

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica- Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Efeito imunomodulatório do resveratrol em células do sistema imune *in vitro* e na administração via oral de ovalbumina em camundongos.

Patricia Barros dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Patrícia Barros dos
S237e Efeito imunomodulatório do resveratrol em células do sistema imune *in vitro* e na administração via oral de ovalbumina em camundongos / Patrícia Barros dos Santos. -- São Paulo, 2010.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Stephano, Marco Antônio

1. Imunologia : Farmacologia I. T. II. Stephano, Marco Antônio, orientador.

615.37 CDD

Patricia Barros dos Santos

Efeito imunomodulatório do resveratrol em células do sistema imune
in vitro e na administração oral de ovalbumina em camundongos

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico esse trabalho ao meu amigo e marido Márcio, a minha filha querida Kaori e a minha mãe Lucimar que sempre me apoiaram e permitiram que esse sonho se realizasse.

*"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Marco Antônio Stephano, orientador e amigo, pelo grande estímulo em todas as etapas, permanente disponibilidade e apoio para realização dessa dissertação.

À Profa. Dra Thereza Christina Vessoni Penna, ao Prof Dr. Adalberto Pessoa Jr. e Prof Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho e seus alunos por permitirem o uso de equipamentos e apoio em diversos momentos.

Ao Dr. Jorge M. C. Ferreira Jr, do Laboratório de Imunoquímica/Instituto Butantan pelo uso do citômetro de fluxo e ajuda na interpretação de resultados.

Aos colegas do Laboratório de Imunobiológicos e Biofármacos, Patrícia, Jony, Fernanda, Laura e Marnen pela paciência e auxílio através de discussões e nos procedimentos experimentais.

Ao especialista Dr. Dante Augusto Moraes e à secretaria do departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica pela amizade e apoio na realização dessa dissertação.

À CAPES e FAPESP, pois sem o apoio institucional através da bolsa e financiamento do projeto, esse mestrado não seria possível.

E aos meus avós Maria Alice e Antônio que com muito carinho e amor me ajudaram a ser uma pessoa feliz e realizada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE GRÁFICOS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Resveratrol	16
1.2. Resposta imune:.....	18
1.3. Imunidade da mucosa intestinal	22
1.4. Adjuvantes de Vacinas	27
1.5. Administração Oral de Antígenos e Tolerância	32
1.6. Efeito imunomodulatório do Resveratrol:.....	34
2. OBJETIVOS:.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS:	40
3.1. Produção de óxido nítrico:.....	40
3.2. Ensaio de MTT	41
3.3. Ensaio de Endocitose:.....	41
3.4. Isolamento dos linfócitos da placa de peyer.....	42

3.5. Ensaio de secreção citocinas e citotoxicidade com células da placa de peyer:	42
3.6. Quantificação das citocinas IL-6 e IL-10:.....	43
3.7. Imunização via oral (VO)	43
3.8. Obtenção do lavado intestinal	44
3.9. Obtenção dos esplenócitos:	44
3.10. Cultura de esplenócitos para dosagem da citocina IL-10.....	45
3.11. Titulação de anticorpos anti-OVA (IgG e IgA)	45
3.12. Análise estatística:	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	47
4.1. Atividade inibitória do resveratrol sobre macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS:.....	47
4.2. Efeito na captação de proteína por macrófagos Raw 264.7 pelo resveratrol:	49
4.3. Efeito sobre a secreção de IL-6 e IL-10 em células de placas de Peyer:51	
4.4. Influência da administração oral de resveratrol em camundongos BALB/C na secreção de IL-10 em esplenócitos:.....	54
4.5. Influência da administração oral de resveratrol e ovalbumina em camundongos BALB/C na secreção de IL-10 em esplenócitos:.....	56
4.6. Efeito do resveratrol na produção de IgG anti-OVA:	59
4.7. Efeito do resveratrol na produção de IgA em soro e lavado intestinal específicos para ovalbumina:.....	62
5. CONCLUSÕES:.....	66

6. REFERÊNCIAS	68
7. ANEXOS:.....	75
7.1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	75
7.2. Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	75
7.3. Currículo lattes	75
7.4. Ficha do Aluno.....	75

LISTA DE TABELAS

*Tabela 1: Efeito sobre secreção de IL-6 e IL-10 em células de placas de peyer após os diferentes tratamentos com LPS (1 µg/ml) Con A (2,5 µg/mL) e resveratrol (5 µM, 50 µM) por 72 h. A dosagem de IL-6 em células não estimuladas foi de 58,9 ± 14,5 pg/mL e de IL-10 foi 12,7 ± 9,1 pg/mL. DMSO 0,05% é a quantidade existente na concentração de 50 µM de resveratrol *p< 0,05. n = 3 52*

Tabela 2: *Tabela de Pesos dos animais utilizados no Ensaio in vivo (média ± DP) As imunizações foram realizadas 2x com 14 dias de diferença. Após 21 dias de experimento os animais foram sacrificados. n=5. a: p < 0,05, significância em relação ao grupo controle ; b: p< 0,05, significância em relação ao grupo de tratamento com Resveratrol 5 mg/kg; c: p< 0,01, significância em relação ao grupo de tratamento com Resveratrol 10mg/kg..... 59*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Estrutura química do Resveratrol (trans-3,5,4 trihidroxiestilbeno).... 17*

Figura 2: *Representação dos elementos que representam o tecido linfoide associado a mucosa intestinal(GALT). Linfócitos intraepiteliais (IEL's - intraepithelial lymphocytes), linfócitos da lâmina própria (LPL), folículo associado epitélio (FAE- follicle-associated epithelium). Figura adaptada. (MEHANDRU; TENNER-RACZ; RACZ, 2005)..... 24*

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico das diferentes concentrações de resveratrol sobre a cultura de macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml) por 24 h. Controle: só LPS (30,10 ± 5,65 µM); **p < 0,01. n = 347

Gráfico 2: Efeito sobre a captação de BSA-FITC em macrófagos após os diferentes tratamentos com LPS (1 µg/ml) e resveratrol (6,25µM a 100 µM) por 24 h. *p < 0,05. n = 3. IFM: Intensidade de Fluorescência Média. 50

Gráfico 3: Efeito sobre secreção de IL-10 em esplenócitos após a administração oral de Resveratrol (5 mg/kg e 10 mg/kg). Os esplenócitos foram isolados em grupos e plaqueados em triplicata por 48 horas. **p < 0,01..... 55

Gráfico 4: Efeito sobre secreção de IL-10 em esplenócitos após a administração oral de Resveratrol (5 mg/kg e 10 mg/kg) com ovalbumina 1mg/animal. As imunizações foram realizadas 2x com 14 dias de diferença. Após 21 dias de experimento os animais foram sacrificados. Os esplenócitos foram isolados em grupos e plaqueados em triplicata por 48 horas. Gráfico A: Estímulo in vitro com Ovalbumina 10 µg/mL; Gráfico B: Estímulo in vitro com Concanavalina A. *p < 0,05, **p < 0,01..... 58

Gráfico 5: Efeito sobre a produção de IgG anti-OVA total após a administração concomitante de ovalbumina (1mg) e resveratrol 5mg/kg e 10 mg/kg. Densidade ótica (D.O.) do teste para detecção de IgG anti-OVA nos soros diluídos 1/16 de animais BALB/C imunizados via oral e controle. Dosagens realizadas em duplicata..... 62

Gráfico 6: Efeito modulador do resveratrol na produção de IgA sérico (A) e no lavado intestinal (B) na imunização oral com 1 mg de ovalbumina de camundongos Balb/c. **p < 0,01. Dosagens realizadas em duplicata..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 – (*activator protein -1*) – proteína ativadora é um fator de transcrição e possui uma variedade de estímulos a células e ao sistema imunológico.

APC – (*antigen presenting cell*) - célula apresentadora de antígeno

ATCC – *American Type Culture Collection*

BSA-FITC - (*bovine serum albumin-Fluorescein isothiocyanate*)-albumina bovina ligada ao isotiocianato de fluoresceína

CCR9 – (*chemokine receptor type 9*) – receptor de quimiocina tipo 9 – existentes na membrana de células dendríticas plasmocitoides.

CD4 – (*cluster of differentiation 4*) – grupamento de diferenciação 4 – encontrado em células T auxiliar ativadas.

CD40L – (*cluster of differentiation 40 ligant*) – grupamento de diferenciação ligante do CD40 – encontrado nas células T.

CD8 – (*cluster of differentiation 8*) – grupamento de diferenciação 8 – encontradas em células T citotóxicas ativadas.

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

ConA – Concanavalina A

COX-2 – ciclo-oxigenase tipo 2

CTL - (*citotoxic T lymphocytes*) - linfócitos T citotóxicos

DC – célula dendrítica

DMSO - dimetilsulfóxido

DO – densidade óptica

ELISA – (*enzyme linked immunosorbent assay*) - ensaio imunoenzimático

eNOS - enzima óxido nítrico sintase endotelial

EM – espectrofotometria de massa

FAE – epitélio intestinal associado ao folículo

FDA – (*Food and Drug Administration*)

FITC- (*fluorescein isothiocyanate*) – Isotiocianato de Fluoresceína

GALT (*gastro-intestinal associated lymphoid tissue*) - tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal

HLA – (*human leukocyte antigen*) – antígeno de leucócito humano

ICAM - (*inter-cellular adhesion molecule*) – molécula de adesão intercelular

IEL's (*intraepithelial lymphocytes*) - linfócitos intraepiteliais

IFN- γ – interferon-gama

IL – interleucina

IgA – imunoglobulina A

IgG – imunoglobulina G

iNOS – (*inducible NO synthase*) – óxido nítrico sintetase indutível

LPS – lipopolissacarídeo

LT – linfócito T

MAPK – (*mitogen-activated protein kinases*) - proteína-quinase mitógeno ativado

MCP1 – quimiocina que atua sobre CCR2 presentes em monócitos e Th2. Tem como função o recrutamento destas células.

MHC (*major histocompatibility complex*) - complexo de histocompatibilidade principal

μm - micrometro

MIP-1 α - quimiocina que atua sobre CCR1 e CCR5 presentes em monócitos, macrófagos e células Th1 ativadas. Tem como função o recrutamento de várias células leucocitárias.

MLN - linfonodos mesentéricos

MPL – (*monophosphoril lipid*) – lipídeo de monofosforil

NF- κB – (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

nm – nanômetro

NLR's – (*nod-like receptors*)

NO - (*nitric oxide*) - óxido nítrico

OVA - ovalbumina

PAMP's (*pathogens associated molecular patterns*) - padrões moleculares associados aos patógenos.

PBS – (*phosphate buffered saline*) – tampão salina fosfatada

PBS-T – (*phosphate buffered saline – tween*) – tampão salina fosfatada acrescida de Tween

pg – picogramas

PMA – forbol miristato acetato

PBMC - células mononucleares de sangue periférico

PP – placa de peyer

PRR's (*pattern-recognition receptors*) – receptores de reconhecimento de perfil

RANTES - quimiocina que atua sobre CCR1, CCR3 e CCR5 presentes em monócitos, células dendríticas e células T. Tem como função o recrutamento de células leucocitárias.

RIG-I – (*retinoic acid-inducible gene-I- like receptors*) receptor de ácido retinoico induzido semelhante ao gene I.

RLR's – (*RIG-I like receptors*) - receptor semelhante ao RIG-I

SD – (*standard deviation*) - desvio padrão

SED – (*subepithelial dome*) - Cúpula subepitelial

TGF- β - (*transforming growth factor beta*) – fator de transformação de crescimento beta

Th (*Helper*) - células T auxiliares

TLR (*toll-like receptors*) - receptores toll-like

TNF- α – (*tumoral necrosis factor alfa*) - fator de necrose tumoral-alfa

VCAM – (*vascular cell adhesion molecule*) – molécula vascular de adesão celular

VLP – (*virus like proteins*) – proteína semelhante a vírus

RESUMO

Efeito imunomodulatório do resveratrol em células do sistema imune *in vitro* e na administração via oral de ovalbumina em camundongos

O resveratrol, um polifenol de origem natural, é descrito como uma substância antiinflamatória, antioxidante, cardioprotetora e anticancerígena. Diversos estudos comprovam a atividade imunomodulatória do resveratrol *in vitro* e *in vivo*, estimulando ou diminuindo a secreção de citocinas envolvidas na resposta Th1/Th2. Além do uso em vacinas como adjuvantes, a descoberta de novas substâncias imunomodulatórias pode ser aplicada na profilaxia e tratamento de doenças imunodegenerativas com perda da tolerância sistêmica ou periférica. O objetivo desse estudo é relacionar o efeito modulador do resveratrol em ensaios de endocitose em macrófagos e de secreção de citocinas IL-6 (produção de IgA) e IL-10 (resposta Th2 e tolerância em mucosas) com a produção de anticorpos anti-ova IgG e IgA após imunização via-oral. Os resultados obtidos demonstraram que *in vitro*, houve aumento da endocitose em macrófagos e diminuição na secreção de IL-6 pelas células isoladas de placas de peyer em concentrações abaixo de 50 µM de resveratrol. Após a administração oral de resveratrol de 5 mg e 10 mg/kg observou-se o aumento significativo da secreção de IL-10 em esplenócitos isolados de camundongos Balb/C. Nos grupos imunizados com 1 mg de ovalbumina/animal e resveratrol (5 mg e 10 mg/kg) via oral 2 vezes, com 14 dias de intervalos, houve aumento significativo da produção de IgG sérico em relação ao grupo imunizado somente com ovalbumina. Porém a produção de IgA sérico e em lavado intestinal diminuiu, indicando um possível aumento da tolerância oral. Esses resultados demonstram o efeito imunomodulador do resveratrol *in vitro/in vivo* e a necessidade de maiores estudos sobre o uso desta substância como adjuvante de vacinas ou uma droga imunossupressora de mucosa.

Palavras chaves: Resveratrol. Citocinas. Imunidade de mucosa. Imunomodulação. Tolerância.

ABSTRACT

Immunomodulatory effects of resveratrol on immune cells in vitro and in oral administration of ovalbumin in mice.

Resveratrol, a polyphenol of natural origin, is described as a substance-inflammatory, antioxidant, cardioprotective and anticancer. Several studies have demonstrated the immunomodulatory activity of resveratrol in vitro and in vivo, stimulating or decreasing the secretion of cytokines involved in Th1/Th2 response. Besides the use as adjuvants in vaccines, the discovery of new immunomodulatory substances can be applied for prophylaxis and treatment of diseases immunodegenerativas with loss of peripheral tolerance or systemic. The aim of this study is to relate the modulating effect of resveratrol on tests of endocytosis in macrophages and secretion of IL-6 (IgA production) and IL-10 (Th2 response and mucosal tolerance) with the production of anti-ova IgG and IgA after oral immunization route. The results of in vitro tests showed an increase of endocytosis in macrophages and decrease in IL-6 secretion by cells isolated from Peyer's patches at concentrations below 50 mM of resveratrol. After oral administration of resveratrol 10 mg / kg was observed to significantly increase the secretion of IL-10 in splenocytes isolated from Balb / C. In groups immunized with 1 mg ovalbumin / animal and resveratrol (5 mg and 10 mg / kg) orally two times with 14 days intervals, were observed significant increase of IgG level in relation to the group immunized with ovalbumin only. But the production of IgA in serum and intestinal lavage decreased, indicating a possible increase in oral tolerance. These results demonstrate the immunomodulatory effect of resveratrol in vitro / in vivo and the need for more studies on substance use as a vaccine adjuvant or mucosal immunosuppressive drugs.

Keywords: Resveratrol. Cytokines. Mucosal immunity. Immunomodulation. Tolerance.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resveratrol

O resveratrol, um polifenol da classe dos estilbenos, foi primeiramente identificado em 1940 como um constituinte de raízes da planta *Veratum grandiflorum* O. Loes (TAKAOKA, 1940). Porém o uso medicinal do resveratrol para saúde humana foi descrito pela primeira vez no Tratado Indiano Ayurveda (2500 A.C), sobre ciência da longevidade. Esse documento continha o uso suco de uva (*Vitis vinifera* L.) como componente chave da “darakchasava” (suco fermentado de uvas vermelhas), uma preparação indiana bem conhecida utilizada até os dias de hoje como cardiotônico. Atualmente, se sabe, após análises de cromatografia de alta performance (CLAE), que o “darakchasava” tem como os principais componentes o resveratrol e pterostilbeno. (PAUL; MASI; DEOPUJARI, 1999).

Atualmente é extraído de uma planta chamada *Polygonium cuspidatum*, presente na Ásia e Japão, onde é utilizado em terapias contra artrite reumatoide. O extrato seco obtido rico em resveratrol também é consumido em forma de cápsulas de 20 ou 500 mg.

A existência do resveratrol foi popularizada em 1992 quando houve descoberta desse constituinte no vinho tinto e conseqüentemente sua ligação com o paradoxo francês (“French paradox”), um relato epidemiológico sobre a relação inversa entre o consumo de vinho tinto e a incidência de doenças do coração (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

Os polifenóis são metabólitos secundários derivados de plantas, com mais de 8000 estruturas identificadas, sendo as substâncias com propriedades antioxidantes mais presentes na dieta humana. (BRAVO, 1998) Sua estrutura básica contém 2 ou mais anéis fenólicos ligados e representam uma grande variedade de compostos, que são divididos em mais de 10 classes. As classes dos ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas são mais frequentemente encontradas em plantas.

Os estilbenos são compostos orgânicos que contém o 1,2-difeniletileno como grupo funcional, sendo um membro importante deste grupo o Resveratrol (3,5,4- trihidroxyestilbeno), o qual é encontrado naturalmente em diversas fontes de alimento(uvas, amendoins por ex.) como isômero geométrico *trans*, o qual quando exposto a luz ultravioleta se transforma no isômero *cis*, forma menos estudada e possivelmente farmacologicamente menos ativa. (Figura 1)

O *trans*-resveratrol em forma sólida pode ser estável por mais de 4 anos em condições de estabilidade acelerada (40°C e 70% de umidade) (PROKOP; ABRMAN; SELIGSON, 2006)

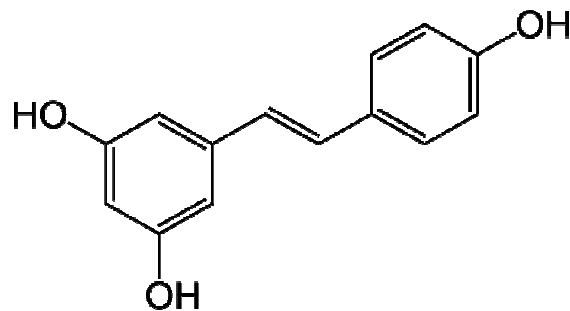


Figura 1: Estrutura química do Resveratrol (trans-3,5,4 trihidroxiestilbeno)

Esse polifenol vem recebendo enorme atenção durante décadas devido aos inúmeros relatos *in vitro* e *in vivo* de atividade anticancerígena, cardioprotetora, moduladora do sistema imune e na quimioprevenção. (PERVAIZ; HOLME; AGGARWAL, 2009)

Apesar das evidências sobre as atividades farmacológicas do Resveratrol, não está claro como a droga atinge os locais de ação, após ingestão oral, especialmente em humanos.

Estudos com a linhagem Caco-2 (linhagem epitelial humana isolada de adenocarcinoma colorretal) têm demonstrado que a absorção de resveratrol ocorre dentro de poucos minutos. (KALDAS; WALLE; WALLE, 2003)

Walle e colegas (2004) investigaram a absorção, biodisponibilidade e metabolismo do ^{14}C -resveratrol após doses orais em 6 voluntários humanos. A absorção de uma dose oral de 25 mg é de pelo menos 70%, com um nível plasmático de resveratrol e metabólitos de 491 ± 90 ng/mL (cerca de $2 \mu\text{M}$) e uma meia-vida plasmática de $9,2 \pm 0,6$ horas. Entretanto, somente traços de resveratrol não modificado ($< 5\text{ng/mL}$) puderam ser detectados. A maior parte da dose oral foi recuperada na urina e através da análise de CLAE e espectrometria de massa (EM). Foram identificadas três vias metabólicas: conjugação dos grupos fenólicos pelo ácido glicurônico, sulfato e a hidrogenação da dupla ligação alifática possivelmente realizada pela microbiota intestinal. (WALLE; HSIEH; DELEGGE, 2004)

1.2. Resposta imune:

O sistema imune de mamíferos tem sido dividido em sistema inato e adaptativo. A combinação desses dois sistemas permite ao organismo hospedeiro reconhecer e eliminar patógenos invasores, assim como proteger contra possíveis re-infecções. A imunomodulação desse sistema é de extrema importância e funções anormais podem ser vistas como a causa do desenvolvimento de doenças, como tumores ou na perda do reconhecimento “self/non-self”, como ocorre na autoimunidade.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra patógenos microbianos como as bactérias gram-positivos e gram-negativos, fungos e vírus. As principais células que compõe esse sistema são os macrófagos, células dendríticas e neutrófilos.

Macrófagos são encontrados em muitas áreas dos linfonodos onde podem fagocitar ativamente partículas, prevenindo que estas alcancem a circulação

sanguínea. As células dendríticas fagocitam antígenos nos tecidos periféricos e são ativadas ao migrarem para um órgão linfóide próximo. Conseqüentemente, estas células expressam altos níveis de moléculas coestimulatórias e de adesão mediadoras das interações com células T inativadas que estão continuamente recirculando através destes tecidos (INGULLI; MONDINO; KHORUTS, 1997).

As células do sistema imune inato possuem receptores para componentes especiais dos patógenos microbianos, aos quais Janeway chamou de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMP – *Pathogens Associated Molecular Patterns*). Estes PAMP's poderiam permitir a discriminação de "self-nonsel" e estimular as respostas pró-inflamatória do sistema imune inato.

Os PAMP's quando ligados aos receptores do sistema de imunidade inata nas células apresentadoras de antígeno (APC), aumentam a velocidade da resposta, levando a uma expansão clonal das células da resposta imune adaptativa. Os receptores celulares citados que modulam esta função são os Receptores Toll-Like (TLR - *Toll-Like Receptors*) cuja ativação determina uma resposta ao patógeno. (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997)

Recentemente, foram descobertas outras famílias de proteínas citosólicas como as RLR's (RIG-I - *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*) e NLR's (*Nod-like receptors*). Em conjunto com os TLR's, essas famílias de receptores são conhecidas como PRR's (*pattern-recognition receptors*), os quais reconhecem os PAMP's em vários compartimentos celulares, como a membrana plasmática, endolisossoma e citoplasma (PALM; MEDZHITOV, 2009)

O sistema imune adaptativo consiste em células B e T, as quais fornecem imunidade específica ao hospedeiro para cada patógeno através de rearranjos somáticos dos genes de receptores de antígenos. As células B se diferenciam em plasmócitos e produzem anticorpos e as células T sintetizam

citocinas a fim de eliminar as células infectadas através de efeitos citotóxicos ou via sinais às células B.

As células B se concentram nos folículos linfoides e são particularmente eficientes em absorver antígenos solúveis, tais como toxinas bacterianas, por ligação específica do antígeno com as imunoglobulinas de superfície, e podem apresentar este antígeno a células T junto a MHC classe II. Os linfócitos B se desenvolvem na medula óssea e circulam entre os órgãos linfoides (linfonodos, baço e nódulos linfáticos), ainda como células B não ativadas. Os linfócitos T se desenvolvem na medula óssea, porém, diferentemente das células B, migram para o timo e ao se tornarem ativas dão origem às células T CD4+ e CD8+.

Dentro das células apresentadoras de antígenos, partículas proteicas fagocitadas são fragmentadas por proteases no interior dos endossomas, que contêm altas concentrações de moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC – *Major Histocompatibility Complex*). Peptídeos antigênicos, quando expressos na superfície celular, se ligam com moléculas MHC classe-II antes de serem expostos na membrana celular e interagirem com receptores específicos das células T CD4+. (PIERRE; TURLEY; GATTI, 1997)

Em contraste, a ativação de células T CD8+ é direcionada para reconhecer peptídeos junto a moléculas de MHC classe-I. Neste caso, uma parte estável da proteína a ser apresentada é sintetizada intracelularmente e degradada pelo proteossoma citolítico.

Células T CD4 imaturas podem se diferenciar, após a ativação, em células Th1 e Th2. A função efetora das células T auxiliares (*Helper*), considerada num âmbito geral, é controlar a resposta imune através da secreção de citocinas e também através da expressão de moléculas de superfície, tal como CD40L para ativação de células B, APC, linfócitos T citotóxicos (CTL – *Citotoxic T Lymphocytes*) e outras células do sistema imunológico. As células Th1 estão associadas com a secreção de INF- γ , IL-12

e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α). As células Th2 produzem tipicamente Interleucina - 4 (IL-4), Interleucina - 5 (IL-5), Interleucina - 10 (IL-10) e Interleucina - 13 (IL-13).

A polarização da célula T CD4 depende da duração do estímulo antigênico e da concentração de citocinas no ambiente em que as células estão expostas. Sendo assim, os dois subtipos de células T CD4 podem sofrer uma inter-regulação. Uma vez estabelecido o predomínio de um dos subtipos é muito difícil trocar a resposta para outro subtipo. (SEDLIK; DERIAUD; LECLERC, 1997)

A resposta inata pró-inflamatória pode ser inibida por: a) Inibição da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios; b) modificação da síntese eicosanoides; c) inibição das células imunes ativadas e d) inibição do óxido nítrico sintetase indutível (iNOS) e COX-2, via inibição de NF-kB e AP-1. O fator de transcrição NF-kB controla a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (ex. IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e TNF- α), quimiocinas (ex. IL-8, MIP-1 α , MCP1, RANTES e eotaxinas), moléculas de adesão (ex. ICAM, VCAM e E-selectina), enzimas induzíveis (ex. COX-2 e iNOS), fatores de crescimento e alguns receptores. (PERVAIZ; HOLME; AGGARWAL, 2009)

O óxido nítrico (NO – *nitric oxide*), um importante mediador inflamatório, regula a função das células imunes através de diversos mecanismos como a alteração do balanço Th1-Th2 e a regulação do recrutamento e adesão leucocitária. (MANNICK, 2006)

Baixas concentrações de NO podem contribuir para a atividade dos macrófagos, entretanto altas concentrações têm papel significativo na inflamação e no processo de carcinogênese (TSAI; LIN-SHIAU; LIN, 1999). É sintetizado *in vivo* a partir da L-arginina, pela óxido nítrico sintetase (NOS), a qual possui 3 isoformas, sendo que a mais comum é a óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), expressa em vários tipos celulares após indução à nível transcricional. Entre os estímulos mais importantes para indução de iNOS em macrófagos é o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). O principal fator de

transcrição que aumenta a expressão do gene de iNOS em macrófagos exposto a LPS é o NF-kB.(XIE; KASHIWABARA; NATHAN, 1994)

Em 1999, van der Veen e colaboradores demonstraram que baixas concentrações de NO podem inibir a proliferação de Th1 e Th2, exibindo pouco ou nenhum efeito sobre a viabilidade celular e outras atividades do linfócito T, como a produção de citocinas (VAN DER VEEN; DIETLIN; PEN, 1999).

A terapia imunológica moderna envolve o uso de imunomoduladores. Drogas que podem exacerbar ou reduzir resposta imune, de uso tópico e ou sistêmico, para tratamento de doenças causadas por hipersensibilidades ou imunodeficiências. Elas são divididas em dois grupos básicos: imunostimuladores, que conduzem ao aumento da imunidade inata e adaptativa, e imunossupressores, que diminuem a atividade do sistema imune (LIMA, 2007).

A seleção de um imunomodulador apropriado para o uso como adjuvante em vacinas, não só conduz a um aumento da resposta imunológica como também pode influenciar no balanço entre Th1/Th2.

1.3. Imunidade da mucosa intestinal

O trato gastrointestinal tem dois papéis principais na fisiologia humana: digestão, captação de nutrientes, manutenção da homeostase da resposta imune, protegendo contra a invasão de patógenos e induzindo tolerância contra antígenos da dieta e bactérias comensais.

A maioria das células efectoras do sistema imune é localizada na mucosa, onde existem mais células plasmáticas (a maioria secretora de IgA) no tecido conectivo subepitelial da lâmina própria do que no resto de todo o sistema.(SPENCER; BARONE; DUNN-WALTERS, 2009)

O tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT – *gastro-intestinal associated lymphoid tissue*) possui dois níveis organizacionais: o

primeiro é composto por células linfoides na lâmina própria do vilão intestinal, o segundo que está no nível mais alto de organização é chamado de placas de peyer (PP's- peyer's patches). Os linfócitos intraepiteliais (IEL's - *intraepithelial lymphocytes*) podem ser encontrados na camada epitelial externa da mucosa, onde a maioria são linfócitos CD8+. Devido a sua localização, pode ser através dessa população de células T que os antígenos são localizados e entram através do epitélio intestinal. Abaixo da camada epitelial, está a lâmina própria, que contém um número grande de células B, células plasmáticas, células T auxiliares ativadas e macrófagos. (Figura 2)

O GALT é o destino da maioria dos linfócitos CD4+ e somente 2% destas células são encontradas no sangue (READ; SERETI, 2008).

As placas de peyer que estão localizadas na camada submucosa contêm 30-40 folículos linfoides organizados como nódulos macroscópicos ou agregados. Em uma forma semelhante ao que acontece com folículos linfoides em outros locais, as Placas de Peyer maduras podem se desenvolver em folículos secundários com centros germinativos, apoiados ou conectados por células dendríticas foliculares.

As PP's são encontradas principalmente, tanto em humanos como em camundongos, no íleo terminal do intestino delgado, onde a microbiota é mais abundante e diversa. As PP's maduras são macroscopicamente visíveis e possuem uma estrutura similar aos linfonodos, sendo formados na parte subepitelial por células B e T. As zonas de linfócitos T perifoliculares localizadas entre os grandes folículos de células B apresentam um grande número de vênulas especializadas do endotélio alto, permitindo a migração celular e recirculação dos linfócitos.

Entre o folículo associado epitélio (FAE- *follicle-associated epithelium*) e agregados de folículo linfóide organizado, há uma área mais difusa conhecida como a cúpula subepitelial (SED- *subepithelial dome*), onde se acumulam células dendríticas.

O FAE é o nome dado à mucosa que recobre os folículos linfoides organizados. É uma pequena região caracterizada pela presença de células epiteliais especializadas chamadas, células M. Juntos, o FAE, folículos linfoides e estruturas associadas, constituem os sítios de captação antigênica e indução do sistema imune de mucosa.

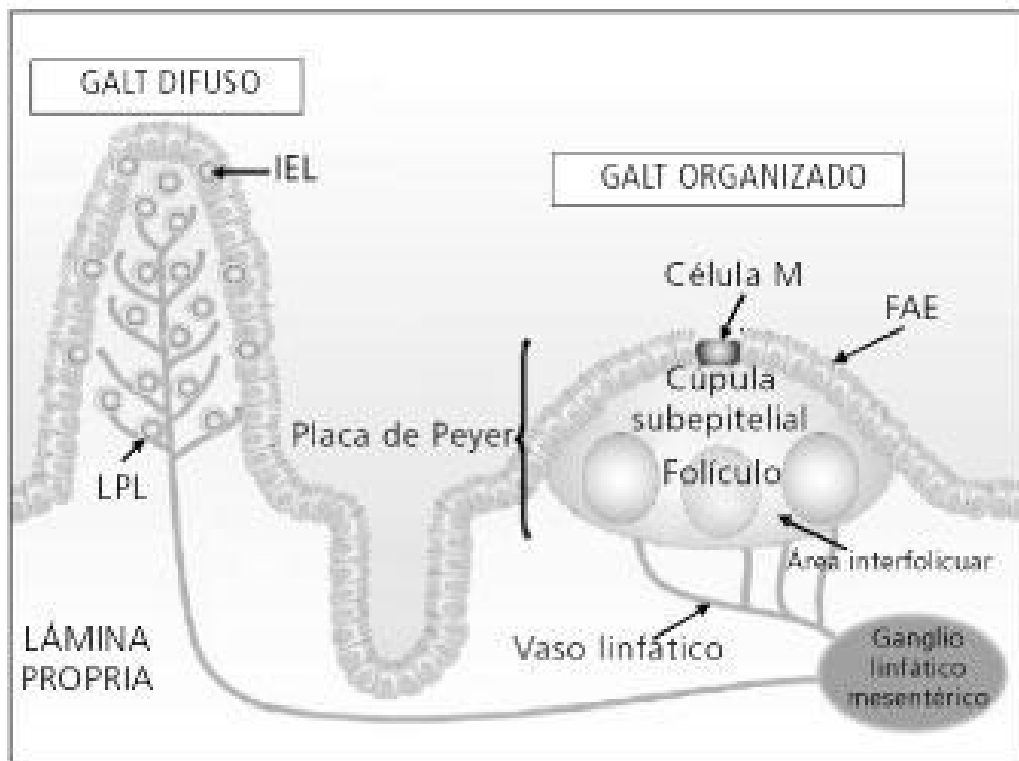


Figura 2: Representação dos elementos que representam o tecido linfóide associado a mucosa intestinal(GALT). Linfócitos intraepiteliais (IEL's - *intraepithelial lymphocytes*), linfócitos da lâmina própria (LPL), folículo associado epitélio (FAE- *follicle-associated epithelium*). Figura adaptada. (MEHANDRU; TENNER-RACZ; RACZ, 2005)

A função e as características estruturais das células epiteliais *microfold* (células M) foram descritas em várias revisões recentes. Tem sido amplamente

aceito que as células M, provavelmente, desempenham um papel crucial na imunidade e infecção da mucosa.

O principal papel das células-M é captação de antígenos para transportá-los através do epitélio das mucosas aos tecidos linfoides subjacentes onde a resposta imunoprotetora é gerada. Os antígenos transportados através da transcitose pelas células M são transferidos até ao SED e entram em contato com as células dendríticas presentes nele. Essas células, após a ativação primária antigênica, amadurecem e migram para as regiões interfoliculares ricas em linfócitos T a fim de apresentar o antígeno.

Além disso, a células M, se não a única, é uma rota comum para antígenos complexos e de invasão do patógeno.

Em ratos e homens, as células M correspondem cerca de 10% da FAE, sendo facilmente reconhecidas pela falta de microvilosidades na superfície e diferentemente dos enterócitos, não secretam enzimas digestivas ou muco. Além disso, contêm uma invaginação semelhante a uma profunda bolsa na membrana basolateral citoplasmática que contém um ou mais linfócitos e ocasionais macrófagos.

O epitélio do intestino fornece uma eficaz barreira para a entrada da maioria dos patógenos e partículas, devido às fortes conexões entre as células epiteliais chamadas de *tight junctions*.

Em contrapartida, as células podem ser exploradas por microorganismos como a porta de entrada por duas razões: os organismos podem se aderir com menor dificuldade à membrana apical da célula, e depois estes agentes precisam ser transportados, somente, a uma curta distância antes de alcançar a “bolsa” da célula M, onde pela interação com os linfócitos, os antígenos ou partículas ganham acesso rápido ao sítio indutivo organizado (JEPSON; CLARK, 1998).

As células epiteliais são participantes ativos da defesa de mucosa, funcionando como sensores através de receptores como TLR's, além de expressarem constitutivamente MHC-II.

Após a apresentação do antígeno nos sítios indutivos (GALT), as células B produtoras de IgA antígenos-específicas, proliferam localmente e migram pela circulação sanguínea até os sítios efetores como a lamina própria do intestino e tecido como glândulas salivares.

Estudos recentes sugerem que as células dendríticas presentes nas PP's possuem um papel fundamental no tropismo de mucosa pela indução, através da produção de ácido retinoico, de moléculas de migração (ex. integrina $\alpha 4\beta 7$ e CCR9) em linfócitos B e T primados. Como consequência, a ativação tecido-específica dos linfócitos na PP explica o porquê da vacinação contra infecções intestinais necessita de imunização via mucosa oral, pois por outras vias como a subcutânea e intramuscular, não se tem o envolvimento das células dendríticas de mucosa. (COOMBES; POWRIE, 2008)

A produção de IgA nas mucosas é regulada pela comunicação entre os linfócitos B, T, células dendríticas e células epiteliais. As células dendríticas localizadas no GALT e em outros tecidos efetores como a lâmina própria precisam ser especializadas em fornecer um ambiente molecular para a geração de células B produtoras de IgA. Existem diversas subclasses de células dendríticas de mucosa e uma delas, por exemplo, é o subtipo CD11c+CD11b+CD8 α -DC isolado em PP's, o qual produz preferencialmente IL-6 e polariza as células T antígeno-específicas a produzirem citocinas de Th2. (SATO; HASHIGUCHI; TODA, 2003)

Outra subclasse, chamada de Tip-DC's, produzem TNF- α e iNOS a fim de ativar a produção de células IgA-comprometidas. (TEZUKA; ABE; IWATA, 2007)

Atualmente, estão muito claras que as atividades imunológicas que ocorrem na mucosa entérica envolvem interações entre células epiteliais e células do sistema imune. As células epiteliais do intestino podem secretar quimiocinas como a IL-8, que recruta células do sistema imune, assim como citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α . Por último, ainda podem ativar os linfócitos intraepiteliais, células T e células dendríticas e/ou macrófagos da lâmina própria. (OU; BARANOV; LUNDMARK, 2009)

Embora a IgA secretada (SIgA) seja o mecanismo de defesa humoral predominante nas superfícies de mucosas, o IgG e IgM produzidos localmente ou no soro podem contribuir significativamente para a defesa imunológica.

1.4. Adjuvantes de Vacinas

As vacinas consistem, tradicionalmente, de patógenos atenuados, organismos inteiros inativados ou toxinas inativadas. Embora estes tipos de vacinas tenham provado sucesso no passado, várias desvantagens têm limitado o uso das mesmas contra doenças como hepatite C ou AIDS. Certas vacinas vivas atenuadas podem causar a doença em indivíduos imunossuprimidos por reversão em um fenótipo mais virulento. Já as vacinas inativadas com as células bacterianas inteiras (ex. *Bordetella pertussis*) contém componentes reatogênicos que podem causar efeitos colaterais indesejáveis e alguns patógenos dificilmente ou não são capazes de crescer em cultura (ex. hepatite B, hepatite C e papilomavírus humano), fazendo com que a preparação dessas vacinas seja mais problemática. (PLOTKIN, 2005)

Atualmente, a vacinação ainda encontra muitos obstáculos. Um deles tem origem sócio-econômica, como a disponibilidade em países em desenvolvimento, onde de acordo com dados da OMS (Organização Mundial da Saúde), as infecções agudas do trato respiratório inferior (pneumonias e bronquiolite) e diarreias infecciosas (rotavírus) são as duas principais causas de morte entre crianças menores de 5 anos, representando 19 e 17% do total de mortes, respectivamente. (BRYCE; BOSCHI-PINTO; SHIBUYA, 2005) Essas doenças são, na grande maioria, prevenidas por imunização com vacinas já existentes. Outras dificuldades em países em desenvolvimento incluem:

- A sensibilidade de vacinas a altas (vírus vivos) ou baixas (proteínas) temperaturas desse modo exigindo uma cadeia fria de armazenamento e transporte.

- A maioria das vacinas requer múltiplas doses para imunizar adequadamente
- O modo de administração mais aplicado é o parenteral com o uso de seringa e agulha.

A combinação de estratégias como o uso de novas tecnologias para tornar as vacinas resistentes a diferentes temperaturas, uso de adjuvantes que aumentam a imunogenicidade, combinação de antígenos vacinais e sistemas de entrega (*antigen delivery*) através de mucosas, pele ou via parenteral livre de agulha, pode melhorar os procedimentos de imunização, fazendo com que cada vez mais lactentes, crianças e adultos possam ser vacinados. (LEVINE, 2003; LEVINE; ROBINS-BROWNE, 2009)

Na década de 90 surgiram novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas que podem possuir muitas vantagens sobre os métodos tradicionais, como as proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e DNA plasmidial. Embora essas novas abordagens ofereçam vantagens como baixa toxicidade, elas são pouco imunogênicas quando administradas. As vacinas tradicionais são heterogêneas e contêm muitos epítomos, alguns dos quais podem ativar as células T auxiliares (Th) ou funcionar como adjuvantes (ex. DNA bacteriano). Atualmente, existe uma grande busca por adjuvantes imunológicos que sejam potentes, seguros e compatíveis com a nova geração de vacinas, incluindo as compostas de DNA.

Os adjuvantes imunológicos foram descritos originalmente por Gaston Ramon, conhecido como o progenitor da pesquisa sobre adjuvantes, como “substâncias utilizadas em combinação com um antígeno específico que produz mais imunidade que o antígeno sozinho”. (SPRIGGS; KOFF, 1990)

Em uma série de publicações desde 1925¹, Ramon e seus colegas conduziram um estudo sistemático de um interessante fenômeno que observaram enquanto tentavam produzir antitoxina diftérica em cavalos. Havia-se notado, já anteriormente, que imunizações repetidas em cavalos

¹ RAMON, G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. **Bull. Soc. Centr. Med. Vet** v. 101, p. 227–234, 1925.

aumentavam os títulos de anticorpos, mas que num determinado momento esses títulos se nivelavam e não aumentavam mais após mais imunizações. Porém numa pequena porcentagem de animais, um aumento significativo dos níveis de antitoxina era observado, descobrindo-se que nesses animais havia abscessos no local da injeção e logo se fez a correlação entre o aumento da produção de anticorpos e a presença da infecção localizada.

Em 1926, Glenny demonstrou a imunogenicidade de vários precipitados de toxoide diftérico, após a adição de potássio de alumínio ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$). (GLENNY; POPE; WADDINGTON, 1926) As vacinas preparadas por este método foram chamadas de coprecipitadas e aluminatos de proteína, sendo consideradas posteriormente altamente heterogêneas. (LINDBLAD, 2004) Maschmann substituiu a coprecipitação do antígeno por um gel hidratado de hidróxido de alumínio pré-formado, que tem a habilidade de adsorver os antígenos proteicos numa solução aquosa. (MASCHMANN; KÜSTER; FISCHER, 1931).

Muitas substâncias naturais ou sintéticas têm sido reconhecidas como adjuvantes de vacinas. Ramon, em uma citação de final de artigo, escreveu sobre a necessidade de se conhecer o mecanismo de ação dos adjuvantes, não só pelo ponto de vista prático². Entretanto, o mecanismo da ação de muitas substâncias ainda continua desconhecido.

No final de 1980, o renomado imunologista Charles A. Janeway denominou os adjuvantes de vacina como "*immunologist's dirty little secret*".

Anteriormente, somente se conhecia a identificação de antígenos *self/nonself* pela resposta imune inata, porém a hipótese de Janeway sobre a existência de PPR's que identificam os patógenos, ativando imediatamente as APC's e finalmente a resposta pela célula T patógeno-específica mudaram a forma de ver os adjuvantes. (JANEWAY, 1989)

² "As interesting as this method is from a practical point of view, it may be just as interesting from a theoretical point of view, because of research it could stimulate to understand the intimate mechanism of either the increase in antitoxin induced in this case or the generation of antitoxins within the animal" RAMON, G. Procédres pour acroitre la production des antitoxines. **Ann. Inst. Pasteur** v. 40, p. 1-10, 1926.

Dentro desse novo conceito de imunidade, estabelecido na década passada, são desenvolvidas vacinas que causam uma resposta imune potente somente quando associadas a antígenos que mimetizam aspectos-chaves de agentes infecciosos ou causam em certo grau, um dano tecidual. (SHI; ZHENG; ROCK, 2000; SINGH; O'HAGAN, 2002)

Várias classes de moléculas já foram testadas quanto à sua atividade adjuvante, onde a maioria é derivada de bactérias que provocam um forte processo inflamatório, o que faz com que muitos cientistas considerem como um dos objetivos a serem alcançados no futuro: estimular o sistema imune sem causar inflamação. (TAGLIABUE; RAPPUOLI, 2008)

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com sua fonte, propriedades físico-químicas e mecanismos de ação. Duas classes de adjuvantes são usualmente encontradas em vacinas modernas como:

- Imunoestimulantes que diretamente agem no sistema imune, aumentando a resposta a antígenos. Exemplos: CpG, LPS, saponinas, toxinas bacterianas.
- Veículos que apresentam os antígenos ao sistema imune de forma eficiente, incluindo características como liberação controlada e sistema de entrega (“*antigen delivery*”) acumulativo que aumentam a resposta imune específica ao antígeno. Os veículos também podem ser carreadores de substâncias imunoestimulatórias. Exemplos; micropartículas, lipossomos e emulsões (MF59)

Atualmente, os adjuvantes aprovados para vacinas humanas incluem à base de alumínio (Alum), MF59™ (uma emulsão óleo em água), MPL® (um glicolípido), partículas “vírus-like” (VLP- virus like particle), virossomas de gripe reconstituídos que potencializam a imunidade (IRIV- Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes) e toxina colérica. (REED; BERTHOLET; COLER, 2009)

Outra classificação possível divide os adjuvantes como dependentes ou independentes de ativação dos TLR's. Os adjuvantes particulados (sais de alumínio, lipossomas, micropartículas, saponinas e emulsões) são TLR-independentes, porém quando combinados com agonistas dos TLR's, como exemplo, o CpG podem induzir uma melhor resposta humoral e celular, quando comparada com os componentes separados. (DE GREGORIO; D'ORO; WACK, 2009)

Os adjuvantes a base de alumínio, são os únicos aprovados pela agência regulatória americana *Food & Drug Administration* (FDA) para uso humano. As vantagens do alumínio incluem segurança, aumento da resposta humoral, estabilização do antígeno e formulação relativamente simples. As maiores desvantagens são: não ativação de linfócitos T helper (Th1) ou Linfócitos T citotóxicos (CTL), que são necessários para controlar a maioria dos patógenos intracelulares como: tuberculose, malária e AIDS. As vacinas com alumínio não podem ser congeladas, o que ocorre acidentalmente em países em desenvolvimento e induzem resposta IgE, sendo associado à alguns casos de alergias em humanos. (RELYVELD; BIZZINI; GUPTA, 1998)

No caso de vacinas orais a dificuldade de induzir uma forte imunidade pela mucosa é devido a duas propriedades desse sistema imune: 1) destruição pelo suco gástrico e captação limitada de proteínas intactas; 2) os mecanismos que limitam as respostas inflamatórias locais, como a ativação de linfócitos T reguladores. (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005)

Estimular as funções do sistema inato representa uma abordagem complementar ao desenvolvimento de novas vacinas contra infecções em mucosas.

Portanto, os adjuvantes e os sistemas de entrega precisam proteger os antígenos da destruição, promover a captação através do epitélio da mucosa e aumentar a imunogenicidade. (LAVELLE, 2005)

1.5. Administração Oral de Antígenos e Tolerância

A resposta imunológica a antígenos administrados por via oral é fundamentalmente diferente da clássica resposta a antígenos encontrados em outros sítios. As duas principais diferenças estão nos altos níveis de produção de IgA pelos tecidos mucosos e no favorecimento à tolerância do linfócito T, ao invés de sua ativação. (TAKAHASHI; NOCHI; YUKI, 2009)

O GALT contém células imunorreguladoras precursoras de linfócitos B e de linfócitos T, as quais determinarão indução de tolerância, ou intensa resposta imunológica, após a administração oral de um antígeno.

Estudos mais recentes têm sugerido que respostas imunossupressoras tipo Th2 são geradas preferencialmente nas Placas de Peyer, onde as células T se dividem em subtipos produtores de IL-5, IL-10 e TGF- β .

São três os mecanismos básicos implicados na tolerância induzida por antígeno: deleção clonal, anergia clonal e supressão ativa.

A *deleção clonal*, ou apoptose de células efectoras, é o mecanismo pelo qual clones de linfócitos são eliminados, por morte celular, ao entrarem em contato com o antígeno.

A *anergia clonal* é um processo em que clones antígeno-específicos são funcionalmente inativados, mas não destruídos. Dentre os vários mecanismos de anergia, destaca-se aquele onde o linfócito deixa de expressar o receptor para o antígeno e aquele onde ocorre um bloqueio à nível do receptor, não permitindo que o antígeno se ligue.

Finalmente, a *supressão ativa* representa a circunstância em que os clones de linfócitos passam a não mais responder frente a uma estimulação antigênica, devido à secreção *in situ* de linfocinas inibidoras, tais como IL-4, IL-10 e TGF- β , produzidas por outros linfócitos.

O primeiro fator que determina a tolerância que se desenvolve após a administração oral do antígeno é a quantidade administrada. Baixas doses de antígeno favorecem o mecanismo de supressão ativa, enquanto altas doses parecem favorecer anergia/deleção. Por sua vez, antígenos de baixo peso molecular e hidrossolúveis levariam a anergia/deleção, enquanto antígenos de maior peso molecular e lipossolúveis induziriam supressão ativa (CHEN; INOBE; MARKS, 1995)

Altas doses de antígeno administradas por via oral parecem resultar em apresentação sistêmica do antígeno. Após a passagem do antígeno pelo intestino, este ganha a circulação como proteína intacta ou como fragmento antigênico.

O sinal supressivo produzido por estas células parece ocorrer, como citado acima, através da secreção de citocinas imunossupressoras, incluindo a IL-4, IL-10 e TGF- β . A forma pela qual o antígeno é apresentado no intestino também parece crucial para a geração da supressão ativa devido ao microambiente intestinal ou às diferentes propriedades estimuladoras da célula apresentadora de antígeno.

As células dendríticas (DC's) que continuamente migram do intestino para os linfonodos mesentéricos (MLN) são cruciais no equilíbrio da imunidade e tolerância no intestino. Todos os subtipos de DC's que migram do intestino apresentam características que as tornam excepcionalmente adequadas para desempenhar o papel de sentinelas: percorrem o intestino via linfa antes de migrar para o MLN, transportam o antígeno e transmitem sinais para os linfócitos T. Estes sinais oriundos de DC's são fundamentais para direcionar as células T ativadas para se tornar ou manter a tolerância contra antígenos específicos. Devido a estas funções, há grande interesse no papel da migração DC's no controle da imunidade intestinal e da tolerância. (MILLING; YRLID; CEROVIC, 2010)

No intestino, as DC's estão presentes nos tecidos linfoides organizados de placas de Peyer e folículos linfoides isolados, bem como intercaladas com a

lâmina própria. Interação com partículas de antígenos do lúmen intestinal, quer após captação mediada por células M ou talvez diretamente estendendo-se entre as células do epitélio intestinal. (RESCIGNO; URBANO; VALZASINA, 2001)

Mesmo na ausência de qualquer estímulo inflamatório evidente, DC's migram constitutivamente através dos vasos linfáticos para o MLN's. Apresentam os antígenos às células T e são essenciais para a indução de tolerância oral. Após a estimulação por patógenos ou por moléculas de patógenos derivados, elas podem também estimular a imunidade antígeno-específica. (ANJUERE; LUCI; LEBENS, 2004)

1.6. Efeito imunomodulatório do Resveratrol:

As propriedades anti-inflamatórias do Resveratrol vêm sendo demonstradas principalmente *in vitro*, utilizando macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS).

A habilidade do LPS em ativar vias pró-inflamatórias pode ser revertido em parte pelo Resveratrol através da inibição de NF- κ B e síntese de NO (TSAI; LIN-SHIAU; LIN, 1999) (CHO; KOO; CHUNG, 2002) (FENG; ZOU; LI, 2002). A fagocitose, por macrófagos de rato, também pode diminuir em concentrações acima de 10 μ M. (LEIRO; ALVAREZ; GARCIA, 2002)

O estado de ativação das células apresentadoras de antígenos pode influenciar no efeito imunomodulatório do resveratrol. Em macrófagos humanos (THP-1), a secreção de TNF- α , IL-12 and IL-1 β aumentou com o tratamento de resveratrol(6,25 a 25 μ M) e LPS. A expressão de CD86 (ativação de Linfócitos T), mesmo sem LPS também aumentou no tratamento com resveratrol. Porém, após a incubação com IFN- γ para ativação das células, o resveratrol suprimiu a expressão de HLA-ABC (MHC-I), HLA-DR (MHC-II), CD80, CD86 e das citocinas induzidas por LPS. (FENG; ZHU; LIU, 2004)

Os efeitos imunoestimulantes e imunossupressivos do resveratrol sugerem um possível uso terapêutico em diferentes condições patológicas. Em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), a exposição ao resveratrol *in vitro* produziu um efeito dose-dependente no desenvolvimento de células T CD8+(IFN- γ e IL-2) e CD4+ (IL-4) induzidas por anti-CD3/anti-CD28, onde houve estímulo em baixas concentrações (< 2,5 μ g/mL \cong 10 μ M) e supressão em altas concentrações. (FALCHETTI; FUGGETTA; LANZILLI, 2001)

O desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos (CTL's) e linfócitos esplênicos (IFN- γ / IL-2), assim como a produção de citocinas TNF/IL-12 pelos macrófagos peritoneais de camundongo foi diminuído significativamente *in vitro* nas concentrações entre 25 e 50 μ M. (GAO; XU; JANAKIRAMAN, 2001)

Gao e colegas (2003) demonstraram que pode haver diferenças nas respostas ao resveratrol *in vitro* e *in vivo*. A fim de avaliar a influência do resveratrol no desenvolvimento de resposta imune celular, a proliferação, medida por incorporação de timidina, de CTL's foi reduzida em mais de 90% após o tratamento com 25 μ M.

In vivo, após a administração intragástrica de 2 mg de resveratrol por dia por 4 semanas, não houve alteração no peso, contagem de células do sangue periférico ou na composição celular da medula óssea ou baço (CD4+ e CD8+). Os linfócitos de baço isolados dos camundongos após a dieta, também não apresentaram diferenças quanto ao perfil de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-12). Somente o TNF- α teve sua secreção alterada e, embora *in vitro* a proliferação de linfócitos citotóxicos tenha sido alterada, *in vivo* a inibição proliferativa não foi significativa. (GAO; DEEB; MEDIA, 2003)

As evidências mostram que *in vitro*, baixas concentrações de resveratrol podem produzir efeitos imunoestimulantes. Feng e colegas (2002) relataram o aumento dose-dependente (0,75 a 6 μ M) da proliferação de linfócitos induzidos por concanavalina A (ConA) e da produção de IL-2. Além de, induzir citocinas do tipo Th1 (IL-2, IFN- λ e IL-12) em linfócitos esplênicos estimulados por antígeno (*Staphylococcus aureus* Cowan strain 1-Sac) e reduzir a secreção de IL-10. (FENG; ZHOU; WU, 2002)

A atividade estrógena do resveratrol foi avaliada em esplenócitos murinos *in vitro* estimulados por Phorbol 12-miristate 13-acetate (PMA). Comparativamente, o resveratrol obteve a mesma atividade que o estrogênio tipo 2, onde na concentração de 10 μM foi capaz de inibir a liberação de INF- γ e aumentar a secreção de IL-10, indicando uma possível indução de resposta Th2. (RACHON; RIMOLDI; WUTTKE, 2006)

A supressão concentração-dependente da produção de citocinas inflamatórias (TNF- α and IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-6) por células do sangue *ex vivo* (rato) após o tratamento *trans*-resveratrol reforçam a hipótese de que o efeito imunomodulatório do resveratrol pode ter um papel importante em diversas doenças que envolvem produção exacerbada de citocinas inflamatórias.(MARIER; CHEN; PRINCE, 2005)

Magrone e colaboradores (2008) analisaram no sistema *in vitro* a capacidade de modulação sobre a produção de citocinas e anticorpos em células mononucleares do sangue periférico de humanos saudáveis, pelo vinho tinto (tipo Negroamaro). Após alguns tratamentos os extratos desse vinho continham até 270 mg de polifenóis totais por litro. Numa dose equivalente a uma taça por dia, o extrato (vinho dealcolizado) foi capaz de polarizar a resposta para o tipo Th1, em virtude do aumento da liberação de IL-12 e IFN- γ , efeito igualmente encontrado após o tratamento com LPS e PMA respectivamente. Além do efeito sobre as citocinas, o aumento da produção de anticorpos IgG e IgA pelos linfócitos B, *ex vivo* foi observado. (MAGRONE; TAFARO; JIRILLO, 2008)

A ingestão de vinho, rico em polifenóis, dentre eles o resveratrol, através da estimulação do GALT, pode ser benéfico tanto no nível de mucosa ou sistêmica em termos de aumento da capacidade de ativação do sistema imune. (MAGRONE; CANDORE; CARUSO, 2008)

Apesar do papel inibitório do resveratrol sobre o fator de transcrição NF- κB em diversas células, foi demonstrado o efeito ativador nas concentrações entre 25-50 μM em dois modelos de células epiteliais de intestino (HT-29 e CACO-2); Após as células serem tratadas com estímulos inflamatórios o resveratrol e a

genisteína foram as únicas substâncias a estimular NF-kB e a produção de IL-8(quimiotaxia). (JEONG; KIM; HU, 2004) (ROMIER; VAN DE WALLE; DURING, 2008)

Uma possível abordagem, para identificação de novos adjuvantes ativadores do sistema inato em mucosas, é o uso de culturas de células epiteliais que ao serem estimuladas produzem IL-8. (BUCKNER; WILSON; KURK, 2006)

A bioprospecção de substâncias de origem vegetal com ação imunomodulatória e/ou adjuvante vem crescendo muito nos últimos anos.(SAKURE; NEGI; MITRA, 2008) (GAUTAM; GAIROLA; JADHAV, 2008) As substâncias polifenólicas devido às atividades imunomodulatórias têm sido aplicadas em conjunto com vacinas.

Mais recentemente, com a intenção de diminuir a toxicidade da toxina colérica para humanos durante a imunização nasal, uma formulação contendo extrato polifenólico de maçã foi utilizada com sucesso. (YOSHINO; FUJIHASHI; HAGIWARA, 2009)

O própolis, uma substância resinosa coletada pelas abelhas a partir de várias fontes vegetais, possui como principal componente agliconas de flavonoides e outros polifenóis. Tanto o extrato aquoso como o etanólico já demonstraram propriedades adjuvantes quando aplicados em conjunto com diferentes antígenos em diferentes modelos de animais. (CHU, 2006) (FISCHER; CONCEICAO; LEITE, 2007) (FISCHER; CLEFF; DUMMER, 2007)

A atividade imunomodulatória do resveratrol, uma substância que pode ser utilizada no controle de respostas imunes, parece ser dependente de:

- 1) Estado de ativação da célula ou tecido: o sinergismo do resveratrol com outras substâncias pode ser comprovado recentemente durante a imunização com ovalbumina via intraperitoneal com Glucano, onde a resposta de IgG sérico anti-OVA foi comparável ao antígeno administrado junto ao adjuvante de Freund. (CHEN; INOBE; MARKS, 1995)

- 2) Concentração: baixas doses são relacionadas a resposta imunoestimulatória e altas doses a respostas imunossupressoras.
- 3) Via de administração: afeta diretamente a biodisponibilidade do resveratrol. Via oral a concentração plasmática dependerá de vários fatores evitando que o resveratrol entre em contato em altas concentrações imunossupressoras com células apresentadoras de antígeno, por exemplo.

2. OBJETIVOS:

Este estudo se baseia na existência de vários relatos sobre a atividade imunomodulatória do resveratrol e na possível utilização como indutor de tolerância em doenças autoimunes de mucosa ou de resposta imune humoral por haver evidências de modulação de citocinas da polarização Th1/Th2.

Entre os parâmetros avaliados estão:

- Determinar as concentrações com atividade anti-inflamatória em macrófagos de linhagem murina
- Comparar os dados obtidos com a ativação da captação de proteínas solúveis do meio de cultura evidenciado com BSA-FITC.
- Determinar o efeito das concentrações de resveratrol na produção das citocinas IL-6 e IL-10 em placas de peyer *in vitro*, relacionando com a resposta imune de mucosa.
- Determinar a influência do resveratrol sobre a produção de IL-10 em esplenócitos após exposição oral
- Verificar a produção de anticorpos IgG e IgA após a imunização oral com ovalbumina e Resveratrol nas concentrações de 5 mg/kg e 10 mg/kg, consideradas próximas a ingestão de vinho diária recomendada.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

Resveratrol (3,4',5-trihidroxi-trans-estilbeno), Lipopolissacarídeo (LPS) *E.coli* O55:B5, Ovalbumina (OVA) Grau V foram obtidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Soluções estoque de Resveratrol (100 mM) foram preparadas em DMSO (Synth) e congeladas a – 20°C. Raw 264.7 é uma linhagem de macrófago murino obtida partir da ATCC (*American Type Culture Colletion*).

Todos os animais utilizados foram obtidos no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química. Os procedimentos aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal/FCF/USP, protocolo nº 232.

3.1. Produção de óxido nítrico:

A linhagem de macrófagos Raw 264.7 foi cultivada em Meio Dulbecco's modified Eagle's (Sigma), com vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), sem antibióticos, a 37°C, 5 % CO₂. Para análise de inibição de óxido nítrico foram feitas placas de 96 poços (2 x10⁵ células por poço). As placas forma incubadas na estufa por 24 horas. Após esse período o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo diversas concentrações de Resveratrol (5, 10 e 50 µM) na presença de LPS (1 µg/mL).

Após 24 horas de tratamento, 50 µL do sobrenadante da cultura foi transferido para outra microplaca de 96 poços e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente com o sulfanilamida 1% e depois por mais 10 minutos com o reagente de Griess (Sigma). A absorbância em 545 nm foi obtida utilizando um leitor de microplaca (Biotek Powerwave 340). Uma curva de calibração de nitrito de sódio foi utilizada para obter as concentrações de nitrito nos sobrenadantes em µM.

3.2. Ensaio de MTT

A viabilidade celular após os tratamentos foi determinada pelo ensaio de MTT. Após o tratamento descrito no item 3.1., a solução de MTT na concentração final de 0,1 mg/mL foi adicionada em cada poço e incubada por 1h a 37°C. O meio foi descartado e 200µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados em cada poço para dissolver os cristais de formazano. A absorbância foi lida a 570 nm.

3.3. Ensaio de Endocitose:

Para análise da influência de diferentes concentrações de resveratrol sobre a capacidade endocítica dos macrófagos Raw 264.7, foram transferidas para uma placa de 24 poços, 1×10^6 células/0,5 mL/poço. Após permitir que as células aderissem *overnight*, as células foram tratadas por 24 horas com resveratrol (6,25 µM a 100 µM) e os controles meio de cultura com DMSO (0,1% e 0,05%) e LPS 1 µg/mL. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado e 500 µg/mL de albumina bovina ligada ao isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC -*bovine serum albumin-Fluorescein isothiocyanate*) (Sigma) dissolvido em meio de cultura foram adicionados no volume final de 500 µL/poço.

Após 1 hora de incubação, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas cuidadosamente 3 x com PBS gelado. A monocamada de células foi ressuspensa em tripsina diluída em PBS e analisada por citômetro de fluxo (FacScalibur – BD Bioscience, San Jose, CA, EU). A operação e a análise dos resultados foram realizadas em colaboração com o Dr. Jorge Mario da Costa Ferreira Júnior do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

A viabilidade celular foi controlada pelo corante fluorescente iodeto de propídeo(Sigma) na concentração final de 10 µg/mL. O iodeto de propídeo só penetra e cora o DNA de células que não possuem mais a membrana citoplasmática íntegra, portanto em estágio de necrose ou apoptose tardia.

3.4. Isolamento dos linfócitos da placa de peyer

Cada experimento usou 3 camundongos da linhagem isogênica BALB/C (fêmeas, 4-8 semanas). Cerca de 5 a 10 folículos linfoides das placas de peyer foram retirados e transferidos, em condições assépticas, para um tubo de polietileno contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os folículos foram macerados, com a ajuda do embolo de uma seringa, contra uma membrana de *nylon* com poros de 40 µm (Falcon, BD Biosciences). A suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, foram feitas 2 lavagens com 5 mL de meio de cultura. Ao término na lavagem, o *pellet* celular foi ressuspenso em 5 mL de meio suplementado, para contagem de linfócitos viáveis, através da coloração com o corante de exclusão Azul de Tripiano.

3.5. Ensaio de secreção citocinas e citotoxicidade com células da placa de peyer:

As células isoladas de placas de peyer foram transferidas em triplicata, para uma placa de 24 poços, na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/0,5 mL/poço. Após as adições de resveratrol 5 e 50 µM com e sem Concanavalina A 2,5µg/mL ou LPS 1 µg/mL, os linfócitos foram incubados por 72 horas. No final desse período o sobrenadante foi coletado, após a centrifugação da placa a 1500 rpm por 10 minutos e mantido à -80°C. Os testes de detecção de IL-6 e IL-10 foram realizados. Às células remanescentes foi adicionado meio de cultura contendo a concentração final de 500 µg/mL de MTT, incubadas por 4 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após o período de incubação, foi realizado o mesmo procedimento citado no item 3.2.

3.6. Quantificação das citocinas IL-6 e IL-10:

Após os respectivos tratamentos o sobrenadante das culturas foram coletados e mantidos à -20 °C até a avaliação do nível de IL-6 e IL-10 através do método colorimétrico de ELISA sanduiche quantitativo (eBioscience). Os valores foram calculados, de acordo com a curva padrão construída para cada ensaio.

3.7. Imunização via oral (VO)

No dia de cada imunização, os animais foram privados de ração por 4 horas antes de cada administração oral, realizada através de agulha de gavagem. Foram divididos 30 camundongos fêmeas (4 a 8 semanas, 20 g/cada) em 6 grupos: Grupo I: Controle, solução de PBS estéril; Grupo II: 1 mg de Ovalbumina em PBS; Grupo III: Resveratrol 5mg/kg; Grupo IV: Resveratrol 10 mg/kg; Grupo V: Ovalbumina (1 mg) e Resveratrol 5 mg/kg; Grupo VI: Ovalbumina (1 mg) e Resveratrol 10 mg/kg.

Nos grupos II, V e VI, receberam 30 minutos antes da imunização oral com ovalbumina, 100 µL da solução 0,1M de bicarbonato de sódio a fim de neutralizar o pH do estômago do camundongo. O resveratrol foi administrado em forma de suspensão em PBS

Cada camundongo recebeu via agulha de gavagem, 1 mg de Ovalbumina foram dissolvidos em PBS com e sem adição de resveratrol nas dosagens de 5 mg/kg e 10 mg/kg . Através da agulha de gavagem, a solução foi administrada por via intragástrica. Aos animais controle foram dados volumes equivalentes do diluente apenas. Os camundongos estão sendo imunizados com 2 doses e intervalos de 14 dias. Uma semana após a última dose (21 dias), os animais foram pesados e o sangue coletado via plexo retro-

orbital, centrifugado e o soro armazenado à -20°C até o momento da dosagem de IgG e IgA séricos.

3.8. Obtenção do lavado intestinal

O lavado intestinal foi obtido através da passagem de 1 mL de PBS a 4°C suplementado com 1% de inibidor de protease (Sigma) pelo intestino delgado. A suspensão foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante coletado e mantido à -80°C para posterior análise quanto a presença de IgA secretado (IgA-s).

3.9. Obtenção dos splenócitos:

Após 21 dias do início dos tratamentos e imunizações os camundongos foram sacrificados por inalação de CO₂ e o baço foi removido assepticamente. Os baços de cada grupo retirados e transferidos, em condições assépticas, para um tubo de polietileno contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100ug/mL). Os baços foram macerados, com a ajuda do embolo de uma seringa, contra uma membrana de *nylon* com poros de 40 µm (Falcon, BD Biosciences). A suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação, para remoção dos eritrócitos, as células foram ressuspendidas em 5mL de tampão de lise contendo NH₄Cl 0,16M e Tris-(hidroximetil)-aminometano 0,17M (pH 7,2) e mantidas em temperatura ambiente por 5 min. Após a incubação os tubos foram completados com meio de cultura e centrifugados novamente a 1000 rpm por 10 min. Ao término na lavagem, o *pellet* celular de cada grupo foi ressuspendido em 20 mL de meio

suplementado, para contagem de células viáveis, através da coloração com o corante de exclusão Azul de Tripano com o auxílio de um hematocítmetro.

3.10. Cultura de esplenócitos para dosagem da citocina IL-10

A fim de avaliar a influência dos diferentes tratamentos na secreção *ex vivo* de IL-10 pelos esplenócitos em cultura, 1×10^6 células/poço/ 0,5 mL em triplicata foram transferidos para uma placa de 24 poços e estimulados com Concanavalina A 2,5 µg/mL e Ovalbumina 10 µg/mL.

3.11. Titulação de anticorpos anti-OVA (IgG e IgA)

Os níveis de anticorpos anti-OVA no soro (IgG total e IgA) e no lavado intestinal (IgA secretado), foram determinados por ELISA indireto, utilizando o leitor automático de microplacas Biotek Powerwave 340. Placas de ELISA High Binding (Corning, NY) 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 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 e as placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de cinco lavagens, as amostras foram adicionadas aos poços da placa, em diluições seriadas de 1/2 a 1/16. Após mais um ciclo de lavagens (5x) com PBS-T, as placas foram incubadas com imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugada com peroxidase (HRPO) (Sigma), anti-IgG (diluído 1:10.000) e anti-IgA (diluído 1:500). Sessenta minutos mais tarde, os reagentes foram removidos por lavagem e a reação foi revelada pela adição de 50µL de substrato/cromógeno, (H₂O₂ 0,03% (Synth) e ortofenilenodiamina 0,04% (OPD) (Sigma), em tampão

ácido cítrico/fosfato di-sódio, pH 5,5). Após 30 minutos no escuro, 25 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4N foram adicionados aos poços da placa, para o bloqueio das reações. As absorbâncias foram obtidas através de leitura no comprimento de onda a 492nm.

3.12. Análise estatística:

Todos os dados foram apresentados como média aritmética \pm Desvio Padrão (DP) e estatisticamente analisados pelo teste t de Student. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1. Atividade inibitória do resveratrol sobre macrófagos Raw 264.7 ativados com LPS:

Nos macrófagos Raw 264.7, o resveratrol adicionado ao meio de cultura 1 hora antes do desafio com 1 µg/ml de LPS por 24 horas, foi capaz de reduzir a produção a $55,58 \pm 3,90$ % de óxido nítrico na concentração de 5 µM, em relação ao controle (somente LPS), sem alteração significativa da viabilidade celular através do teste de MTT(dados não mostrados). Na ausência de estimulação com LPS, a produção de NO pela célula RAW 264.7 é indetectável. (Gráfico 1)

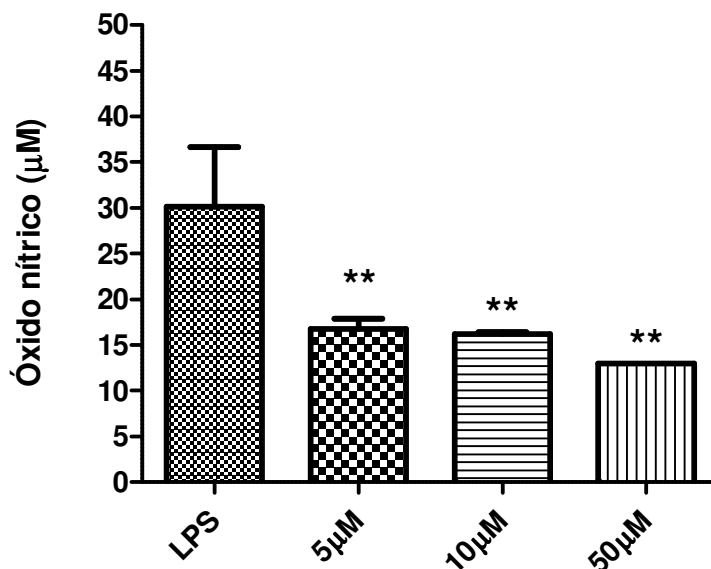


Gráfico 1: Efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico das diferentes concentrações de resveratrol sobre a cultura de macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml) por 24 h. Controle: só LPS ($30,10 \pm 5,65$ µM); ** $p < 0,01$. n = 3

A inibição da produção de óxido nítrico na linhagem RAW 264.7 de 55%, após o tratamento com resveratrol corresponde aos resultados já publicados anteriormente. (TSAI; LIN-SHIAU; LIN, 1999) Este experimento pode ser considerado como uma validação do método de dosagem de óxido nítrico estabelecido, das células e da manipulação do resveratrol.

Vários polifenóis, incluindo os flavonoides e extratos contendo misturas polifenólicas, já foram ou estão sendo testados *in vitro* quanto à capacidade de inibição da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos. Este fato consagrou os polifenóis, em especial os flavonoides (agliconas ou não) como substâncias com ação anti-inflamatória e antioxidante. As vias de ativação do fator de transcrição NF-KB e, portanto, da enzima iNOS são bloqueadas por essas substâncias. (LIN; LIN, 1997) (SIES; SCHEWE; HEISS, 2005)

Embora, os vários trabalhos relatem a atividade inibitória de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células dendríticas pelo resveratrol, existem alguns resultados contraditórios por demonstrarem aumento de TNF- α , IL-1 e ativação de NF-KB em macrófagos ativados por LPS. (WADSWORTH; KOOP, 1999; FENG; ZOU; LI, 2002). Geralmente o efeito anti-inflamatório do resveratrol é observado em experimentos realizados sem a suplementação de soro fetal bovino no meio de cultura, o que também pode exacerbar os efeitos citotóxicos. (RADKAR; LAU-CAM; HARDEJ, 2008)

Uma das maiores fontes de iNOS são os macrófagos, sendo encontrado em altos níveis durante infecções e doenças inflamatórias. É uma molécula citotóxica efetora responsável pela citotoxicidade mediada por macrófagos, além modular a proliferação celular de linfócitos estimulados por antígeno ou algum mitógeno, agindo como um imunorregulador. (HOLAN; KRULOVA; ZAJICOVA, 2002)

NO também é um modulador importante da migração de linfócitos entre as placa de peyer e regiões não-linfoides do intestino devido ao aumento do rolamento e aderência dos linfócitos em vênulas de placas de peyer e submucosas. (HOKARI; MIURA; FUJIMORI, 1998) As células intestinais, dos

vilos, possuem altos níveis de ativação da iNOS, e o NO derivado é um mediador chave da recuperação do epitélio após uma injúria aguda da mucosa.

O resveratrol ainda possui sua ação diferenciada por comprovadamente causar a ativação da NOS endotelial (eNOS) e produção de NO pelas células epiteliais que recobrem os vasos, tendo uma grande parte da responsabilidade pelas propriedades vasorelaxantes e cardioprotetoras através do consumo periódico de vinhos. (WALLERATH; LI; GODTEL-AMBRUST, 2005)

Quando administrado em camundongos antes da indução de colite crônica, o resveratrol é capaz de reduzir a ativação iNOS, a concentração de TNF- α e IL1- β e aumentar a de IL-10 em amostras do cólon.

Com esse resultado espera-se que *in vivo* o resveratrol tenha efeito modulador sobre as células dendríticas presentes na mucosa, responsáveis pela captação de antígeno, no caso, a ovalbumina.

4.2. Efeito na captação de proteína por macrófagos Raw 264.7 pelo resveratrol:

No ensaio realizado em Raw 264.7 foi utilizado o BSA marcado com FITC para monitorar o efeito da captação por pinocitose. No caso do BSA e da própria ovalbumina, a maior parte da captação não é mediada por receptores de manose, como é o caso das moléculas correspondentes manosiladas (man-BSA-FITC).

A concentração de resveratrol 50 μ M aumentou em quase 3 vezes a captação do BSA-FITC. (Gráfico 2) O mesmo foi observado na concentração de 25 μ M, com nenhum efeito significativo observado nos tratamentos com 6,25 e 12,5 μ M. Com 100 μ M foi observada uma diminuição significativa na intensidade de fluorescência média. Através da coloração com o corante fluorescente pode-se observar que não houve efeito citotóxico em nenhum dos tratamentos, indicando que na maior concentração testada há uma inibição da

captação de BSA-FITC pelas células. Os controles com DMSO 0,1% e 0,05% não apresentaram diferença significativa em relação ao controle com meio de cultura.

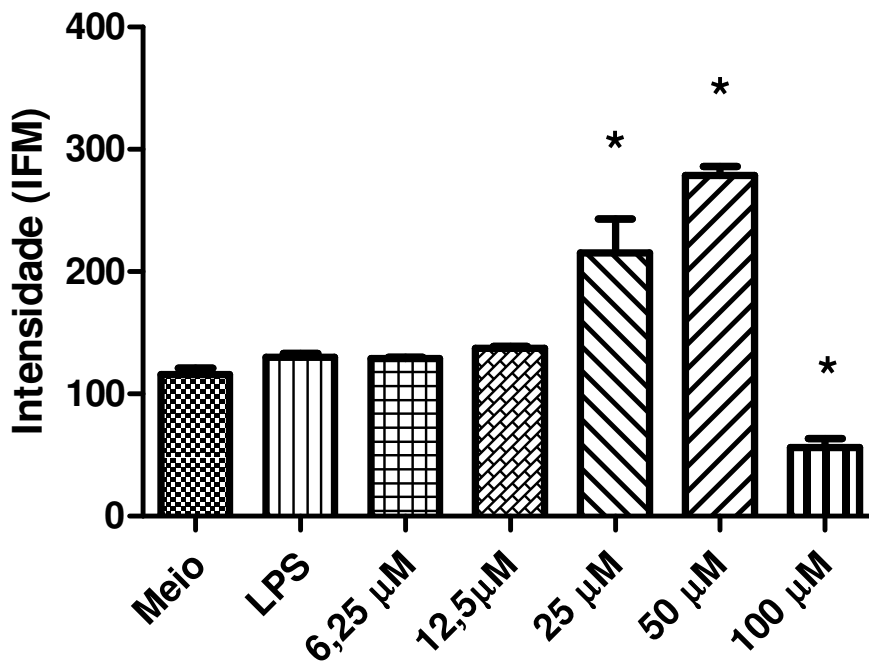


Gráfico 2: Efeito sobre a captação de BSA-FITC em macrófagos após os diferentes tratamentos com LPS (1 µg/ml) e resveratrol (6,25µM a 100 µM) por 24 h. * $p < 0,05$. $n = 3$. IFM: Intensidade de Fluorescência Média.

Um dos efeitos adjuvantes esperados durante a vacinação de mucosa é o aumento do *uptake* (captação) de proteínas pelas células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos, células dendríticas e monócitos.

Sallusto e colaboradores (1995) demonstraram que células dendríticas possuem dois mecanismos especializados para a captura antigênica: Através de receptores de manose e macropinocitose. Esses dois mecanismos fazem a captação e concentração de macromoléculas em compartimentos intracelulares para posterior apresentação via MHC Classe I ou II. (SALLUSTO; CELLA; DANIELI, 1995). Os receptores de manose permitem a fagocitose de leveduras e partículas/glicoproteínas manosiladas. A macropinocitose tem sido caracterizada em células epiteliais e macrófagos como um mecanismo citoesqueleto-dependente de captação de fluidos, via transporte ativo. No intestino a pinocitose é o processo pelo qual, proteínas solúveis são endocitadas pelas células do epitélio.

O LPS é um indutor de endocitose via receptores de manose, por isso com BSA-FITC não foi observada diferença significativa na captação.

Kim e colaboradores (2004), relataram o aumento da internalização de dextran-FITC via receptor de manose após o tratamento com 10 µg/mL (≈ 50 µM) de resveratrol. Relacionando o aumento da pinocitose com a inibição da maturação de células dendríticas após o tratamento com resveratrol. (KIM; CHO; AHN, 2004)

4.3.Efeito sobre a secreção de IL-6 e IL-10 em células de placas de Peyer:

A secreção de IL-6 em células de placas de peyer estimuladas com o mitógeno de linfócitos concanavalina A 2,5 µg/mL foi inibida significativamente pelo resveratrol em 5 e 50 µM quando comparada ao controle. Porém, não houve produção de IL-6 no controle com a adição de DMSO 0,5% presente também no tratamento com resveratrol a 50 µM. No estímulo com LPS 1 µg/mL, não houve diferença significativa. (Tabela 1)

Em relação à secreção de IL-10, não houve diferença significativa nos diferentes tratamentos e estímulos em células de placas de peyer *in vitro*, embora haja uma tendência a inibição. Porém os resultados não foram significativos estatisticamente.

Tabela 1: Efeito sobre secreção de IL-6 e IL-10 em células de placas de peyer após os diferentes tratamentos com LPS (1 µg/ml) Con A (2,5 µg/mL) e resveratrol (5 µM, 50 µM) por 72 h. A dosagem de IL-6 em células não estimuladas foi de 58,9 ± 14,5 pg/mL e de IL-10 foi 12,7 ± 9,1 pg/mL. DMSO 0,05% é a quantidade existente na concentração de 50 µM de resveratrol *p< 0,05. n = 3

IL-6 (pg/mL)		
	Con A 2,5 µg/ mL	LPS 1,0 µg/ mL
Controle	994,4 ± 94, 2	1172,2 ± 235,7
DMSO 0,05 %	0	1516,6 ± 251,4
Resv 5 µM	477,7 ± 196,4 *	1033,3 ± 117,8
Resv 50 µM	19,6 ± 13,8 *	1250 ± 219,9

IL-10 (pg/mL)		
	Con A	LPS
Controle	38,0 ± 14,1	19,6 ± 2,3
DMSO 0,05 %	13,0 ± 7,0	21,3 ± 4,7
Resv 5 µM	18, 0 ± 0,1	24,6 ± 4,7
Resv 50 µM	5,6 ± 8,9	11,3 ± 9,4

Existem evidências do aumento de IL-10 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS e supressão dose-dependente de IL-6, IL-1 e TNF- α ocasionado pelo tratamento *in vitro* com resveratrol (20 μ M) postula-se que pode haver a diminuição de ativação de linfócitos T e B e conseqüentemente inibição da produção de anticorpos. (SHARMA; CHOPRA; KULKARNI, 2007)

A IL-6 é produzida por diversos tipos celulares incluindo APC's e possui a capacidade de induzir a diferenciação dos linfócitos B. Respostas imunes em mucosas são caracterizados pela secreção de IgA, sendo as placas de peyer representam o sítio primário de processamento e apresentação antigênica no intestino e o principal sítio de indução.

Estudos sugerem que as células dendríticas (DC's) são as principais células apresentadoras de antígenos presentes na a cúpula subepitelial, região adjacente ao epitélio associado ao folículo. Sato e colaboradores (2003), demonstraram que as células DC's de placas de peyer podem produzir altos níveis de IL-6 comparadas as DC's de baço e induzir a produção de IgA secretada. (SATO; HASHIGUCHI; TODA, 2003)

A diminuição de IL-6 causada pelo tratamento com resveratrol observada em células de placa de peyer pode causar, *in vivo*, a inibição na produção de IgA em mucosa após a imunização com ovalbumina oral.

O intestino é continuamente exposto à flora bacteriana, antígenos alimentares e potenciais agentes patogênicos. Para evitar a inflamação intestinal crônica, diferentes populações linfocitárias reguladoras (Tregs) mantém a resposta imune em cheque. Estas populações usam vários mecanismos de regulação e o melhor caracterizado que envolve a interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento transformador- β (TGF- β)

As células T expostas ao antígeno através das placas de peyer se diferenciam *in vivo* em células com funções imunorreguladoras. Por isso a importância de estudar a influência do resveratrol na secreção de IL-10 em

linfócitos de placas de peyer *in vitro* e *in vivo*. (FROSSARD; TROPIA; HAUSER, 2004)

4.4. Influência da administração oral de resveratrol em camundongos BALB/C na secreção de IL-10 em esplenócitos:

A administração de 10 mg de resveratrol por kg de peso em camundongos Balb/c, induziu significativamente a produção e liberação de IL-10 em esplenócitos estimulados ou não com concanavalina A 2,5 ug/mL.

Sem estímulos *in vitro* os valores médios foram: $31,3 \pm 9,4$ ug/mL para o controle, $34,6 \pm 4,7$ ug/mL (Resv 5 mg/kg) e $201,3 \pm 14,1$ ug/mL (Resv 10 mg/kg).

Em nenhum relato na literatura científica houve a correlação de ingestão de resveratrol e aumento de secreção de IL-10 *ex vivo* em células do baço.

A Interleucina-10 é geralmente produzida por células Th2, as quais possuem, entre outras funções, propriedades anti-inflamatórias. O resveratrol é considerado um fitoestrógeno, pode se ligar a receptores de estrógeno e possuir respostas imunomodulatórias *in vitro* como o 17-beta-estradiol natural. *In vitro* esplenócitos estimulados com PMA/ionomicina, o tratamento com 10 μ M de resveratrol causou uma ligeira tendência a aumentar a secreção de IL-10 e diminuição significativa da relação entre as concentrações de IFN γ /IL-10 secretados. (RACHON; RIMOLDI; WUTTKE, 2006)

Diversos trabalhos com 17b-estradiol *in vivo* demonstraram o aumento da expressão de IL-10, IL-4 e TGF- β por células T(Th2), com concomitante diminuição de citocinas inflamatórias como IFN- γ (Th1), direcionando a resposta imune para o tipo Th2. Delassus e colaboradores (1994) verificaram que os níveis de expressão de IL-4 e IL-10 em mulheres nos primeiros meses de gestação apresentavam níveis séricos altos dessas citocinas. (DELASSUS; COUTINHO; SAUCIER, 1994).

Normalmente a IL-10 é produzida por macrófagos, células dendríticas ou ainda linfócitos T regulatórios(Th2 não específico).

Já foi descrito o aumento de IL-10 em macrófagos peritoneais e células dendríticas após o tratamento com resveratrol. Em células dendríticas o aumento de IL-10 só ocorre em concentrações maiores a 10 μ M de resveratrol. (SVAJGER; OBERMAJER; JERAS, 2010)

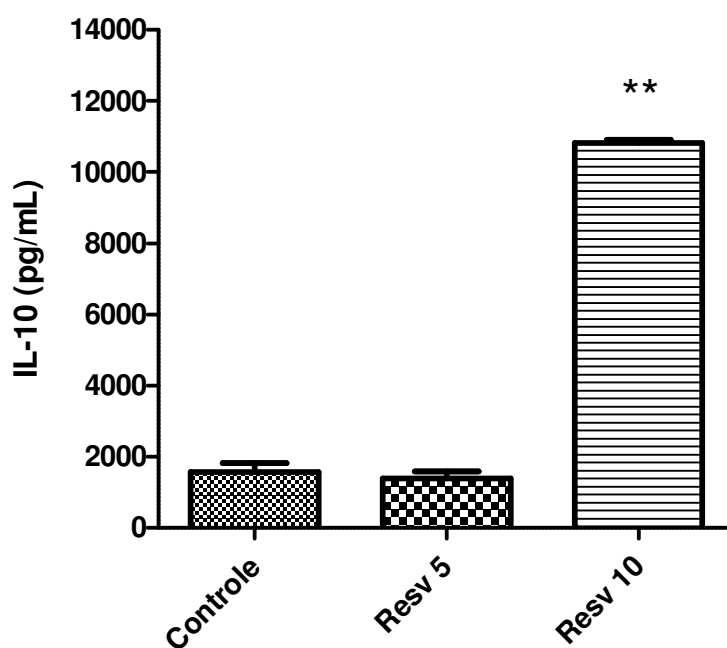


Gráfico 3: Efeito sobre secreção de IL-10 em esplenócitos após a administração oral de Resveratrol (5 mg/kg e 10 mg/kg). Os esplenócitos foram isolados em grupos e plaqueados em triplicata por 48 horas. **p< 0,01.

4.5. Influência da administração oral de resveratrol e ovalbumina em camundongos BALB/C na secreção de IL-10 em esplenócitos:

Sem estímulo em cultura os esplenócitos do grupo ao qual só foi administrado Ovalbumina a secreção de IL-10 foi de $15,08 \pm 9,6$ pg/mL. Quando administrada em conjunto com resveratrol 5 mg/kg e 10 mg/kg os valores foram $13,0 \pm 7,0$ pg/mL e $58 \pm 9,4$ pg/mL.

No gráfico 4A mostra a secreção de IL-10 após o estímulo *in vitro* com ovalbumina 10 µg/mL por 48 horas. O mesmo perfil foi encontrado, com a diferença do tratamento com Resveratrol 5 mg/kg, houve aumento significativo na secreção de IL-10. Não houve diferença estatisticamente relevante entre os esplenócitos não estimulados e os tratados com o antígeno OVA. Isso provavelmente se deve à baixa concentração de antígeno utilizada (na literatura se encontra desde 10 µg/mL a 1 mg/mL). (Gráfico 4)

No gráfico 4B o perfil de resposta foi o mesmo, com aumento significativo de IL-10 em esplenócitos extraídos do grupo com administração concomitante de ovalbumina e resveratrol 10 mg/kg, os quais foram expostos a Concanavalina A(ConA) *in vitro*.

Rachon (2006), utilizou PMA/ionomicina (estímulo de linfócitos T e B), para analisar o efeito do resveratrol sobre a secreção de IL-10 em esplenócitos *in vitro* e detectou um ligeiro aumento na produção da citocina. Porém Feng (2002) observou diminuição de IL-10 causada em baixas concentrações de Resveratrol (0,75 a 6 µM) em cultura de esplenócitos estimulados por Sac (*Staphylococcus aureus* Cowan) um potente mitógeno e estimulador direto de linfócito B.(FENG; ZHOU; WU, 2002; RACHON; RIMOLDI; WUTTKE, 2006)

Porém evidências contraditórias em relação ao efeito imunomodulatório do resveratrol têm sido relatadas, como no caso de Gao e colaboradores (2003) que compararam os efeitos *in vitro* e *in vivo* do resveratrol em relação à proliferação de linfócitos T e produção de citocinas. Eles encontraram efeitos

supressivos *in vitro* em concentrações em torno de 25 μ M, porém após a administração de 80 mg/kg por 2 e 4 semanas, não houve alteração da proliferação de linfócitos T isolados após estímulo *in vitro* com concanavalina A e IL-2. As secreções das citocinas IFN- γ e IL-12, não foram alteradas, apenas a resposta ao desafio com LPS, onde houve diminuição da secreção de TNF- α . (GAO; DEEB; MEDIA, 2003)

O efeito *in vitro* imunossupressor, normalmente é observado em concentrações maiores que as encontradas normalmente em ingestões diárias de alimentos e bebidas contendo resveratrol.

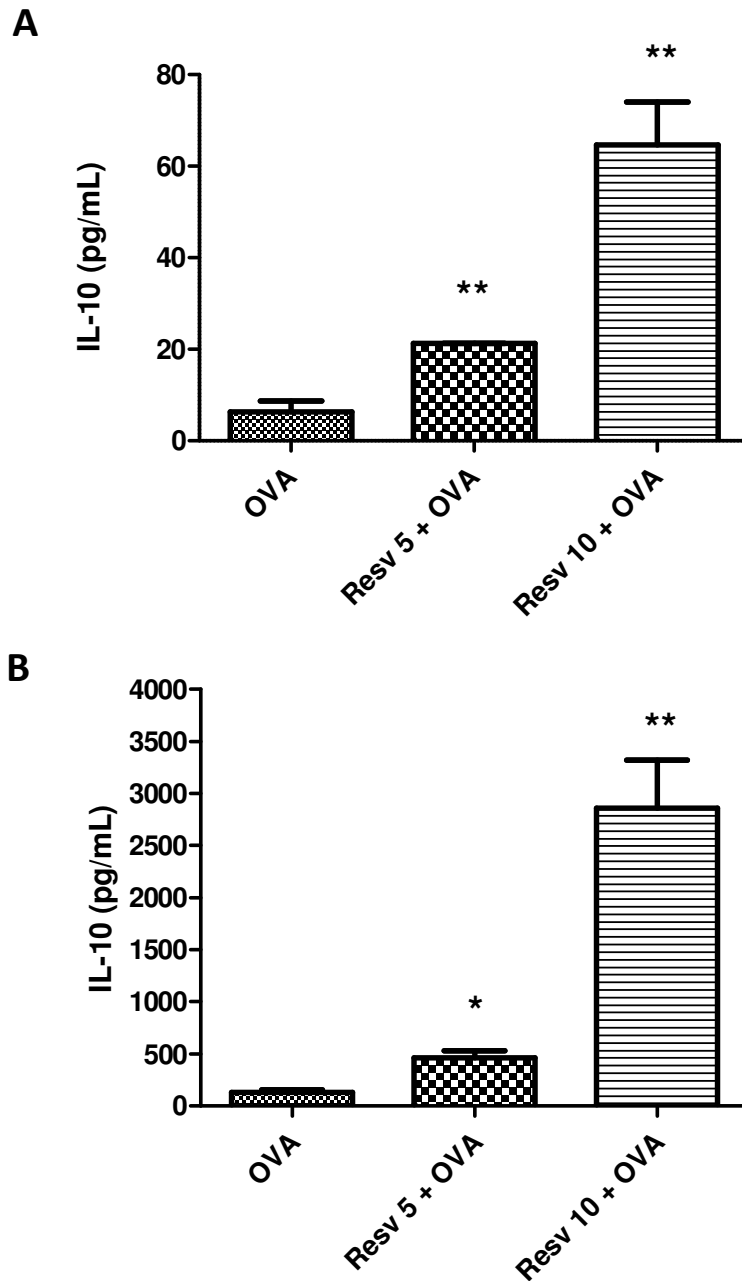


Gráfico 4: Efeito sobre secreção de IL-10 em esplenócitos após a administração oral de Resveratrol (5 mg/kg e 10 mg/kg) com ovalbumina 1mg/animal. As imunizações foram realizadas 2x com 14 dias de diferença. Após 21 dias de experimento os animais foram sacrificados. Os esplenócitos foram isolados em grupos e plaqueados em triplicata por 48 horas. *Gráfico A:* Estímulo *in vitro* com Ovalbumina 10 µg/mL; *Gráfico B:* Estímulo *in vitro* com Concanavalina A. *p< 0,05, **p< 0,01.

4.6. Efeito do resveratrol na produção de IgG anti-OVA:

Após 21 dias da primeira imunização dos animais com 1 mg de ovoalbumina/animal e 5 mg/kg ou 10 mg/kg, os animais foram pesados, o sangue por via plexo retro-orbital coletado e sacrificados para análise das células de baços dos respectivos grupos. (Tabela 2)

Tabela 2: Tabela de Pesos dos animais utilizados no Ensaio *in vivo* (média \pm DP) As imunizações foram realizadas 2x com 14 dias de diferença. Após 21 dias de experimento os animais foram sacrificados. n=5. a: p < 0,05, significância em relação ao grupo controle ; b: p< 0,05, significância em relação ao grupo de tratamento com Resveratrol 5 mg/kg; c: p< 0,01, significância em relação ao grupo de tratamento com Resveratrol 10mg/kg

Tratamentos	Peso Médio \pm DP
Controle	26,86 \pm 0,44
OVA	25,1 \pm 1,95 ^a
Resv 5 mg/kg	27,28 \pm 1,10
Resv 10 mg/kg	27,92 \pm 2,43
Resv 5 mg/kg + OVA	25,98 \pm 1,07 ^{a,b}
Resv 10 mg/ kg + OVA	25,04 \pm 1,28 ^{a,c}

Os animais que receberam 1 mg de ovalbumina com e sem resveratrol, tiveram o peso médio reduzido e a diferença foi significativa em relação ao grupo controle e em relação aos animais que só ingeriram diferentes quantidades de resveratrol. Isso possivelmente ocorreu devido à injúria tecidual

do intestino causada pela ovalbumina ou pelo bicarbonato de sódio, administrado para minimizar o impacto do pH ácido estomacal sobre a integridade protéica do antígeno modelo.

Quanto a produção de IgG presente no soro, somente o grupo com dosagem de 5 mg/kg de resveratrol associado a ovalbumina obteve resposta. Sendo significativa ($p < 0,05$) a diferença em relação ao grupo que ingeriu somente ovalbumina. (Gráfico 5)

Esse resultado reproduziu outro experimento realizado com uma concentração menor de ovalbumina (100 μ g/animal) dissolvidos em 10 μ M de resveratrol, só que com um valor mais baixo de densidade ótica e diluição do soro(dados não mostrados).

O resveratrol na dosagem de 5mg/kg pode ter aumentado a captação de OVA pelas células epiteliais do intestino e células dendríticas. O aumento de captação causado pelo resveratrol foi observado *in vitro* em macrófagos. Os antígenos que alcançam a corrente sanguínea podem ser captados pelo baço, principal sítio de resposta imune sistêmica.

Na dosagem de 10 mg/kg, foi observada uma resposta menor a 5 mg/kg e a diferença é significativa estatisticamente($p < 0,05$) . Como foi observado um aumento da secreção de IL-10 no baço em camundongos tratados com resveratrol 10mg/kg, a menor produção de IgG, pode ser pelo efeito anti-inflamatório, inibitório da ativação de linfócitos T. Essa diferença discrepante entre as diferentes concentrações de resveratrol condiz com que foi encontrado *in vitro*. Em maiores concentrações os efeitos anti-inflamatórios são exarcebados.

Feng e colaboradores (2002) após um experimento de ingestão de 4mg/kg de resveratrol, as células dendríticas do baço expressaram mais moléculas MHC-I e MHC-II. O aumento da resposta imune sistêmica pode ter acontecido devido a melhor apresentação antigênica e ativação linfocitária no baço.(FENG; ZHOU; WU, 2002)

A ausência de resposta em relação à ovalbumina é esperada, pois proteínas purificadas são pouco imunogênicas. Além disso, o pH do estômago, mesmo após o bicarbonato pode degradar a proteína e dependendo da quantidade e frequência, induzir a tolerância oral.

A dosagem de ovalbumina via oral está influenciando os baixos níveis de IgG encontrados, porém não foram realizados desafios imunológicos para se ver resposta sustentada, após os quais poderia se quantificar a produção de anti-OVA ao longo do tempo. Após os desafios intraperitoniais de ovalbumina os níveis de anticorpos específicos tendem a aumentar no caso da imunização ser eficiente.

Com estímulo inflamatório, já foi demonstrado em modelo alérgico de asma causada pela ovalbumina que o resveratrol coadministrado na concentração de 30 mg/kg foi capaz de reduzir a produção de IgE, inibir o aumento de citocinas do tipo Th2(IL-4 e IL-5) no plasma, porém sem alterar a produção de IgG total no soro. (LEE; KIM; KWON, 2009)

Após o tratamento de células PBMC, o resveratrol mostrou ser possível proteger os linfócitos B ativados por aumentar a expressão de proteínas antiapoptóticas, prolongando a resposta humoral contra um antígeno. (ZUNINO; STORMS, 2009)

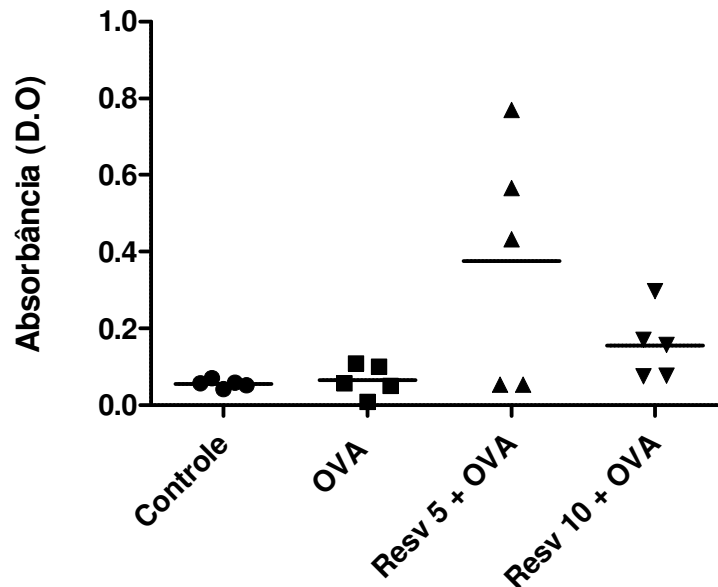


Gráfico 5: Efeito sobre a produção de IgG anti-OVA total após a administração concomitante de ovalbumina (1mg) e resveratrol 5mg/kg e 10 mg/kg. Densidade ótica (D.O.) do teste para detecção de IgG anti-OVA nos soros diluídos 1/16 de animais BALB/C imunizados via oral e controle. Dosagens realizadas em duplicata.

4.7. Efeito do resveratrol na produção de IgA em soro e lavado intestinal específicos para ovalbumina:

As dosagens no soro e no lavado demonstraram que houve resposta à nível sistêmico e de mucosa. Porém, o grupo que só foi imunizado com ovalbumina, teve a maior resposta, seguido pelo grupo imunizado com a adição de 5 mg/kg e 10 mg/kg de resveratrol, como pode ser observado no Gráfico 6.

A administração oral de antígenos pode ser utilizada para induzir tolerância imune periférica antígeno-específica. Chen e colaboradores(1995) avaliaram a existência de deleção de linfócitos T-ativados por ovalbumina oral em altas concentrações nas placas de peyer. Em baixas doses de ovalbumina oral (0,5 mg) e em pouca frequência(<5 x), o mecanismo de tolerância por deleção não foi observado. Porém, nesse experimento houve aumento significativo da produção de IL-10, IL-4 e TGF- β (Th2) em células de placas de peyer, concomitantemente ao aumento de Linfócitos CD4⁺ antígeno-específicos.(CHEN; INOBE; MARKS, 1995)

A diminuição da resposta de IgA-s nos tratamentos com OVA e resveratrol pode ter alguma relação com a inibição de IL-6, em placas de peyer no tratamento com resveratrol *in vitro*.

O resveratrol por diminuir a resposta de mucosa contra um antígeno, pode demonstrar sua capacidade imunossupressora, provavelmente aumentando a tolerância oral contra a ovalbumina em camundongos.

Zhang e colaboradores estudaram a correlação entre ativadores de sirtuínas, que o caso do resveratrol, com o aumento de tolerância periférica. O resveratrol pode regular negativamente a ativação de célula T e possuir um papel importante na anergia clonal de células T em camundongo. (ZHANG; LEE; SHANNON, 2009)

Sirtuínas regulam várias intracelulares de ativação de fatores de transcrição e enzimas envolvidas na disponibilidade de nutrientes. SIRT1(um dos subtidos de sirtuínas) é ativada pelo resveratrol e causa efeitos benéficos em relação a longevidade celular. (BROOKS; GU, 2009). Está envolvida em processos vitais como reparo de DNA, sobrevivência celular, gliconeogênese, regulação do ciclo celular, metabolismo lipídico e sensibilidade à insulina. (BAUR; PEARSON; PRICE, 2006)

Os ativadores de células de SIRT1 podem ser úteis na terapêutica para o tratamento/prevenção de doenças auto-imunes como a esclerose múltipla, artrite reumatóide e diabetes tipo 2.

O extrato de *Polygonum cuspidatum* , que é uma das mais ricas fontes conhecidas de ativador SIRT1, o resveratrol, tem sido amplamente utilizado para o tratamento de doenças auto-imunes, a artrite reumatóide, em particular, na China. Além disso, ativadores SIRT1 tem sido utilizados com sucesso para o tratamento da diabetes tipo 2.(ZHANG; LEE; SHANNON, 2009)

A resposta imune pode desempenhar um papel patogênico em um amplo espectro de doenças inflamatórias, incluindo reações de hipersensibilidade a antígenos ambientais (doenças alérgicas), falso reconhecimento de auto-antígeno (doenças auto-imunes) e ataque imunológico contra aloantígenos durante o transplante. Assim, torna-se crucial suprimir a resposta do sistema imunológico para controlar o dano causado aos tecidos.

Apesar de várias drogas imunossupressoras estarem disponíveis, seus mecanismos de ação ainda não são conhecidos com precisão além de possuírem atividade tóxica elevada. A mudança na expressão de moléculas co-estimulatórias, secreção de citocinas e frequência de células T reguladoras podem influenciar o resultado em muitas patologias.

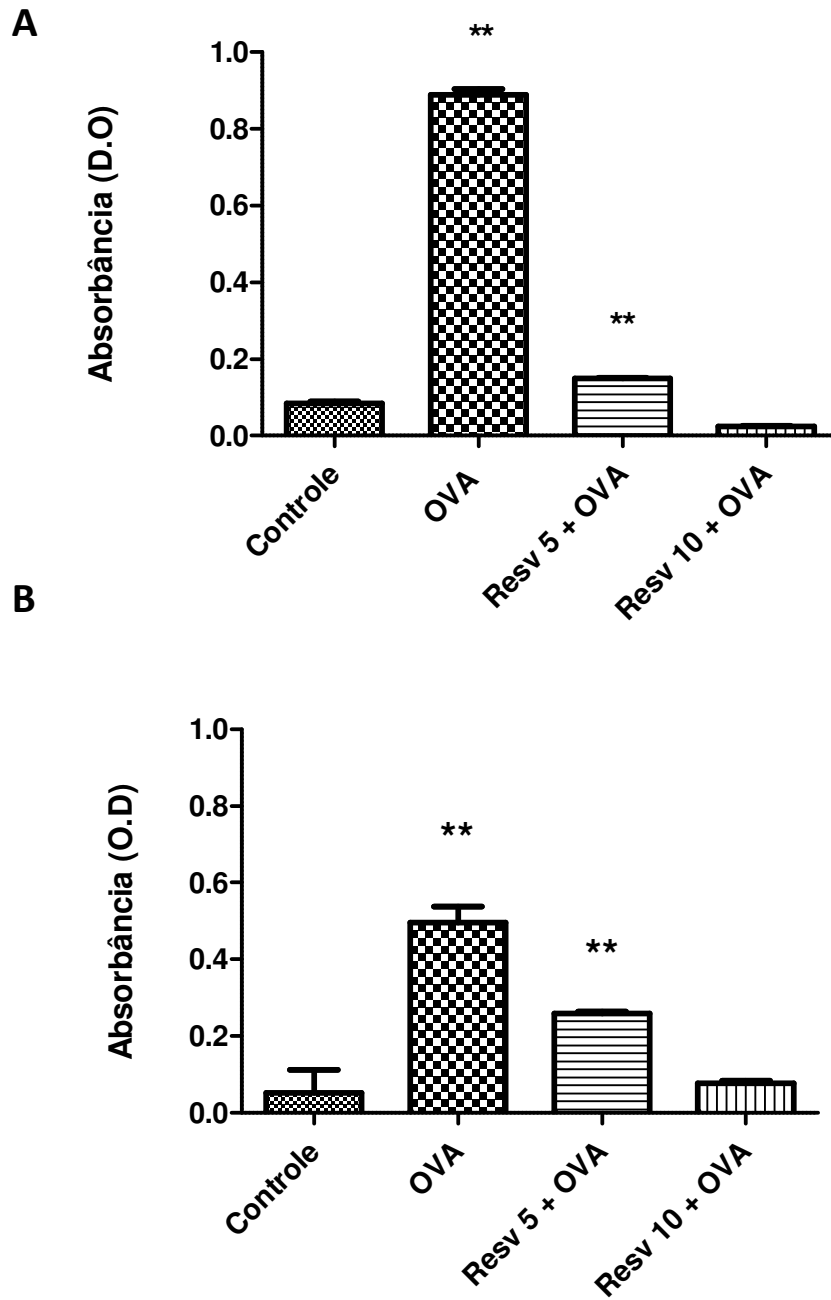


Gráfico 6: Efeito modulador do resveratrol na produção de IgA sérico (A) e no lavado intestinal (B) na imunização oral com 1 mg de ovalbumina de camundongos Balb/c. ** $p < 0,01$. Dosagens realizadas em duplicata.

5. CONCLUSÕES:

In vitro, os testes realizados em macrófagos de linhagem demonstraram que o resveratrol possui um efeito inibitório e preventivo sobre a produção de óxido nítrico, confirmando dados da literatura sobre a ação antiinflamatória dessa substância. Porém, a mesma inibição não foi observada quanto a capacidade de captação de proteína pelas células, inclusive sendo observado um aumento significativo após o tratamento com até 50 μ M de resveratrol.

Em células isoladas de placas de peyer, foi encontrado um efeito supressor sobre a produção de IL-6, após o tratamento com concanavalina A, ainda a ser confirmado em experimentos futuros devido a concentração de DMSO existente na preparação do resveratrol. Entretanto *in vivo* qualquer alteração dessa citocina nos principais sítios de captação de antígenos da mucosa gastrointestinal pode significar em diminuição da produção de IgA.

Este fato pode ser observado após a imunização com ovalbumina e resveratrol, que apresentou uma menor quantidade de IgA detectável no soro e no lavado intestinal em comparação com o grupo controle imunizado somente com ovalbumina.

A produção de IgG sérico anti-OVA foi maior nos grupos contendo resveratrol, ao contrário do que aconteceu com a IgA, talvez devido ao aumento de captação da ovalbumina no intestino delgado e transporte direto pelas vênulas do endotélio alto aos sítios indutores da resposta imune sistêmica. A observação de que nos grupos que receberam 10 mg/kg de resveratrol houve aumento significativo da produção de IL-10 pode ser relacionada a diminuição da concentração de IgG em relação ao grupo que recebeu 5 mg/kg, comprovando mais uma vez a atividade antiinflamatória e imunossupressora do resveratrol em concentrações mais elevadas.

Um novo ensaio em animais, com desafio intraperitoneal, pode ser interessante para avaliar a ocorrência de tolerância sistêmica e periférica ou a sustentação da resposta imunológica ao longo do tempo.

Com os resultados apresentados podemos concluir que dependendo da concentração, via de administração e sinergismo com outras substâncias, o resveratrol pode aumentar ou diminuir a resposta imune *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. **Resveratrol in health and disease**. Florida: CRC Press, 2006.

ANJUERE, F.LUCI, C.LEBENS, M. *et al.* In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. **J Immunol**, v. 173, n. 8, p. 5103-11, 2004.

BAUR, J. A.PEARSON, K. J.PRICE, N. L. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337-42, 2006.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BROOKS, C. L.; GU, W. Anti-aging protein SIRT1: a role in cervical cancer? **Aging (Albany NY)**, v. 1, n. 3, p. 278-80, 2009.

BRYCE, J.BOSCHI-PINTO, C.SHIBUYA, K. *et al.* WHO estimates of the causes of death in children. **The Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1147-1152, 2005.

BUCKNER, D.WILSON, S.KURK, S. *et al.* Use of Early Passage Fetal Intestinal Epithelial Cells in Semi-High-Throughput Screening Assays: An Approach to Identify New Innate Immune System Adjuvants. **J Biomol Screen**, v. 11, n. 6, p. 664-671, 2006.

CHEN, J.ING, C. P.ROWLANDS, D. K. *et al.* Interaction between enteric epithelial cells and Peyer's patch lymphocytes in response to Shigella lipopolysaccharide: effect on nitric oxide and IL-6 release. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 24, p. 3895-900, 2006.

CHEN, Y.INOBE, J.MARKS, R. *et al.* Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 177-80, 1995.

CHO, D.-I.KOO, N.-Y.CHUNG, W. J. *et al.* Effects of resveratrol-related hydroxystilbenes on the nitric oxide production in macrophage cells: structural requirements and mechanism of action. **Life Sciences**, v. 71, n. 17, p. 2071-2082, 2002.

CHU, W. H. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 21, n. 1, p. 113-7, 2006.

COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 6, p. 435-446, 2008.

- DE GREGORIO, E.; D'ORO, U.; WACK, A. Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 339-45, 2009.
- DELASSUS, S.COUTINHO, G. C.SAUCIER, C. *et al.* Differential cytokine expression in maternal blood and placenta during murine gestation. **J Immunol**, v. 152, n. 5, p. 2411-20, 1994.
- FALCHETTI, R.FUGGETTA, M. P.LANZILLI, G. *et al.* Effects of resveratrol on human immune cell function. **Life Sci**, v. 70, n. 1, p. 81-96, 2001.
- FENG, Y. H.ZHOU, W. L.WU, Q. L. *et al.* Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. **Acta Pharmacol Sin**, v. 23, n. 10, p. 893-7, 2002.
- FENG, Y. H.ZHU, Y. N.LIU, J. *et al.* Differential regulation of resveratrol on lipopolysacchride-stimulated human macrophages with or without IFN-gamma pre-priming. **Int Immunopharmacol**, v. 4, n. 6, p. 713-20, 2004.
- FENG, Y. H.; ZOU, J. P.; LI, X. Y. Effects of resveratrol and ethanol on production of pro-inflammatory factors from endotoxin activated murine macrophages. **Acta Pharmacol Sin**, v. 23, n. 11, p. 1002-6, 2002.
- FISCHER, G.CLEFF, M. B.DUMMER, L. A. *et al.* Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 116, n. 1-2, p. 79-84, 2007.
- FISCHER, G.CONCEICAO, F. R.LEITE, F. P. *et al.* Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250-6, 2007.
- FROSSARD, C. P.TROPIA, L.HAUSER, C. *et al.* Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, n. 5, p. 958-64, 2004.
- GAO, X.DEEB, D.MEDIA, J. *et al.* Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant in vitro and in vivo immunological effects. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 12, p. 2427-35, 2003.
- GAO, X.XU, Y. X.JANAKIRAMAN, N. *et al.* Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 9, p. 1299-308, 2001.
- GAUTAM, M.GAIROLA, S.JADHAV, S. *et al.* Ethnopharmacology in vaccine adjuvant discovery. **Vaccine**, v. 26, n. 41, p. 5239-40, 2008.
- GLENNY, A. T.POPE, C. G.WADDINGTON, H. *et al.* The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. **J. Path. Bacteriol**, v. 29, p. 38-45, 1926.

HOKARI, R.MIURA, S.FUJIMORI, H. *et al.* Nitric oxide modulates T-lymphocyte migration in Peyer's patches and villous submucosa of rat small intestine. **Gastroenterology**, v. 115, n. 3, p. 618-27, 1998.

HOLAN, V.KRULOVA, M.ZAJICOVA, A. *et al.* Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immune system. **Mol Immunol**, v. 38, n. 12-13, p. 989-95, 2002.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S45-53, 2005.

INGULLI, E.MONDINO, A.KHORUTS, A. *et al.* In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. **J Exp Med**, v. 185, n. 12, p. 2133-41, 1997.

JANEWAY, C. A., JR. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 54 Pt 1, p. 1-13, 1989.

JEONG, W. S.KIM, I. W.HU, R. *et al.* Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. **Pharm Res**, v. 21, n. 4, p. 661-70, 2004.

JEPSON, M. A.; CLARK, M. A. Studying M cells and their role in infection. **Trends Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 359-65, 1998.

KALDAS, M. I.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. **J Pharm Pharmacol**, v. 55, n. 3, p. 307-12, 2003.

KIM, G.-Y.CHO, H.AHN, S.-C. *et al.* Resveratrol inhibits phenotypic and functional maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 2, p. 245-253, 2004.

LAVELLE, E. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 23, p. 2750-2770, 2005.

LEE, M.KIM, S.KWON, O.-K. *et al.* Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 418-424, 2009.

LEIRO, J.ALVAREZ, E.GARCIA, D. *et al.* Resveratrol modulates rat macrophage functions. **Int Immunopharmacol**, v. 2, n. 6, p. 767-74, 2002.

LEVINE, M. M. Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization? **Nat Med**, v. 9, n. 1, p. 99-103, 2003.

LEVINE, M. M.; ROBINS-BROWNE, R. Vaccines, global health and social equity. **Immunol Cell Biol**, v. 87, n. 4, p. 274-278, 2009.

LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 207-221, 2007.

LIN, Y. L.; LIN, J. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. **Mol Pharmacol**, v. 52, n. 3, p. 465-72, 1997.

LINDBLAD, E. B. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3658-3668, 2004.

MAGRONE, T.CANDORE, G.CARUSO, C. *et al.* Polyphenols from red wine modulate immune responsiveness: biological and clinical significance. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 26, p. 2733-48, 2008.

MAGRONE, T.TAFARO, A.JIRILLO, F. *et al.* Elicitation of immune responsiveness against antigenic challenge in age-related diseases: effects of red wine polyphenols. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 26, p. 2749-57, 2008.

MANNICK, J. B. Immunoregulatory and antimicrobial effects of nitrogen oxides. **Proc Am Thorac Soc**, v. 3, n. 2, p. 161-5, 2006.

MARIER, J. F.CHEN, K.PRINCE, P. *et al.* Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. **Can J Vet Res**, v. 69, n. 2, p. 151-4, 2005.

MASCHMANN, E.; KÜSTER, E.; FISCHER, W. Über die Fähigkeit des Tonerde-Präparates B, Diphtherie-Toxin zu adsorbieren. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 64, n. 8, p. 2174-2178, 1931.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, 1997.

MEHANDRU, S.TENNER-RACZ, K.RACZ, P. *et al.* The gastrointestinal tract is critical to the pathogenesis of acute HIV-1 infection. **J Allergy Clin Immunol**, v. 116, n. 2, p. 419-22, 2005.

MILLING, S.YRLID, U.CEROVIC, V. *et al.* Subsets of migrating intestinal dendritic cells. **Immunological Reviews**, v. 234, n. 1, p. 259-267, 2010.

OU, G.BARANOV, V.LUNDMARK, E. *et al.* Contribution of intestinal epithelial cells to innate immunity of the human gut--studies on polarized monolayers of colon carcinoma cells. **Scand J Immunol**, v. 69, n. 2, p. 150-61, 2009.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 221-33, 2009.

PAUL, B.MASIH, I.DEOPUJARI, J. *et al.* Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 71-76, 1999.

PERVAIZ, S.HOLME, A. L.AGGARWAL, B. B. *et al.* Resveratrol: its biologic targets and functional activity. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 11, p. 2851-97, 2009.

PIERRE, P.TURLEY, S. J.GATTI, E. *et al.* Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 787-92, 1997.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4 Suppl, p. S5-11, 2005.

PROKOP, J.ABRMAN, P.SELIGSON, A. L. *et al.* Resveratrol and Its Glycon Piceid Are Stable Polyphenols. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 1, p. 11-14, 2006.

RACHON, D.; RIMOLDI, G.; WUTTKE, W. In vitro effects of genistein and resveratrol on the production of interferon-gamma (IFN γ) and interleukin-10 (IL-10) by stimulated murine splenocytes. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 419-24, 2006.

RADKAR, V.LAU-CAM, C.HARDEJ, D. *et al.* The role of surface receptor stimulation on the cytotoxicity of resveratrol to macrophages. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 12, p. 3664-70, 2008.

READ, S. W.; SERETI, I. HIV infection and the gut: scarred for life? **J Infect Dis**, v. 198, n. 4, p. 453-5, 2008.

REED, S. G.BERTHOLET, S.COLER, R. N. *et al.* New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23-32, 2009.

RELYVELD, E. H.; BIZZINI, B.; GUPTA, R. K. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. **Vaccine**, v. 16, n. 9-10, p. 1016-23, 1998.

RESCIGNO, M.URBANO, M.VALZASINA, B. *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 361-367, 2001.

ROMIER, B.VAN DE WALLE, J.DURING, A. *et al.* Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. **Br J Nutr**, v. 100, n. 3, p. 542-51, 2008.

SAKURE, S.NEGI, V. D.MITRA, S. K. *et al.* Vaccine with herbal adjuvant--A better cocktail to combat the infection. **Vaccine**, v. 26, n. 27-28, p. 3387-3388, 2008.

SALLUSTO, F.CELLA, M.DANIELI, C. *et al.* Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J Exp Med**, v. 182, n. 2, p. 389-400, 1995.

SATO, A.HASHIGUCHI, M.TODA, E. *et al.* CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3684-3690, 2003.

SATO, A.HASHIGUCHI, M.TODA, E. *et al.* CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. **J Immunol**, v. 171, n. 7, p. 3684-90, 2003.

SEDLIK, C.; DERIAUD, E.; LECLERC, C. Lack of Th1 or Th2 polarization of CD4+ T cell response induced by particulate antigen targeted to phagocytic cells. **Int Immunol**, v. 9, n. 1, p. 91-103, 1997.

SHARMA, S.CHOPRA, K.KULKARNI, S. K. *et al.* Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, n. 1, p. 155-163, 2007.

SHI, Y.; ZHENG, W.; ROCK, K. L. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 26, p. 14590-5, 2000.

SIES, H.SCHEWE, T.HEISS, C. *et al.* Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 304S-312S, 2005.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in vaccine adjuvants. **Pharm Res**, v. 19, n. 6, p. 715-28, 2002.

SPENCER, J.; BARONE, F.; DUNN-WALTERS, D. Generation of Immunoglobulin diversity in human gut-associated lymphoid tissue. **Semin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 139-46, 2009.

SPRIGGS, D. R.; KOFF, W. C. **Topics in Vaccine Adjuvant Research** Florida: CRC Press, 1990.

SVAJGER, U.; OBERMAJER, N.; JERAS, M. E. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 525-535, 2010.

TAGLIABUE, A.; RAPPUOLI, R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. **Hum Vaccin**, v. 4, n. 5, p. 347-9, 2008.

TAKAHASHI, I.NOCHI, T.YUKI, Y. *et al.* New horizon of mucosal immunity and vaccines. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 352-8, 2009.

TAKAOKA, M. J. **J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ** 3, v. 1, p. 1-16, 1940.

TEZUKA, H.ABE, Y.IWATA, M. *et al.* Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. **Nature**, v. 448, n. 7156, p. 929-33, 2007.

TSAI, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 3, p. 673-80, 1999.

VAN DER VEEN, R. C.DIETLIN, T. A.PEN, L. *et al.* Nitric oxide inhibits the proliferation of T-helper 1 and 2 lymphocytes without reduction in cytokine secretion. **Cell Immunol**, v. 193, n. 2, p. 194-201, 1999.

WADSWORTH, T. L.; KOOP, D. R. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 941-949, 1999.

WALLE, T.HSIEH, F.DELEGGE, M. H. *et al.* High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 12, p. 1377-82, 2004.

WALLERATH, T.LI, H.GODETEL-AMBRUST, U. *et al.* A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. **Nitric Oxide**, v. 12, n. 2, p. 97-104, 2005.

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 269, n. 7, p. 4705-8, 1994.

YOSHINO, N.FUJIHASHI, K.HAGIWARA, Y. *et al.* Co-administration of cholera toxin and apple polyphenol extract as a novel and safe mucosal adjuvant strategy. **Vaccine**, v. 27, n. 35, p. 4808-17, 2009.

ZHANG, J.LEE, S. M.SHANNON, S. *et al.* The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. **J Clin Invest**, v. 119, n. 10, p. 3048-58, 2009.

ZUNINO, S. J.; STORMS, D. H. Resveratrol alters proliferative responses and apoptosis in human activated B lymphocytes in vitro. **J Nutr**, v. 139, n. 8, p. 1603-8, 2009.

7. ANEXOS:

7.1. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

7.2. Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal

7.3. Currículo lattes

7.4. Ficha do Aluno