, DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺ TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science*, 250: 1720-1723, 1990.

NAKAJIMA-ADACHI, H., et al. Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*,117:1125-32, 2006.

NIESS, J. H., et al. Commensal Gut Flora Drives the Expansion of Proinflammatory CD4 T Cells in the Colonic Lamina Propria under Normal and Inflammatory Conditions. *J. Immunol.*,180: 559–568, 2008.

NOGUCHI, D., et al. Blocking of IL-6 signaling pathway prevents CD4⁺ T cell-mediated colitis in a Th17-independent manner. *Int. Immunol.*, 19 (12): 1431–1440, 2007.

O'GARRA, A., et al. IL-10–producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. *J. Clin. Invest.*, 114: 1372-1378, 2004.

OGRA, P. L. Mucosal immunity: Some historical perspective on host-pathogen interactions and implications for mucosal vaccines. *Immuno. Cell Biol.*,81: 23-33, 2003.

PARKER, C. M., et al. A family of $\beta 7$ integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 1924-1928, 1992.

PARKER, CM, CEPEK, KL, RUSSELL, GJ, et al. A family of $\beta 7$ integrins on human mucosal lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1924-1928, 1992.

PICCIRILLO, CA, SHEVACH, EM. Naturally-occurring $CD4^+CD25^+$ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Seminars in Immunology*, 16: 81–88, 2004.

POUSSIER, P, NING, T, BANERJEE, D, JULIUS, M. A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. *Journal Experimental Medicine*, 195 (11): 1491-1497, 2002.

RESCIGNO, M., DI SABATINO, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J. Clin. Invest.*, 119: 2441–2450, 2009.

RESCIGNO, M., et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol.* 2: 361–367, 2001.

RIMOLDI, M, CHIEPPA, M, SALUCCI, V, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature Immunology*, 6: 507-514, 2005.

ROBERTS, S. J., et al. T-cell $\alpha b1$ and $gd1$ deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11774–11779, 1996.

ROUND, J. L., MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9: 313-323, 2009.

ROVEDATTI, L., et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon γ production in inflammatory bowel disease. *Gut*, 58:1629-1636, 2009.

SAITO , H . et al. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science*, 280: 275 – 278, 1998 .

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 6(4): 345-352, 2005.

SALOMON, B., et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diseases. *Immunity*, 12: 431, 2000.

SAMSOM, J. N., et al. FcγRIIB Regulates Nasal and Oral Tolerance: A Role for Dendritic Cells. *J. Immunol.*, 174: 5279–5287, 2005.

SAPAROV, A, KRAUS, LA, CONG, Y. ET AL. Memory/effector T cells in TCR transgenic mice develop via recognition of enteric antigens by a second, endogenous TCR. *Int. Immunol.*, 11:1253-1263, 1999.

SAURER, L, MUELLER, C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy*, 64: 505–519, 2009.

SHAO L, KAMALU O, MAYER L. Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk. *Immunol Rev*, 206:160–176, 2005.

SHIRES, J, THEODORIDIS, E, HAYDAY, A C. Biological insights into TCRγδ and TCRαβ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity*, 15: 419-434, 2001.

SIDDIQUI, K.R., POWRIE, F. CD103⁺ GALT DCs promote Foxp3⁺ regulatory T cells. *Mucosal Immunology.*, 1 (Suppl 1): S34-38, 2008.

SIMIONI, U. P, et al. Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin. *Scand. J. Immunol.*, 60: 257-266, 2004.

STANKOVIC, S., ZHAN, Y., HARRISON, L.C. Homeostatic proliferation of intestinal intraepithelial lymphocytes precedes their migration to extra-intestinal sites. *Eur. J. Immunol.*, 37: 2226–2233, 2007.

STECHER, B., et al. Salmonella enterica Seroovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. PLoS Biol., (10):2177-89, 2007.

STEINMAN R.M., ADAMS J.C., COHN Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. J Exp Med. 1;141(4):804-20, 1975.

STEINMAN, R. M., BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. Nature, 449: 419-426.

STATON, L. T., et al. CD8⁺ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium. Nat. Immunology, 7(5): 482-488, 2006.

SUN, J., et al. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. J. Immunol., 162: 5868-5875, 1999.

SUTTON, CE, LALOR SJ, SWEENEY CM, et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity, 31:331-341, 2009.

TARGAN, S. R., KARP, L. C. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. Immunol. Rev., 206: 296–305, 2005.

TOUSSIROT, E. A. Oral Tolerance in the Treatment of Rheumatoid Arthritis Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy, v. 1, n. 1, p. 45-52, Mar, 2002.

VAISHNAVA, S., et al. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 20858–20863, 2008.

VAN WIJK, F., CHEROUTRE, H. Intestinal T cells: Facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. Semin Immunol., 21(3): 130–138, 2009.

VENDETTI, S., et al. Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. J. Immunol., 165: 1175-1181, 2000.

VIDALI F, et al. Increased CD8⁺ intraepithelial lymphocyte infiltration and reduced surface area to volume ratio in the duodenum of patients with ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol., 45(6):684-689, 2010.

VIGHI, G., et al. Allergy and gastrointestinal system. Clin Exp Immunol., 153 (Suppl.1):3-6, 2008.

VON BOEHMER, H. Dynamics of Suppressor T Cells: In vivo veritas. J. Exp. Med., 198(6): 845-849, 2003.

VON BOEHMER, H. Oral tolerance: is it all retinoic acid? J. Exp. Med., 204(8):1737-1739, 2007.

VON HERRATH M. G., HARRISON, L. C. Antigen-induced regulatory t cells in autoimmunity. Nat. Rev. Immunol., 3: 223-232, 2003.

WALKER, S. K. L., et al. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo. J. Exp. Med., 198 (2): 249-258, 2003.

WANG, H-C, ZHOU, Q, DROGOO, J, KLEIN, R J. Most murine CD8⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes are partially but not fully activated T cells. J. Immunol., 169: 4717-4722, 2002.

WANG, H-C., MONTUFAR-SOLIS, D, TENG, B-B, KLEIN, J R. Maximum immunobioactivity of murine small intestinal intraepithelial lymphocytes resides in a subpopulation of CD43⁺ T cells. J. Immunol., 173: 6294–6302, 2004.

WEINER, H. L., et al. Oral Tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Annu. Rev. Immunol., 12: 809-837, 1994.

WEINTRAUB, B. C., et al. Role of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in the host response to *Salmonella* infection as demonstrated in T-cell-receptor-deficient mice of defined *Ity* genotypes. J. Infection and Immunity, 65: 2306–2312, 1997.

WELLS H-G. Studies on the chemistry of anaphylaxis III. Experiments with isolated proteins, especially those of the hens egg. J Infect Dis, 8:147-153, 1911.

WESTENDORF, AM, FLEISSNER D, DEPPENMEIER S, et al. Autoimmune mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen specific CD8⁺T cells. Gastroenterology, 131:510 –524, 2006.

WESTENDORF, AM, TEMPLIN, M, GEFERS, R., et al. CD4+ T cell mediated intestinal immunity: chronic inflammation versus immune regulation. *Gut*, 54:60–69, 2005.

WIEDERMANN, U. Mucosal immunity-mucosal tolerance. A strategy for treatment of allergic diseases. *Chemical Immunology and Allergy*, 82:11-24, 2003.

WINKLER, B., et al The role of Foxp3+ T cells in long-term efficacy of prophylactic and therapeutic mucosal tolerance induction in mice. *Allergy*, 61: 173–180, 2006.

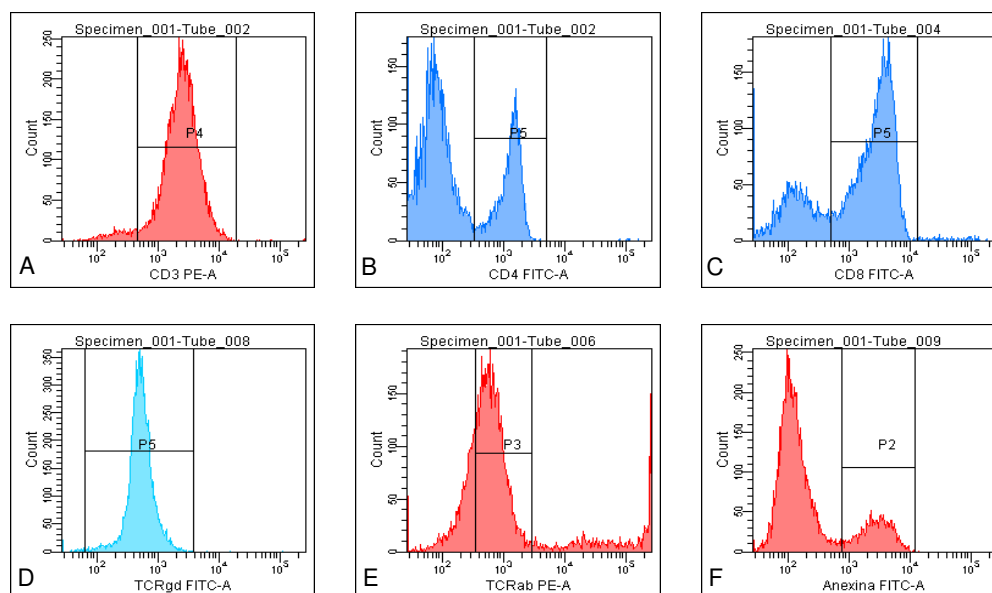
WYNN, T. A. TH17: A giant step from TH1 and TH2. *Nature Immunology*, 6 (11): 1069-1070, 2005.

YAMAZAKI, S., et al. Direct Expansion of Funcional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 198: (2): 235-247, 2003.

ZHOU, P, BOROJEVIC, R, STREUTKER, C, ET AL. Expression of dual TCR on do11.10 T cells allows for ovalbumin-induced oral tolerance to prevent t cell-mediated colitis directed against unrelated enteric bacterial antigens. *The Journal of Immunology*, 172: 1515–1523, 2004.

10. ANEXOS

ANEXO I – DADOS ADICIONAIS DE ANÁLISES FENOTÍPICAS



<i>Marcadores fenotípicos e de viabilidade</i>	% de células marcadas na gate	% total de células marcadas
Painel A -CD3 FITC	95,2	83,9
Painel B -CD3 FITC/ CD4 PE	30,0	25,2
Painel C -CD3 FITC/ CD8 PE	72,2	60,8
Painel D -CD3 PE / TCR $\gamma\delta$ FITC	99,4	82,2
Painel E-CD3 FITC / TCR $\alpha\beta$ PE	63,7	53,0
Painel F -Anexina V	20,3	17,5

ANEXO I- Análise fenotípica de células extraídas da mucosa do intestino delgado de camundongos BALB/c. Preparações enriquecidas em IELs, obtidas por extração de células da mucosa intestinal em tampão contendo DTT e EDTA, passagem em gradiente de Percoll e Microbeads CD90 (Thy 1.2), foram marcadas com anti-CD3 PE (painel A), anti-CD4 FITC (painel B), anti-CD8 FITC (painel C), anti-TCR $\gamma\delta$ FITC (painel D) e anti-TCR $\alpha\beta$ PE (painel E) e com Anexina (painel F). As análises foram conduzidas no FACSaria com o software FACS DIVA. As porcentagens de células encontradas na análise por citometria de fluxo estão mostradas na tabela.

ANEXO II- PROTOCOLOCEUA/UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **736-2**, sobre "**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES DA MUCOSA INTESTINAL ENVOLVIDAS NA TOLERÂNCIA ORAL DA OVALBUMINA**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro / Maristela Ruberti** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de novembro de 2004.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **736-2**, entitled "**PHENOTYPICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE IMMUNOCOMPETENT INTESTINAL CELLS THAT PRESENTS IMPORTANT ROLE IN ORAL TOLERANCE**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on November 4, 2004.

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

Campinas, 04 de novembro de 2004.

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

ANEXO III – PROTOCOLO CIBio/UNICAMP



COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA - CIBio
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ofic. CIBio 024/2004

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
27 de Outubro de 2004.

Prof. Dr. TOMOMASA YANO

Chefe do Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
UNICAMP

Prezado Professor:

Informamos que os projetos envolvendo OGM do tipo I abaixo relacionados, sob responsabilidade do Profa. Dra. **WIRLA MARIA DA SILVA CUNHA TAMASHIRO**, foram aprovados pela CIBio-IB/UNICAMP na Reunião Ordinária de 27 de outubro de 2004, para serem desenvolvidos nas dependências do Departamento de Microbiologia e Imunologia desta Unidade.

No. Projeto (Data da aprovação)	Data de recepção	Nome do Projeto	Prazo para envio de relatório à CIBio
CIBio 2004/03 (27/10/2004)	6/10/2004	Caracterização morfo funcional de células dendríticas na tolerância oral e antígenos protéicos	agosto/2005
CIBio 2004/04 (27/10/2004)	6/10/2004	Caracterização fenotípica e funcional das células imunocompetentes da mucosa intestinal envolvidas na tolerância oral a ovalbumina	agosto/2005

Atenciosamente,


Profa. Dra. **SHIRLEI MARIA RECCO-PIMENTEL**
Presidente da CIBio/IB/UNICAMP

ANEXO IV- DECLARAÇÃO DE COMISSÕES DE ÉTICA**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação /tese de Doutorado intitulada **“Caracterização fenotípica e funcional das células imunocompetentes da mucosa intestinal envolvidas na tolerância oral a ovalbumina”**:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

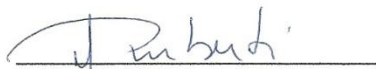
Tem autorização das seguintes Comissões:

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2001/01, Instituição: UNICAMP

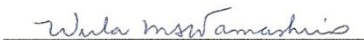
(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 736-2, Instituição: UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: MARISTELA RUBERTI



Orientador: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

ANEXO V- ARTIGO

Hindawi Publishing Corporation
Clinical and Developmental Immunology
Volume 2012, Article ID 208054, 16 pages
doi:10.1155/2012/208054

Research Article

Phenotypical and Functional Analysis of Intraepithelial Lymphocytes from Small Intestine of Mice in Oral Tolerance

Maristela Ruberti,¹ Luis Gustavo Romani Fernandes,¹ Patricia Ucelli Simioni,¹
Dirce Lima Gabriel,¹ Áureo Tatsumi Yamada,² and Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro¹

¹ Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP),
Rua Monteiro Lobato of 255, CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

² Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP),
CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, wirlatam@unicamp.br

Received 18 May 2011; Accepted 14 September 2011

Academic Editor: Ana Maria Caetano Faria

Copyright © 2012 Maristela Ruberti et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In this work, we evaluated the effects of administration of OVA on phenotype and function of intraepithelial lymphocytes (IELs) from small intestine of transgenic (TGN) DO11.10 and wild-type BALB/c mice. While the small intestines from BALB/c presented a well preserved structure, those from TGN showed an inflamed aspect. The ingestion of OVA induced a reduction in the number of IELs in small intestines of TGN, but it did not change the frequencies of CD8⁺ and CD4⁺ T-cell subsets. Administration of OVA via oral + ip increased the frequency of CD103⁺ cells in CD4⁺ T-cell subset in IELs of both BALB/c and TGN mice and elevated its expression in CD8⁺ T-cell subset in IELs of TGN. The frequency of Foxp3⁺ cells increased in all subsets in IELs of BALB/c treated with OVA; in IELs of TGN, it increased only in CD25⁺ subset. IELs from BALB/c tolerant mice had lower expression of all cytokines studied, whereas those from TGN showed high expression of inflammatory cytokines, especially of IFN- γ , TGF- β , and TNF- α . Overall, our results suggest that the inability of TGN to become tolerant may be related to disorganization and altered proportions of inflammatory/regulatory T cells in its intestinal mucosa.

1. Introduction

Oral tolerance has long been recognized as a physiological mechanism of immune unresponsiveness to dietary antigens (Ags) and indigenous bacterial Ags that maintains tissue integrity by preventing harmful delayed type hypersensitivity responses in the intestine [1]. Three mechanisms were postulated to mediate oral tolerance: clonal deletion, anergy, and active immune suppression. Lower doses of Ag have favored active suppression, and this mechanism is mediated through regulatory cytokines such as TGF- β , IL-10, and IL-4 [2]. T cells producing these regulatory cytokines may downregulate autoreactive T cells in an antigen nonspecific way [2, 3], whereas higher doses favor anergy and T-cell depletion [3]. More recent results show that an activation of T cells is necessary before establishing oral tolerance [4], while enhanced antibacterial immunity can be achieved with

concomitant generation of oral tolerance followed by oral administration of soluble antigen such as ovalbumin (OVA) [5].

The immunological consequences of oral administration of antigen ultimately depend on how antigen is taken up and presented to T cells by dendritic cells [6]. Despite of the initiation of oral tolerance remains to be cleared, it seems to involve the active participation of the all gut-associated lymphoid tissue (GALT) [7]. Intraepithelial lymphocytes (IELs) play an important role in the maintenance of mucosal homeostasis by regulating mucosal innate and acquired immunity [8]. The populations of IELs exhibit unique characteristics, perform functions not fully elucidated, and differ widely from their systemic counterparts [9]. IELs in mice and humans include large numbers of cells expressing T-cells receptor (TCRs) $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ [9]. The majority of IELs are CD8⁺ cells that express a CD8 $\alpha\alpha$ homodimer. Among

IELs subsets, it can still be found some CD4⁺CD8⁻ double negative cells, CD4⁺CD8⁺ double positive cells and a few CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ cells [8, 10]. Nearly all CD8⁺ IELs expressed CD69 and had lytic activity [11].

Preliminary results of our group have shown that DO11.10 mice, that bear transgenic anti-OVA TCR, are not susceptible to oral tolerance with OVA [12]. In the present work, we investigated the immune response that takes place in intestinal mucosa during the consumption of OVA in both BALB/c and DO11.10 mice. Since the majority of studies with oral tolerance induction and mucosal immune response have only evaluated the role of CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells [13–15], we analyzed all subsets of IELs of these mice in the context of oral tolerance and immune response to OVA.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Breeder pairs of TCR OVA-specific transgenic mice (clone DO11.10) [16] and BALB/c mice were supplied by CEMIB (Centro Multinstitucional de Investigações Biológicas), UNICAMP. Mice were maintained under specific pathogen-free condition and were provided with autoclaved food and water. The study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of University of Campinas (Protocol no. 736-2).

2.2. Tolerance Induction and Immunizations. Oral tolerance to OVA was induced in 8 weeks old mice as described elsewhere [12]. Briefly, Mice were fed with 4 mg/mL OVA solution (Rhoster Indústria e Comércio, Ltda., Vargem Grande Paulista, SP, Brazil) for seven consecutive days. The mice in the control group received protein-free water. Seven days after the interruption of oral treatment, half of this group of mice was challenged with 10 μ g OVA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) plus 1 mg Al(OH)₃ by intraperitoneal (ip) route. After 14 days, mice were boosted with 10 μ g OVA in saline solution via ip. In control group, half of the animals were also challenged with the ip doses of OVA. Seven days after the last ip dose, all mice were bled for serum separation, and then euthanized in a CO₂ chamber.

2.3. Cell Isolation and Purification. Intraepithelial lymphocytes were isolated from the small intestine of BALB/c and DO11.10 mice, according to Montufar-Solis and Klein [17]. Briefly, small intestine tissues were removed, and Peyer's patches were dissected out. Tissues were flushed of fecal material, opened longitudinally, and cut into 3 to 4 mm pieces in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with FCS (10% v/v) (Nutricell, Campinas, SP, Brazil), gentamicin 20 μ g/mL (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Tissue fragments were rinsed several times in Ca²⁺/Mg²⁺ free PBS, transferred to Ca²⁺/Mg²⁺ free PBS containing 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich) and 2 mM DTT (Calbiochem; Cleveland's reagent; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and shaken (bath Dubnoff-Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) at 37°C for 30 min. Cell suspensions were filtered through 20-mL syringe barrels containing wetted nylon wool, centrifuged, suspended in 3 mL of 40% isotonic Percoll

(Amersham and Sigma-Aldrich), layered on top of 70% isotonic Percoll (4 mL), and centrifuged for 30 min at 400 xg. IELs were recovered from the Percoll interface and washed by centrifugation in supplemented RPMI-1640, viability and cell numbers were measured by exclusion of Trypan blue dye and counting in a hemocytometer. IELs from BALB/c mice were further purified by immunomagnetic separation, using beads conjugated with mAb anti-CD90 (Thy-1.2) on MS columns, as recommended by the manufacturer (Midi Macs, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany).

2.4. Phenotypic Analysis by Flow Cytometry. Single-cell suspensions from small intestine were suspending in PBS/0.01% BSA (Sigma) w/v supplemented with 0.1% sodium azide. Cells were first incubated with anti-CD16/32 (culture supernatants of clone 2.4G2) for 45 min to block Fc-mediated antibody binding. Then, cells were incubated with relevant mAb for 30 min at 4°C, washed with PBS/2% FCS, and fixed 9 with PBS/1% formaldehyde (Merck Darmstadt, Germany). Three- or four-color flow cytometry acquisition was performed on FACSaria (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). A total of 30.000 events were acquired in each analysis. The following antibodies purchased from BDPharMingen were used for flow cytometry: anti-CD3 (clone 145-2C11)-PerCP Cy5.5 or FITC; anti-CD4 (clone GK1.5)-FITC, PE or PE-Cy7; anti-CD4 (clone RM4-5)-PE-Cy7; anti-CD8 α (clone 53-6.7)-FITC or PE; anti-CD8 β (clone 53-5.8)-FITC; anti-TCR β (clone H57-597)-PE; anti-TCR $\gamma\delta$ (clone GL3)-FITC or PE; anti-CD152 (CTLA-4) (clone UC10-4F10-11)-PE; anti-CD25 (clone 7D4)-FITC or PE; anti-CD103 (α IEL) (clone M290)-PE; anti-OVA TCR (clone KJ1-26)-PE. Anti-Foxp 3 (clone FJK-16s)-PE or FITC were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA). Data were analyzed by the software FCS express V3. Respective isotype controls were included for each cell surface stain to exclude nonspecific binding and to determine the optimal setting fluorescence quadrants (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Data were analyzed by the software FCS express V3 (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.5. Histological and Immunohistochemical Staining. For histological analysis, pieces from small intestine were fixed in 4% paraformaldehyde buffered solution (Sigma) and washed with PBS/1% Glycine (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA), and 5 μ m paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin and eosin (Sigma). Slides were observed in an optical microscope (Eclipse E-800 Microscope, NIKON; Tokyo, Japan) and analyzed using the software Proplus image. For immunofluorescence analysis, sections of small intestine were dehydrated, frozen in OCT-embedding compound (Leica) on dry ice, and stored at -70°C. Tissue sections (5 μ m) were cut with a cryostat (Microm HM 505 E) and transferred to silane-coated microscope slides. Cryosections were brought to room temperature, fixed with acetone (Merck) for 10 min at 4°C, and blocked with PBS containing 1% of BSA (type V, INLAB, SP, Brazil) for 30 min. After washing with PBS, they were incubated with anti-CD3 FITC-labelled (clone

TABLE 1: Number of cells recovered from 40/70%-Percoll interface

Treatments	Cells from ^(a,b)			
	BALB/C		DO11.10	
Control	7.07	±2.05	4.27	±1.51
Oral ova	6.50	±1.91	1.57*	±0.72
Oral + IP ova	11.62	±4.97	1.00*	±0.29
IP ova	12.75	±3.41	0.55**	±0.08

^(a) Number of cells represents the mean \pm SEM $\times 10^7$ cells; ^(b) Data were obtained from 3-4 independent experiments; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

145-2C11 homemade) for 3 h, washed, and incubated with TRITC-phalloidin (Sigma) for 30 min. All incubations were made at room temperature. Vectashield-mounted slides (Vector Laboratories) were visualized by optical microscopy.

2.6. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). Total RNA was extracted from mouse IELs using PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, SP, Brazil,) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was made using SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen) with random primers (Invitrogen) and analyzed for IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17, IFN- γ , TGF- β , and TNF- α gene expression by real-time PCR assay using an 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions; 18S ribosomal RNA (rRNA) was used as an internal control. All mouse primer and probe sets used were predesigned TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). PCRs were performed in four replicates with a 2x TaqMan Mastermix (Applied Biosystems). Relative expression of mRNA species was calculated using the comparative 2 threshold cycle (Δ CT) method [18].

2.7. Statistical Analysis. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, CA, USA). The statistical significance of differences between control and experimental groups were determined by one-way and two-way ANOVA, followed by multiple comparison Bonferroni's test. The results were expressed as mean \pm SEM. Values were considered significant at $P < 0.05$. Supplemental data include two figures (see supplementary material available online at doi:10.1155/2012/208054).

3. Results

3.1. Histological Analysis and Distribution of IELs in Small Intestines of Mice DO11.10 and BALB/c. As depicted in Figure 1(a), the small intestine histoarchitecture of both naïve DO11.10 and BALB/c strains were preserved; however, it was found reduced tunica muscular thickness of DO11.10 when compared with BALB/c mice. Discrete but well-defined histological changes were observed in the lamina propria (LP) of intestinal villi of the transgenic mice after feeding with OVA, mainly in those challenged with OVA by ip route, with a loose connective tissue rupture and mild edema of lamina propria of villous projections in DO11.10 mice.

BALB/c mice treated with OVA did not present any of those alterations. The total number of IELs isolated from the small intestine of DO11.10 mice of all experimental groups was always lower than those from BALB/c and markedly dropped upon OVA treatments (Table 1). As illustrated in Figure 1(b), the incidence of CD3 positive cells decreased substantially in the villi of TGN mice but not in the BALB/c. Cytometry analyses of IELs isolated from TGN showed that the clonotype anti-OVA TCR cells (KJ1-26 positive cells) decreased significantly from 65% to less than 20% after oral and ip administration of OVA (Figures 1(c) and 1(d)).

3.2. Analysis of Subsets of IELs after the Induction of Tolerance or Immunization. IELs from BALB/c and DO11.10 mice treated with OVA by oral and/or ip route were stained with anti-CD3, anti-CD8 α , anti-CD8 β , anti-CD4 and analyzed by three-color flow cytometry (Figure 2). As shown in Figure 2(a), the frequency of CD3⁺ cells in the small intestine of BALB/c and DO11.10 mice was not changed by different treatments with OVA. No significant alteration was observed in the frequency of IEL subsets (CD8 $\alpha\alpha$, CD8 $\alpha\beta$, CD4/CD8 α , CD4) upon treatments with OVA (Figure 2(c)).

The effects of administration of OVA on the distribution of phenotypic markers CD103 and CD25 were assessed in subsets CD4, CD8 α , and CD8 β of IELs isolated from BALB/c (Supplemental Figure 1, Panel A-D) and DO11.10 mice (Supplemental Figure 1, Panel (E-H)), as well as the frequencies of $\alpha\beta^+$ and $\gamma\delta^+$ T cells in these subsets (Supplemental Figure 2). Frequency and expression of CD103⁺ cells in subsets of IELs of BALB/c and DO11.10 mice are illustrated in histograms of (Figures 3(a) and 3(b), resp.). Significant increase of CD4⁺CD103⁺ subset of IELs was observed following treatments with OVA by oral + ip routes, in both BALB/c and DO11.10 mice, whereas no antigen-dependent alteration was observed in the frequency of CD8 $\alpha\alpha$ and CD8 $\alpha\beta$ IELs expressing CD103 (Figure 3(c)). However, the expression of CD103 was significantly augmented in subpopulation of CD8 $\alpha\alpha^+$ and CD8 $\alpha\beta^+$ IELs when BALB/c mice were fed with OVA, as well as in CD8 $\alpha\alpha^+$ cells in ip immunized mice. Conversely, in DO11.10 mice, this marker was significantly reduced in CD8 $\alpha\alpha^+$ cells upon immunization with OVA by ip route (Figure 3(c)).

Frequency and expression of CD25⁺ cells in subsets of IELs of mice BALB/c and DO11.10 are illustrated in histograms of (Figures 4 (a) and 4(b) resp.). No antigen-dependent alteration was observed in the frequency of IELs

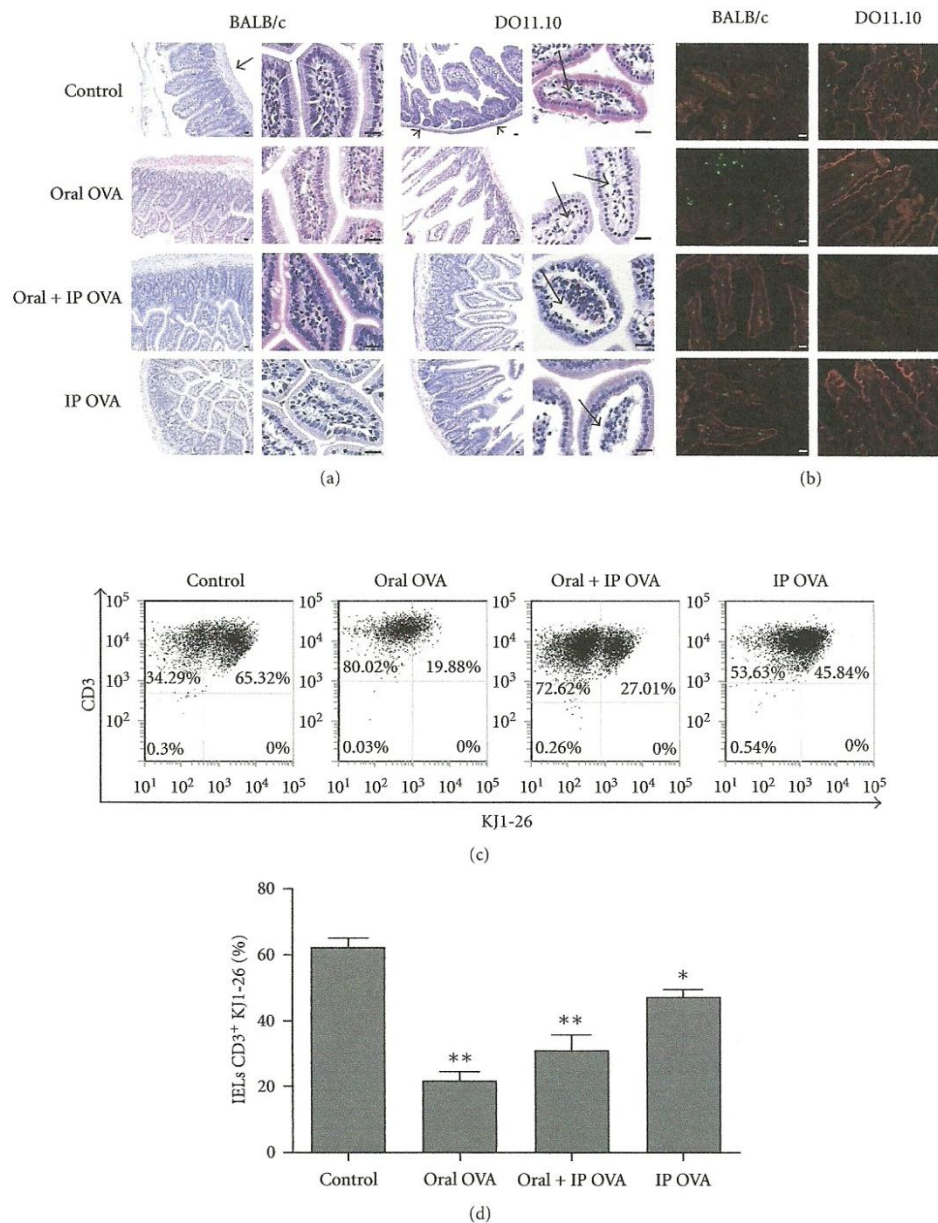


FIGURE 1: Histological analysis and incidence of T cells in small intestines (jejunum) of BALB/c and DO11.10 mice after treatments with OVA. Mice were fed with OVA solution for 7 days (oral OVA), fed with OVA and challenged by ip route (oral + ip OVA), immunized with OVA only by ip route (ip OVA), or non-treated (control). (a) Hematoxylin/Eosin-stained sections of small intestines in low and high magnification showing details of mucosa villi. Note the reduced thickness of the tunica muscularis (arrow heads) in DO11.10 when compared with BALB/c, and loss of connective tissue and mild edema in the lamina propria (thin arrows) in Oral + ip OVA and ip OVA groups of DO11.10 mice. Bars = 50 μ m. (b) Immunofluorescence of frozen sections of jejunum counterstained with TRITC-phalloidin (red epithelial cells) showing reduced incidence of CD3 positive cells (green) in the mucosa of DO11.10 in comparison to BALB/c mice. Bars = 25 μ m; (c, d) Frequency of KJ1-26 positive cells amongst the intraepithelial lymphocytes freshly isolated from DO11.10 mice treated with OVA. The clonotype anti-OVA TCR cells (KJ1-26⁺ cells) decreased from 65% to less than 20% after oral and ip administration of OVA. Data represent mean \pm SEM ($N = 5$) of three independent experiments.

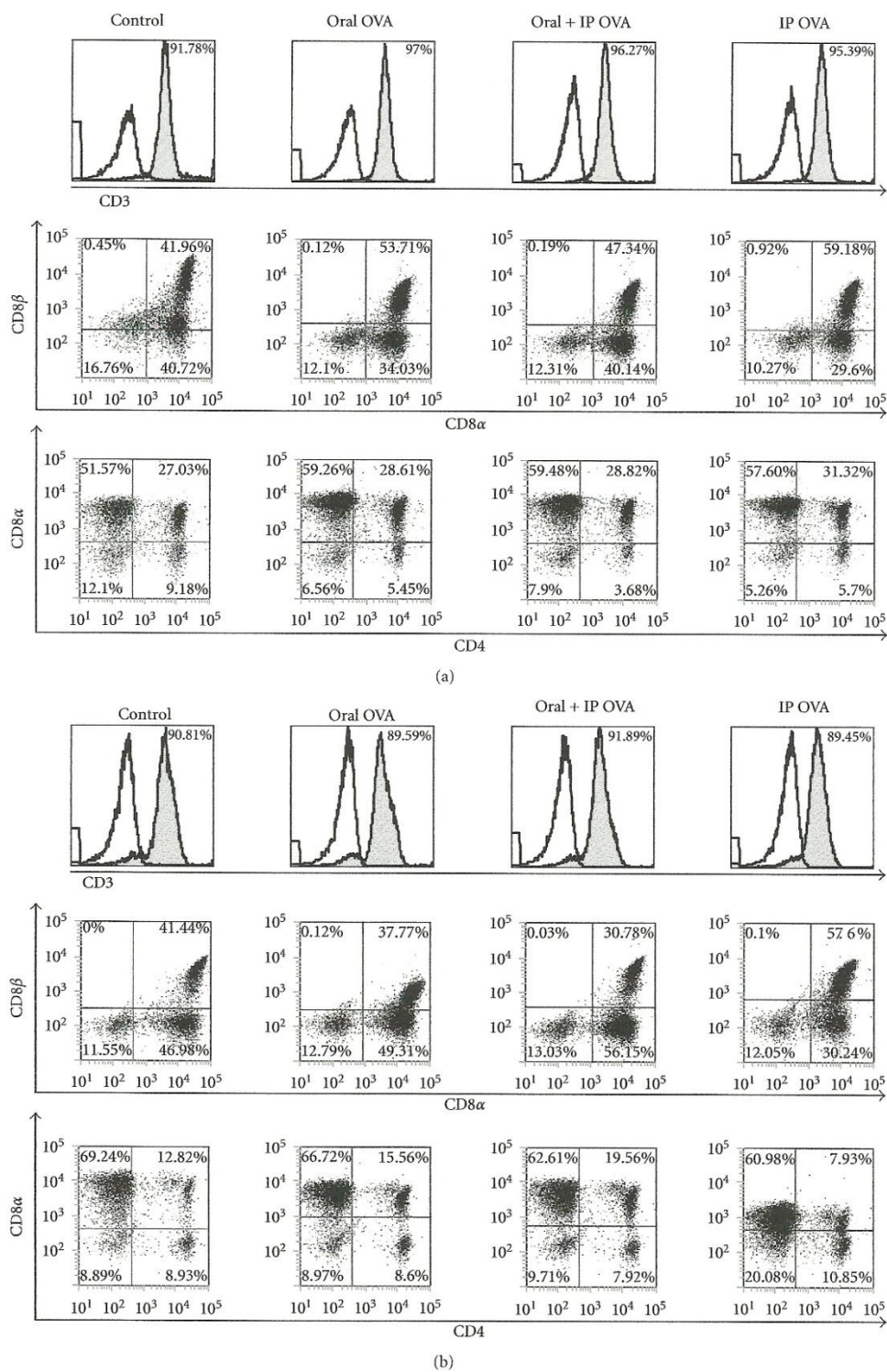


FIGURE 2: Continued.

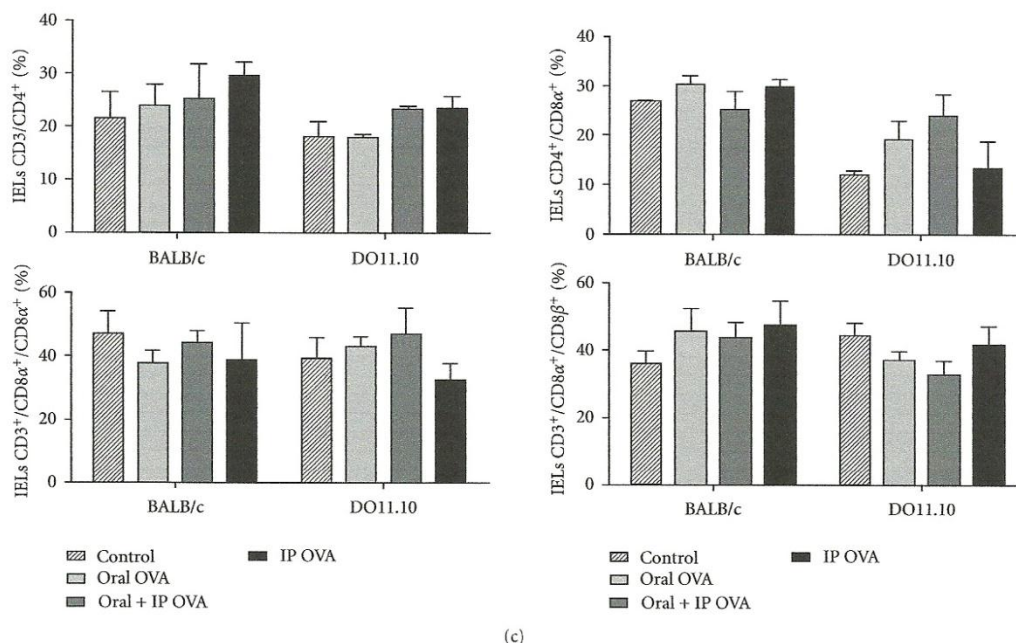


FIGURE 2: Effects of the treatments with OVA on CD4 and CD8 subsets of IELs. Freshly isolated IELs from BALB/c (a) and DO11.10 (b) mice were gated for CD3⁺ cells and analyzed for expression of CD8α, CD8α/CD8β, and CD4/CD8α by flow cytometry. No significant difference was found in the frequency of IELs of any subset in both strains of mice. In (c), data represent mean ± SEM (N = 5) in each group in three independent experiments.

expressing this marker in both DO11.10 and BALB/c mice, except in CD8β⁺ subset of IELs in which this marker was upregulated by treatments with OVA by oral route (Figure 4(c)).

3.3. Evaluation of Foxp3 Expression in IELs after Administration of OVA. To assess possible changes in the frequency of regulatory T cells after oral and/or ip administration of OVA, IELs from BALB/c and DO11.10 mice were stained with anti-Foxp3 and analyzed by flow cytometry in CD4⁺, CD8α⁺, CD8αβ⁺, and CD25⁺ subsets. As shown in Figures 5(a) and 5(c), we observed that oral administration of OVA to BALB/c mice resulted in elevation of the frequency of Foxp3⁺ cells in CD4⁺ and CD8αβ⁺ subsets. Following parenteral administration of OVA, the frequency of cells Foxp3⁺ in IELs of BALB/c mice was more elevated in the CD8α⁺, CD8αβ⁺, and CD25⁺ subsets. On the other hand, only the oral + ip treatment of DO11.10 mice increased the frequency of Foxp3⁺ cells in the CD25⁺ subset (Figures 5(b) and 5(c)).

3.4. Effect of Treatments with OVA on Cytokine mRNA Expression in IELs of BALB/c and DO11.10 Mice. In addition to phenotypic analysis, expression of pro-(IL-2, IFN-γ, IL-6, IL-17, and TNF-α) and anti-inflammatory (IL-10, IL-4, and TGF-β) cytokines has been assessed by real-time PCR from extracts of IELs of the small intestine of BALB/c and DO11.10 mice treated with OVA. The results are summarized

in Figure 6. It is possible to notice that IELs from OVA-treated mice of both strains present opposite profiles in relation to the gene expression of most cytokines examined. IELs from tolerant BALB/c mice (oral and oral + ip groups) showed a diminished expression of mRNA for cytokines IL-10, IL-2, IFN-γ, TGF-β, and TNF-α in comparison to those from mice immunized by ip route. IELs from DO11.10 mice treated with OVA by oral + ip and ip routes showed an elevated expression of IL-6, IL17, TNF-α, and TGF-β, although differences were not significant in comparison with the oral group. IELs from DO11.10 mice that received OVA by oral + ip, however, showed a mRNA expression for TNF-α, IFN-γ, and TGF-β significantly more elevated than IELs from BALB/c mice of the same group.

4. Discussion

Failure in the induction of oral tolerance seems to be associated with modifications in the gastrointestinal mucosa permeability and, especially, with the immunoregulation that occurs in this environment [19, 20]. Results obtained previously in our laboratory showed that transgenic DO11.10 and BALB/c mice differ in their immune response to oral OVA. While DO11.10 mice develop a specific humoral immune response after the ingestion of native ovalbumin, the BALB/c mice become tolerant to OVA. The transgenic mice fed with ovalbumin produced an immune response that is a mixed

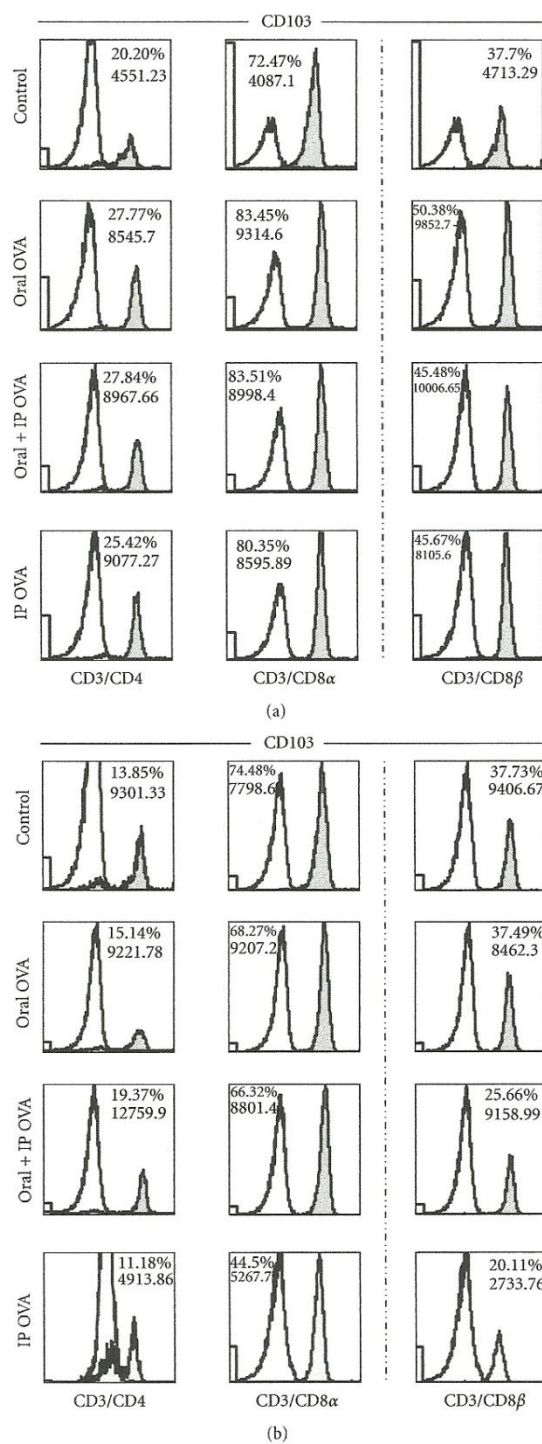


FIGURE 3: Continued.

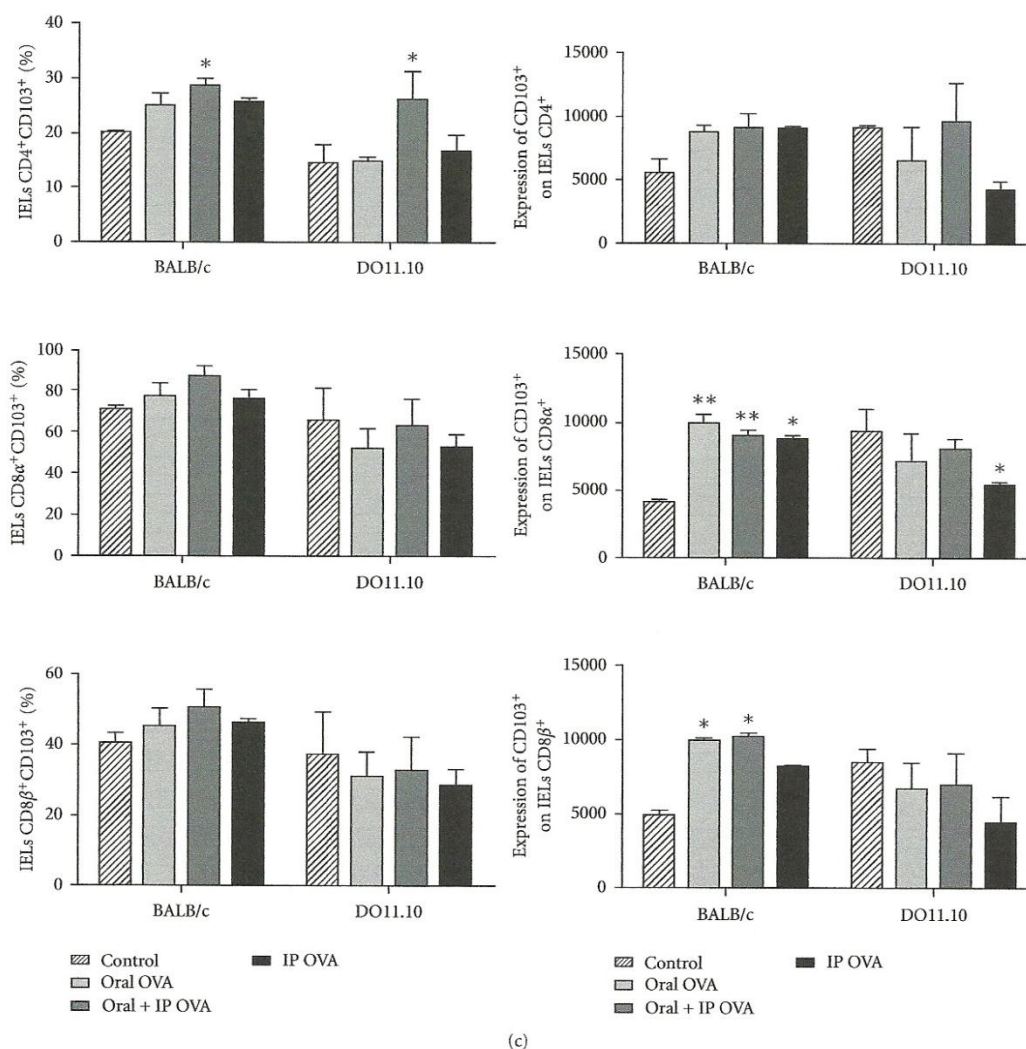


FIGURE 3: Effects of the treatments with OVA on the frequency of CD103⁺ cells in the small intestine. Freshly isolated IELs from BALB/c (a) and DO11.10 (b) mice were gated for CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8α⁺, and CD3⁺/CD8β⁺ cells and analyzed for expression of CD103 by flow cytometry. Blank histograms indicate isotype control staining. CD3⁺/CD8β⁺ subset illustrated at the right column is part of the CD3⁺/CD8α⁺ population. (c) Data represent mean ± SEM (N = 5) in three independent experiments. Frequency of CD4⁺ cells were significantly more elevated in IELs isolated from mice BALB/c and DO11.10 treated with OVA by oral + ip routes. The expression of CD103 was markedly augmented in all subpopulations of IELs of OVA-treated BALB/c mice and was reduced in DO11.10 immunized by ip route.

of TH1/TH2, with prevalence of a TH1 pattern [12]. In this work, we observed that even before the oral treatment with OVA, the DO11.10 mice have showed morphological modifications in the intestinal epithelium villi and of the muscular layer in the intestinal tissue. Our results showed a deepening of changes in the epithelium of small intestine in DO11.10 mice treated with OVA, which are consistent to an inflammatory process. These changes have not been observed in the intestinal epithelium of BALB/c mice, which have been presented a good preservation of the villi. A chronic

inflammatory process, with lymphocytic infiltration in the lamina propria and increased number of IELs in the epithelium has been shown in double-transgenic mice that express the haemagglutinin from influenza virus A (HA) and TCR HA-specific. The inflammatory reaction, however, is kept under control by the generation of regulatory T cells [14].

Deletion of self-reactive lymphocytes constitutes one of main mechanisms of peripheral tolerance induction and probably of oral tolerance induction [21, 22]. Conversely, intestinal inflammation has been correlated with failure in

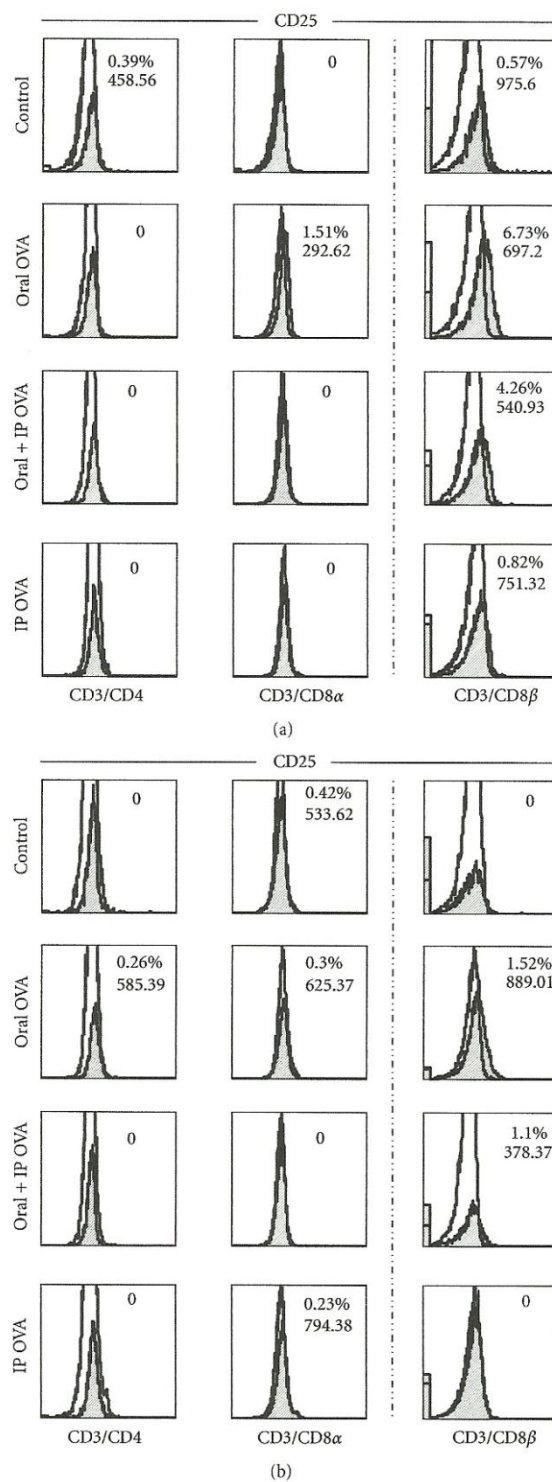
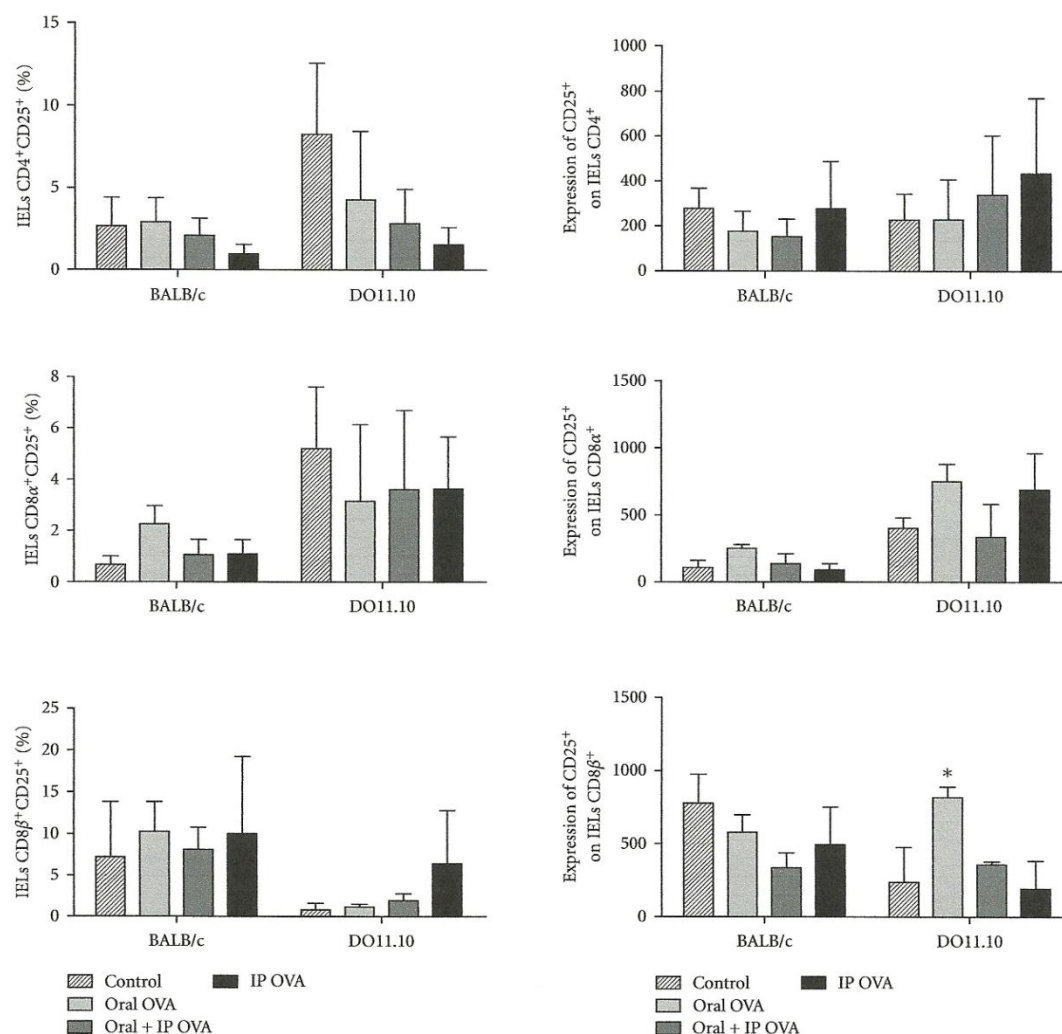


FIGURE 4: Continued.



(c)

FIGURE 4: Effects of the treatments with OVA on the frequency of CD25⁺ cells in the small intestine. Freshly isolated IELs from BALB/c (a) and DO11.10 (b) mice were gated for CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8α⁺, and CD3⁺/CD8β⁺ cells and analyzed for expression of CD25 by flow cytometry. Blank histograms indicate isotype control staining. CD3⁺/CD8β⁺ subset illustrated at the right column is part of the CD3⁺/CD8α⁺ population. (c) Data represent mean \pm SEM ($N = 5$), in three independent experiments. An increased frequency of CD25⁺ cells can be observed only in CD8β subset of IELs from DO11.10 mice treated with OVA by oral route.

the induction of apoptosis in lymphocytes present in the mucosa [23]. The initial hypothesis of our study was that resistance to the induction of oral tolerance in DO11.10 might be due to failure in the deletion of OVA-specific lymphocytes in the intestinal mucosa after ingestion of the antigen. Indeed, treatment with OVA by oral and/or ip routes resulted in reduction of IELs in the DO11.10 mice. Besides that, a remarkable reduction in OVA-specific cells (KJ1-26) was observed in small intestine of DO11.10 mice treated with OVA. Previous work has shown that the administration

of OVA results in marked reduction of mature lymphocytes KJ1-26⁺ in the blood and peripheral lymphoid organs [16]. However, a substantial portion of the IELs and lymphocytes from LP from the DO11.10 mice carries a second nonclonotypal TCR, probably due to the incomplete allelic exclusion of the endogenous TCRα during the rearrangement process in the thymus [21, 24]. Part of the alternative TCR seems to be specific to antigens from the intestinal environment as DO11.10/SCID or DO11.10/RAG2^{-/-} mice do not exhibit reactivity to antigens from the intestinal microbiota [25, 26].

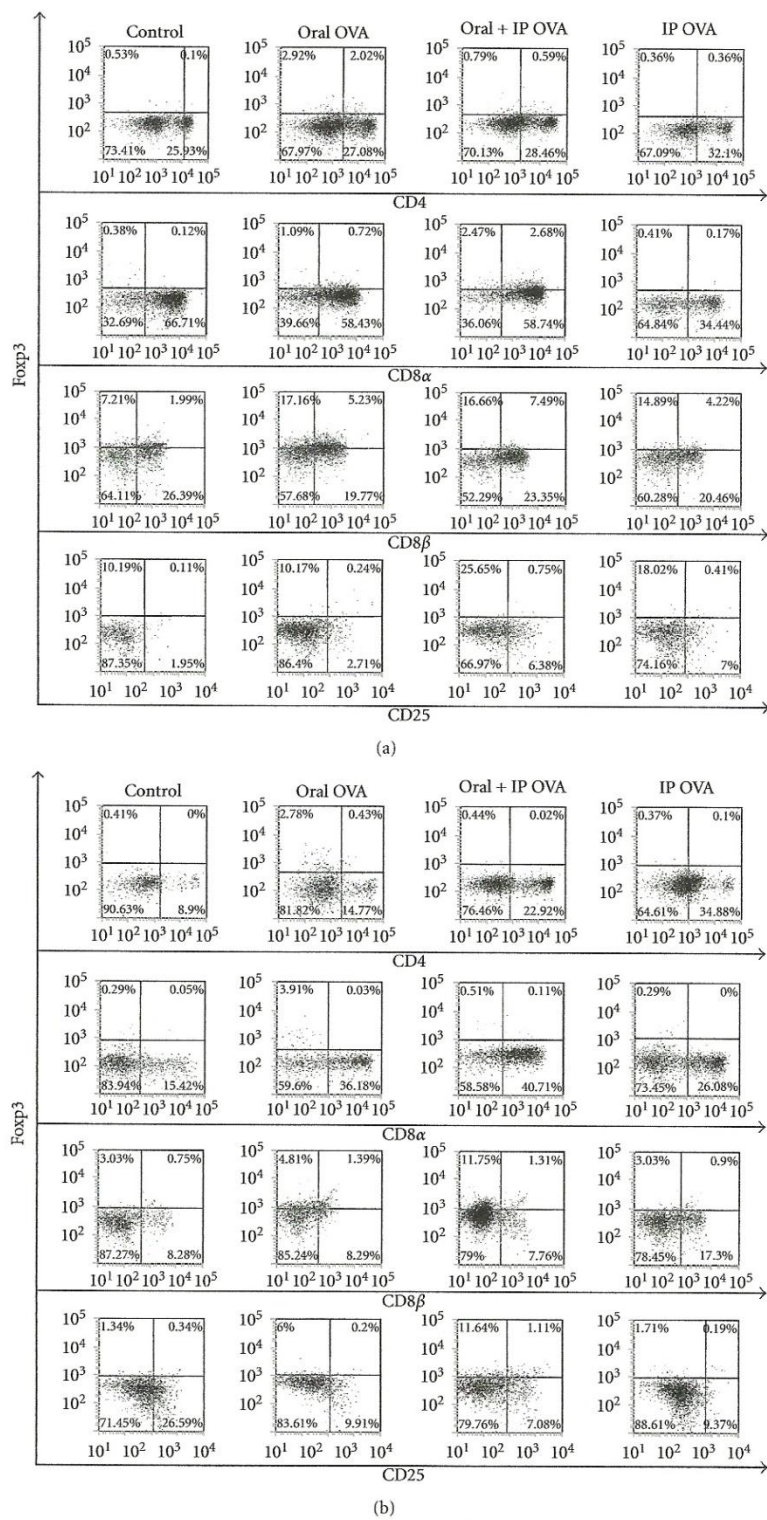


FIGURE 5: Continued.

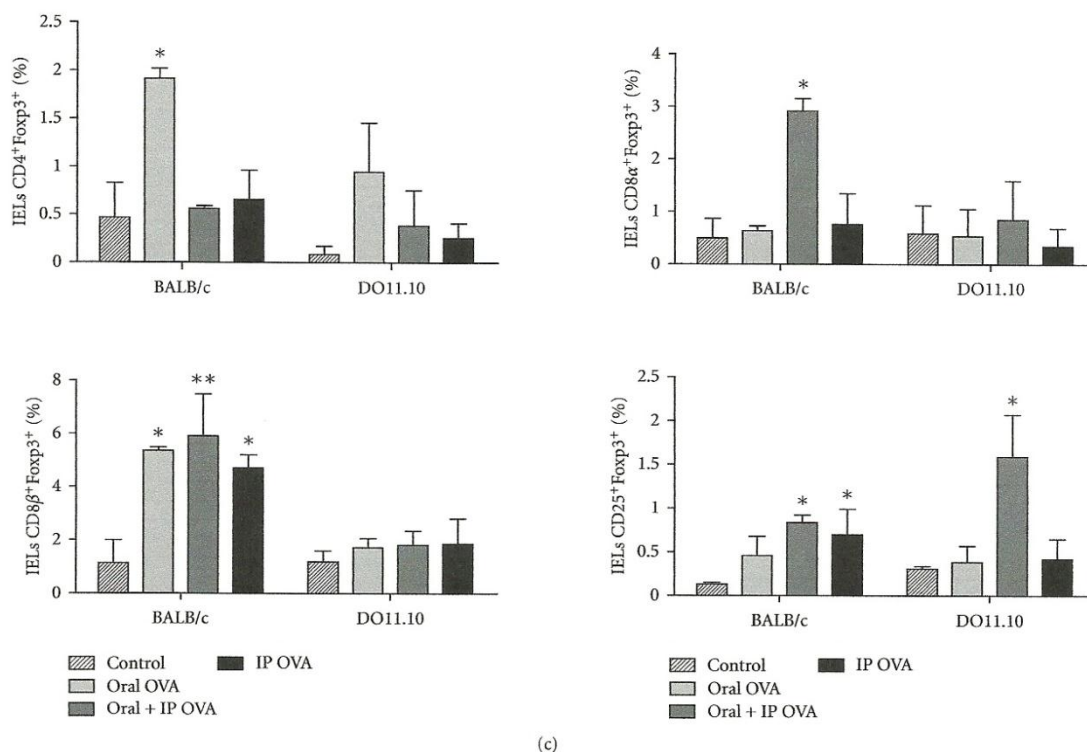


FIGURE 5: Effects of the treatments with OVA on the frequency of Foxp3⁺ cells in the small intestine. IELs were isolated from BALB/c (a) and DO11.10 (b) mice, and the frequency of Foxp3⁺ cells were analyzed on for CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8α⁺, and CD3⁺/CD8β⁺ cells. (c) Data represent mean ± SEM (N = 5), in three independent experiments. Treatments of BALB/c mice with OVA resulted in increase of the frequency of Foxp3⁺ cells in all IEL populations. The oral + ip treatment of DO11.10 mice has increased the frequency of Foxp3⁺ cells in IELs CD25⁺.

Thus, a possible explanation for the escape of DO11.10 from oral tolerance in spite of the occurrence of TCR OVA-specific cells deletion would be the activation of T cells bearing alternative TCR, that would result in local inflammatory response, with activation of nontransgenic IELs carrying TCR to other than OVA epitopes.

The IELs have phenotype similar to either effector or effector memory of cells that are present in other peripheral lymphoid organs [27], presenting a high expression of the CD103 marker (αEβ7), an α-integrin responsible for the retention of IELs in the intestinal epithelium [28]. This molecule has been associated to the immunoregulation in the mucosa as it is expressed by regulatory T lymphocytes [29, 30] as well as by dendritic cells involved in the generation of regulatory T cells [31, 32]. IELs from small intestine of the BALB/c mice treated with OVA orally and/or parenteral have shown marked increase in the expression of CD103, in all populations studied: TCD4, TCD8α, and TCD8β. Furthermore, IELs from orally treated DO11.10 mice have shown no changes in the expression of CD103 in any cell subset. In contrast, TGN immunized intraperitoneally with OVA showed an accentuated reduction in the expression of CD103 in these cells.

Several populations of regulatory cells have been described in oral tolerance, including IL-10 producer cells termed Tr1, TGF-β producing cells called Th3 and TCD4⁺/CD25⁺, and its relative importance in the establishment of oral tolerance is still under investigation [1, 20]. Some of these studies have emphasized the role of the CD8αα IELs in the immunoregulation that occurs in the intestinal mucosa [33, 34]. In this work, we did not observe changes in the frequency of this subset of IELs in either BALB/c or DO11.10 mice immunized orally or parenterally with OVA.

There is a consensus in the literature that the oral tolerance is related to the induction of antigen-specific regulatory T cells either by direct or cross-presentation of antigens from the enterocytes [20, 21, 34]. Our results have shown that the ingestion of OVA led to an increase in the frequency of TCD4⁺/Foxp3⁺, TCD8α⁺/Foxp3⁺, TCD8β⁺/Foxp3⁺, and TCD25⁺/Foxp3⁺ amongst the IELs of BALB/c mice, thus indicating that the establishment of tolerance in wild-type mouse are associated with the increase of regulatory T cells. The frequency of TCD25⁺/Foxp3⁺ cells has also increased in the IELs from TGN treated with OVA by oral + ip routes. However, this increase has not been sufficient to inhibit the

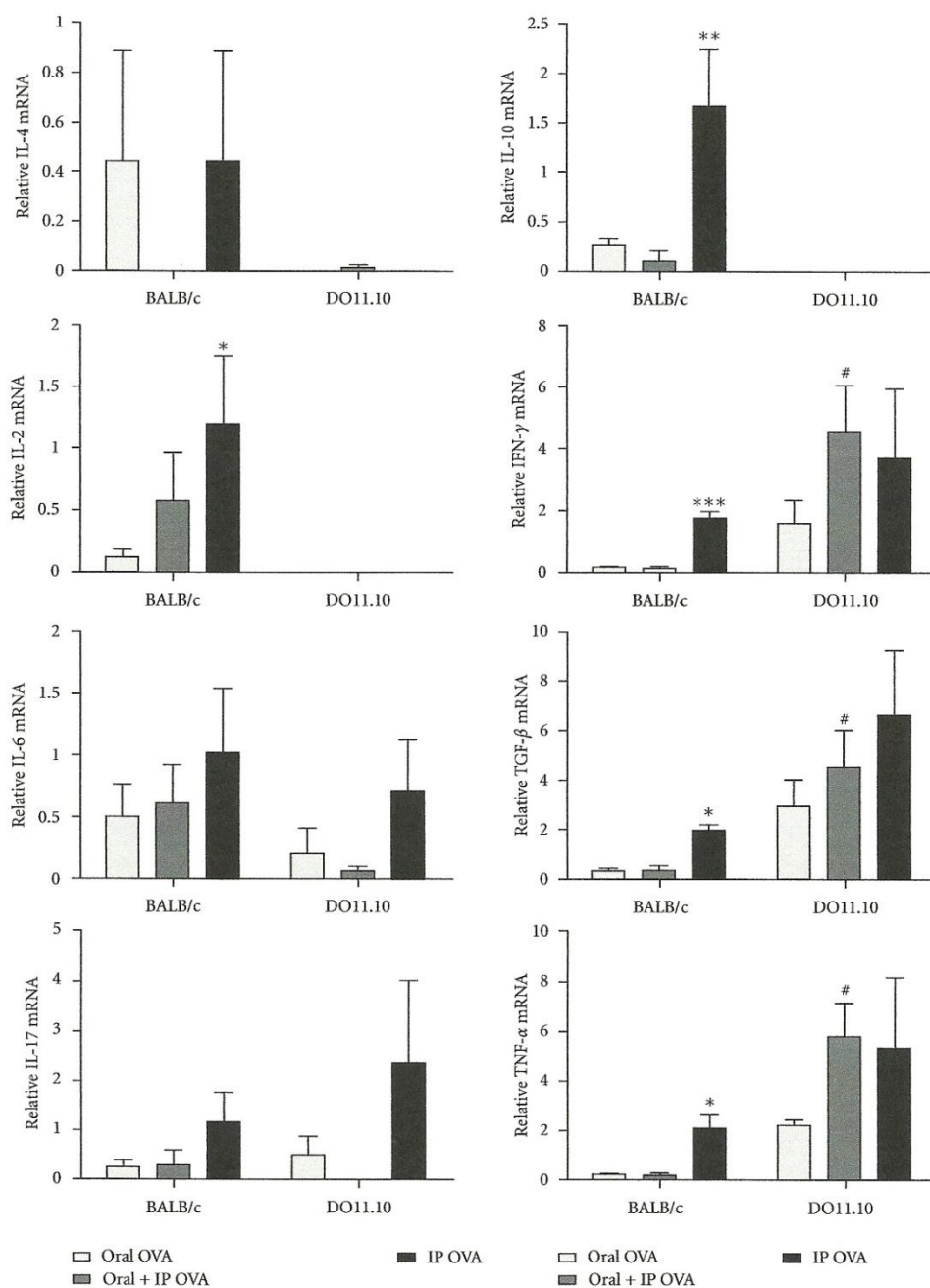


FIGURE 6: Quantitative mRNA analysis of cytokine expression in intestinal IELs. Total RNA was extracted from freshly isolated IELs of BALB/c and DO11.10 mice ($N = 5$), and cDNA of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α , and TGF- β was made using PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, SP, Brazil). Quantitative PCR analysis was performed with the ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems), in four replicates, with the TaqMan Mastermix (Applied Biosystems). Samples were normalized to 18S rRNA, and an arbitrary value of 1 was given to control group (naïve mice) for the normalization, and the remaining samples were plotted relative to that value. IELs from BALB/c mice immunized by ip route show an increase in the expression of mRNA of cytokines IL-10, IL-2, IFN- γ , TGF- β , and TNF- α . IELs from DO11.10 mice fed with OVA and challenged by ip route showed increased expression of mRNA for cytokines IFN- γ , TGF- β , and TNF- α . The results are representative of three independent experiments.

inflammation that has settled in the small intestinal mucosa of the TGN after treatment with the protein.

TCD8⁺ cells also play an important role in the homeostatic maintenance of the intestinal epithelium. In this regard, TCD8 $\alpha\beta$ suppressor cells have been correlated with the establishment of antigen specific oral tolerance [30, 35, 36]. Although the ingestion of OVA leads to an increase in the frequency of Foxp3⁺ cells in all populations of IEL from both BALB/c and DO11.10 mice, our results showed that it is in the TCD8 β ⁺ population of IELs that occurs the highest frequency of cells carrying this suppression marker.

Due to the exposure of mucosal epithelium to a huge amount of strange antigens, the cytokines IFN- γ and interleukin-(IL)-4 are produced spontaneously under physiological conditions by IELs [37]. In our study, we observed that the expression of IL-2, IL-10, IFN- γ , TGF- β , and TNF- α mRNA was smaller in IELS from BALB/c mice fed OVA and then challenged by ip route than in those that received OVA only by ip route; the levels of IL-17 and IL-6 mRNA were also reduced, but not significantly, in IELS from BALB/c mice. Instead, IELS from transgenic mice of the oral + ip group showed levels of IL-6, IFN- γ , TGF- β , and TNF- α mRNA similar to or higher than the animals immunized only by ip route.

The cytokines IL-10 and TGF- β were always related to anti-inflammatory reactions [1, 20]. More recently, however, these cytokines have been associated with inflammatory reactions by activating the process of differentiation of Th17 cells [38, 39]. TCD4⁺ cells that secrete IL-17, Th17 cells, are pathogenic in autoimmune diseases, and their development and expansion is driven by the cytokines IL-6, TGF- β , IL-21, IL-1, and IL-23 [39, 40]. Recent studies have revealed a considerable number of IL-17-producing cells amongst the TCD4⁺ cells in the intestinal mucosa [41]. Although these cells are important to establish a protective immune response against intestinal bacteria, they can also be responsible for inducing inflammatory response and the development of immunological disorders in the presence of IL-6 and/or IL-23 at mucosal sites [41, 42]. Despite the natural occurrence of higher expression of IL-6, TGF- β , and TNF- α mRNA in the DO11.10 IELS than in those of BALB/c mice, there was no significant change in IL-17 mRNA after administration of OVA orally and/or ip in both BALB/c and DO11.10 mice.

Th1-mediated immune responses are considered to be the primary mediators of most autoimmune and chronic inflammatory diseases. Th17, however, has emerged as a key protagonist in a number of inflammatory diseases. It has been shown that CD8⁺ Treg cells can suppress both Th1 and Th17 responses, being capable of mediating oral tolerance to OVA independently of their CD4⁺ counterparts in a normal immune system [43]. In the present work, the increase in the frequency of CD8 $\alpha\beta$ ⁺Foxp3⁺ cells among IELS of BALB/c mice after ingestion of OVA could explain the absence or reduced expression of IL-6, TGF- β , TNF- α , and IFN- γ .

Recent studies have shown that inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis and Crohn's disease may be related to the loss of tolerance to self-antigens or normal flora [44]. Our results indicate that the structural disorder observed in epithelium of intestinal villi of transgenic mice

would be a consequence of the preferential expression of pro-inflammatory cytokines by their IELs, in the absence of an efficient immunoregulation. This inflammatory state in intestinal environment may contribute to the impairment of oral tolerance to OVA in DO11.10 mice.

5. Conclusion

Taken together, the results of this study indicate that exposure to OVA orally causes IELs of the small intestine of TGN mice assume inflammatory characteristics, whereas in BALB/c antigen intake leads to the development of IELs with characteristics of regulatory cells. Thus, we speculate that the establishment of oral tolerance in transgenic mice is severely impaired by changes in the amounts and arrangements of T cells during the development of intestinal tissues that compromise the cellular interactions involved in the processes of mucosal immunity.

Abbreviations

GALT:	Gut-associated lymphoid tissue
IBD:	Inflammatory bowel disease
IELs:	Intestinal epithelial cells
IFN- γ :	Interferon- γ
LP:	Lamina propria
MLN:	Mesenteric lymph node
OVA:	Ovalbumin
PP:	Peyer's patch
TGF- β :	Transforming growth factor- β
TCR:	T-cell receptor
TGN:	Transgenic mice
mAb:	Monoclonal antibody.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP no. 2005/51520-8); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq no. 474074/2004-8); Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão da UNICAMP (FAPEX no. 86256).

References

- [1] B. Dubois, A. Goubier, G. Joubert, and D. Kaiserlian, "Oral tolerance and regulation of mucosal immunity," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 62, no. 12, pp. 1322–1332, 2005.
- [2] A. Friedman and H. L. Weiner, "Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 14, pp. 6688–6692, 1994.
- [3] Y. Chen, J. I. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V. K. Kuchroo, and H. L. Weiner, "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance," *Nature*, vol. 376, no. 6536, pp. 177–180, 1995.
- [4] H.-O. Lee, S. D. Miller, S. D. Hurst, L. J. Tan, C. J. Cooper, and T. A. Barrett, "Interferon gamma induction during oral tolerance reduces T-cell migration to sites of inflammation," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 1, pp. 129–138, 2000.
- [5] N. Parameswaran, D. J. Samuvel, R. Kumar et al., "Oral tolerance in T cells is accompanied by induction of effector

- function in lymphoid organs after systemic immunization," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 7, pp. 3803–3811, 2004.
- [6] A. M. Mowat, "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens," *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 4, pp. 331–341, 2003.
 - [7] E. A. Toussiot, "Oral tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis," *Current Drug Targets—Inflammation & Allergy*, vol. 1, no. 1, pp. 45–52, 2002.
 - [8] J. Kunisawa, I. Takahashi, and H. Kiyono, "Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine," *Immunological Reviews*, vol. 215, no. 1, pp. 136–153, 2007.
 - [9] A. Hayday, E. Theodoridis, E. Ramsburg, and J. Shires, "Intraepithelial lymphocytes: exploring the third way in immunology," *Nature Immunology*, vol. 2, no. 11, pp. 997–1003, 2001.
 - [10] L. Lefrançois, "Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine," *The Journal of Immunology*, vol. 147, no. 6, pp. 1746–1751, 1991.
 - [11] H. C. Wang, Q. Zhou, J. Drago, and J. R. Klein, "Most murine CD8⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes are partially but not fully activated T cells," *The Journal of Immunology*, vol. 169, no. 9, pp. 4717–4722, 2002.
 - [12] P. Simioni, L. G. R. Fernandes, D. L. Gabriel, and W. M. S. C. Tamashiro, "Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 60, no. 3, pp. 257–266, 2004.
 - [13] H. Tamauchi, Y. Yoshida, T. Sato et al., "Oral antigen induces antigen-specific activation of intraepithelial CD4⁺ lymphocytes but suppresses their activation in spleen," *Immunobiology*, vol. 210, no. 9, pp. 709–721, 2005.
 - [14] A. M. Westendorf, M. Templin, R. Geffers et al., "CD4⁺ T cell mediated intestinal immunity: chronic inflammation versus immune regulation," *Gut*, vol. 54, no. 1, pp. 60–69, 2005.
 - [15] M. Goto, S. Hachimura, A. Ametani et al., "Antigen feeding increases frequency and antigen-specific proliferation ability of intraepithelial TCD4⁺ T cells in a $\alpha\beta$ T cell receptor transgenic mice," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 67, pp. 1223–1229, 2003.
 - [16] K. M. Murphy, A. B. Heimberger, and D. Y. Loh, "Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo," *Science*, vol. 250, no. 4988, pp. 1720–1723, 1990.
 - [17] D. Montufar-Solis and J. R. Klein, "An improved method for isolating intraepithelial lymphocytes (IELs) from the murine small intestine with consistently high purity," *Journal of Immunological Methods*, vol. 308, no. 1–2, pp. 251–254, 2006.
 - [18] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
 - [19] T. A. Kraus, L. Toy, L. Chan, J. Childs, and L. Mayer, "Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, vol. 126, no. 7, pp. 1771–1778, 2004.
 - [20] L. Saurer and C. Mueller, "T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract," *Allergy*, vol. 64, no. 4, pp. 505–519, 2009.
 - [21] Z. Liu and L. Lefrançois, "Intestinal epithelial antigen induces mucosal CD8 T cell tolerance, activation, and inflammatory response," *The Journal of Immunology*, vol. 173, no. 7, pp. 4324–4330, 2004.
 - [22] F. C. Magnusson, R. S. Liblau, H. Von Boehmer et al., "Direct presentation of antigen by lymph node stromal cells protects against CD8 T-cell-mediated intestinal autoimmunity," *Gastroenterology*, vol. 134, no. 4, pp. 1028–1037, 2008.
 - [23] A. Di Sabatino, R. Ciccocioppo, S. D'Alò et al., "Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in fas based cytotoxicity in coeliac disease," *Gut*, vol. 49, no. 3, pp. 380–386, 2001.
 - [24] S. D. Hurst, S. M. Sitterding, S. Ji, and T. A. Barrett, "Functional differentiation of T cells in the intestine of T cell receptor transgenic mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 8, pp. 3920–3925, 1997.
 - [25] A. Saparov, L. A. Kraus, Y. Cong et al., "Memory/effector T cells in TCR transgenic mice develop via recognition of enteric antigens by a second, endogenous TCR," *International Immunology*, vol. 11, no. 8, pp. 1253–1263, 1999.
 - [26] P. Zhou, R. Borojevic, C. Streutker, D. Snider, H. Liang, and K. Croitoru, "Expression of dual TCR on do11.10 T cells allows for ovalbumin-induced oral tolerance to prevent T cell-mediated colitis directed against unrelated enteric bacterial antigens," *The Journal of Immunology*, vol. 172, no. 3, pp. 1515–1523, 2004.
 - [27] H. Cheroutre and L. Madakamutil, "Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line," *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 4, pp. 290–300, 2004.
 - [28] C. M. Parker, K. L. Cepek, G. J. Russell et al., "A family of $\beta 7$ integrins on human mucosal lymphocytes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 5, pp. 1924–1928, 1992.
 - [29] J. Lehmann, J. Huehn, M. De la Rosa et al., "Expression of the integrin $\alpha\beta 7$ identifies unique subsets of CD25⁺ as well as CD25⁻ regulatory T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 20, pp. 13031–13036, 2002.
 - [30] J. Ho, C. C. Kurtz, M. Naganuma, P. B. Ernst, F. Cominelli, and J. Rivera-Nieves, "A CD8⁺/CD103^{high} T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis," *The Journal of Immunology*, vol. 180, no. 4, pp. 2573–2580, 2008.
 - [31] O. Annacker, J. L. Coombes, V. Malmstrom et al., "Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, no. 8, pp. 1051–1061, 2005.
 - [32] K. R. Siddiqui and F. Powrie, "CD103⁺ GALT DCs promote Foxp3⁺ regulatory T cells," *Mucosal Immunology*, vol. 1, supplement 1, pp. S34–S38, 2008.
 - [33] P. Poussier, T. Ning, D. Banerjee, and M. Julius, "A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 195, no. 11, pp. 1491–1497, 2002.
 - [34] M. Rimoldi, M. Chieppa, V. Salucci et al., "Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells," *Nature Immunology*, vol. 6, no. 5, pp. 507–514, 2005.
 - [35] M. B. Feinberg and G. Silvestri, "TS cells and immune tolerance induction: a regulatory renaissance?" *Nature Immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 215–217, 2002.
 - [36] A. M. Westendorf, D. Fleissner, S. Deppenmeier et al., "Autoimmune-mediated intestinal inflammation impact and regulation of antigen-specific CD8⁺ T Cells," *Gastroenterology*, vol. 131, no. 2, pp. 510–524, 2006.
 - [37] M. Carol, A. Lambrechts, A. Van Gossum, M. Libin, M. Goldman, and F. Mascart-Lemone, "Spontaneous secretion of

- interferon γ and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes," *Gut*, vol. 42, no. 5, pp. 643–649, 1998.
- [38] M. O. Li, Y. Y. Wan, and R. A. Flavell, "T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation," *Immunity*, vol. 26, no. 5, pp. 579–591, 2007.
 - [39] T. A. Wynn, "TH-17: a giant step from TH1 and TH2," *Nature Immunology*, vol. 6, no. 11, pp. 1069–1070, 2005.
 - [40] C. E. Sutton, S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Brereton, E. C. Lavelle, and K. H. G. Mills, "Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity," *Immunity*, vol. 31, no. 2, pp. 331–341, 2009.
 - [41] K. Honda and K. Takeda, "Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria," *Mucosal Immunology*, vol. 2, no. 3, pp. 187–196, 2009.
 - [42] A. Kitani and L. Xu, "Regulatory T cells and the induction of IL-17," *Mucosal Immunology*, vol. 1, supplement 1, pp. S43–S46, 2008.
 - [43] P. M. Arnaboldi, F. Roth-Walter, and L. Mayer, "Suppression of Th1 and Th17, but not Th2, responses in a CD8+ T cell-mediated model of oral tolerance," *Mucosal Immunology*, vol. 2, no. 5, pp. 427–438, 2009.
 - [44] M. Boirivant, A. Amendola, and A. Butera, "Intestinal microflora and immunoregulation," *Mucosal Immunology*, vol. 1, supplement 1, pp. S47–S49, 2008.