

GABRIEL DOMINGOS CARVALHO

**ESTUDO “*in vitro*” DA APOPTOSE INDUZIDA EM
LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM
O PEPTÍDEO SINTÉTICO ANTI-CARRAPATO *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (SBm7462) POR VIA ORAL E NASAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, para
obtenção do título de *Magister*
Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331e
2008

Carvalho, Gabriel Domingos, 1982-

Estudo “*in vitro*” da apoptose induzida em linfócitos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético anti-carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SBm7462) por via oral e nasal / Gabriel Domingos Carvalho. – Viçosa, MG, 2008.

xiii, 122f.: il. ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilória.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 92-122.

1. Imunologia veterinária. 2. Linfócitos - Apoptose.
3. Peptídeos sintéticos. 4. Camundongo como animal de laboratório. 5. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.0896079

GABRIEL DOMINGOS CARVALHO

ESTUDO “*in vitro*” DA APOPTOSE INDUZIDA EM LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS COM O PEPTÍDEO SINTÉTICO ANTI-CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SBm7462) POR VIA ORAL E NASAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2008.

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
Co-Orientador

Prof. Laércio dos Anjos Benjamim
Co-Orientador

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida

Prof^a. Marlene Isabel Vargas Vilória
Orientadora

*"No semblante do animal que não fala
existe todo um discurso que somente um
espírito sábio pode entendê-lo."
(Poema Hindu)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar a minha vida e por abençoar cada dia da minha existência.

À minha mãe querida, que nunca mediu esforços para me dar oportunidades de construir a minha trajetória de vida, estando sempre ao meu lado, me apoiando para seguir em frente.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Veterinária (DVT/UFV), pela capacitação no curso de mestrado desta instituição. Ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores e ao Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (LBCHV/BIOAGRO/UFV) onde realizei a maior parte do meu projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que disponibilizou recursos para a realização desta pesquisa.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilória pela orientação, e acima de tudo pela sua amizade, alegria, confiança e grande carinho maternal. Ao professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo pelos ensinamentos, amizade e lições de vida, que muito contribuíram no meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

Aos meus mestres e amigos, os professores do CCA-UFES-Alegre-ES, que contribuíram com a minha formação acadêmica e sempre me deram força e apoio para seguir em frente na pós-graduação.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, que permitiu a utilização do Laboratório de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, assim como a Cida, o José Geraldo e os estagiários do Laboratório de Biofármacos.

Ao professor Luís Carlos Crocco Afonso da UFOP, e a sua orientada Roberta, pelo gentil empréstimo da citocentrífuga.

Aos professores da pós-graduação da UFV, com os quais além de cursar disciplinas criei novas amizades, especialmente os professores Rita Márcia Andrade Vaz de Mello (DPE) e Laércio dos Anjos Benjamim (DVT).

À Rosi, secretária da Pós-Graduação do DVT, pela sua dedicação incondicional, estando sempre com um sorriso no rosto disposta a ajudar.

Aos meus camundongos, que por meio da sua existência, colaboraram de forma essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

A toda minha família que sempre me apoiou e me teve presente junto de suas orações. À Thalia, pelos 11 anos de companhia, e por me proporcionar muitos momentos de alegria. À Flávia, pelo seu amor e compreensão ao longo de todos esses anos juntos.

A todos os amigos que Viçosa me proporcionou: Viviane, Josiane, Elen, Hélia, Myrian, Guilherme, Nathália, Andréia, Crislene, Cíntia, Fabiana, Giulia, Angélica e Marisabel. Aos amigos que cursaram disciplinas comigo: Analívia, Kris, Aline, Isabel, Claudenir, Vitor, Vinícius, Humberto, Mastoby, Natalia, Juliana, Fábio, André, Bebete, Andressa, Ketty e Grazielle. Aos amigos da academia: Nathália, Priscila, Maristela, Cecília, Pedritta e Tião. Ao Marcelo Curitiba, pelos anos de amizade e pela força na estatística. Aos meus eternos amigos do CCA-UFES, que mesmo de longe estão sempre ao meu lado.

Aos amigos do LBCHV: Sidimar, Carlos Henryque, Flávia, Javier, Larissa, Karlos, Marina, Bianca, Pablo, Paulo Ricardo, Yasmine e Márcio Mendes, por tornarem os momentos de trabalho mais agradáveis.

Aos amigos de todas as horas: Fabrício, Anna Paula (e família), Peconick, Breno, Bruna, Carla, Sandra, Hugo, Julianas (Paniago e Juzinha) e João Paulo. A todos os amigos que me ajudaram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho e que estarão sempre presentes na minha vida.

Meu muito obrigado a TODOS!

BIOGRAFIA

GABRIEL DOMINGOS CARVALHO, filho de Maria da Penha Carvalho e Florindo Domingos Polonini, nascido em 02 de julho de 1982, é natural da cidade de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil.

Graduado em Medicina Veterinária no ano de 2005, pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) na qual iniciou a graduação no ano de 2000, cursando-a no Centro de Ciências Agrárias da UFES (CCA-UFES), na cidade de Alegre-ES.

Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica do PIBIC/UFES, bolsista CNPq de Iniciação Tecnológica Industrial, monitor de diversas disciplinas, professor voluntário e membro de conselhos pertencentes a essa instituição.

No ano de 2005 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV), integrando-se ao Grupo de Pesquisa “Biologia e Controle de Hematozoários dos Animais Domésticos e seus Vetores”.

SUMÁRIO

Lista de Siglas e Abreviações.....	viii
Lista de Quadros.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	Xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Importância do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	04
2.2. Vacinas contra <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	06
2.3. Sistema imune de mucosas.....	08
2.3.1. Tecido linfóide associado à mucosa.....	09
2.3.1.1. Características do MALT.....	11
2.3.1.2. Tecido linfóide associado à conjuntiva.....	13
2.3.1.3. Tecido linfóide associado às narinas/nasofaringe.....	14
2.3.1.4. Tecidos linfóides do anel de Waldeyer.....	15
2.3.1.5. Tecido linfóide associado à laringe e traquéia.....	16
2.3.1.6. Tecido linfóide associado aos brônquios.....	17
2.3.1.7. Tecido linfóide associado à mucosa gástrica.....	18
2.3.1.8. Tecido linfóide associado ao intestino.....	19
2.3.2. Vacinação via mucosa.....	22
2.4. Apoptose.....	25
2.4.1. Mecanismos da apoptose.....	29
2.4.2. Vias de ativação da apoptose.....	31
2.5. Morte celular induzida por ativação (AICD).....	34
2.5.1. Agentes indutores e inibidores da AICD.....	38
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Antígeno SBm7462.....	43
4.2. Animais.....	43
4.3. Imunização dos animais.....	44

4.4. Eutanásia dos animais.....	44
4.5. Coleta de sangue dos animais para a obtenção de soro.....	45
4.6. Pesquisa de anticorpos no soro por meio de ELISA indireto.....	45
4.7. Isolamento de células esplênicas.....	47
4.8. Separação de linfócitos T.....	47
4.9. Obtenção de células apresentadoras de antígeno do baço.....	48
4.10. Obtenção de linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos.....	49
4.11. Obtenção de macrófagos peritoneais.....	50
4.12. Avaliação da AICD.....	50
4.13. Viabilidade celular pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán... ..	51
4.14. Preparações em citocentrífuga.....	52
4.15. Detecção de apoptose pela coloração com Laranja de Acridina	52
4.16. Detecção de apoptose pela técnica de TUNEL.....	53
4.17. Análise estatística.....	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. Resultados do teste de ELISA.....	55
5.2. Estabelecimento da linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos.....	56
5.3. Comprovação da natureza específica dos linfócitos T para o peptídeo sintético SBm7462.....	56
5.4. Efeito de drogas indutoras da AICD.....	58
5.4.1. Mitramicina.....	58
5.4.2. Cicloheximide.....	64
5.5. Efeito de drogas inibidoras da AICD.....	70
5.5.1. Benzamida ribósido.....	70
5.5.2. Ciclosporina A.....	75
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÕES.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AICD	Morte celular induzida por ativação (<i>Activation-Induced Cell Death</i>)
APAF-1	" <i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i> "
APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>Antigen-Presenting Cell</i>)
ACK	Tampão Acetato Tris-Amônia (" <i>Ammonium-Chloride Lysing Buffer</i> ")
BALT	Tecido linfóide associado aos brônquios (<i>Bronchus-Associated Lymphoid Tissue</i>)
BH	Domínio Homólogo Bcl-2
BIOAGRO	Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária
CALT	Tecido linfóide associado à conjuntiva (<i>Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue</i>)
CHX	Cicloheximide (<i>Cycloheximide</i>)
CLU	Unidades criptolinfáticas (<i>Cryptolymphatic Units</i>)
CsA	Ciclosporina A (<i>Cyclosporin A</i>)
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
DALT	Tecido linfóide associado ducto lacrimal (<i>Duct-Associated Lymphoid Tissue</i>)
DD	Domínio de morte (<i>Death Domain</i>)
DED	Domínio efetor de morte (<i>Death Effector Domain</i>)
DISC	Complexo de sinalização de morte induzida (<i>Death Inducing Signaling Complex</i>)
DMEM	Meio de cultivo celular <i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
DRB	Benzamida Ribósido (<i>5,6-Dichlorobenzimidazole Riboside</i>)
DVT	Departamento de Veterinária
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FasL	Ligante do Fas (<i>Fas Ligand</i>)
FADD	Domínios morte associados ao Fas (<i>Fas-Associated Death Domain</i>)
FDC	Célula dendrítica folicular (<i>Follicular Dendritic Cells</i>)
FIDIC	Fundação Instituto de Imunologia da Colômbia
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino (<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>)
HEV	Vênulas endoteliais altas (<i>High Endothelial Venules</i>)
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose (<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>)
ILF	Folículos linfóides isolados (" <i>Isolated Lymphoid Nodules</i> ")
IFN- γ	Interferon gama
IPP	Placas de Peyer do Íleo
JPP	Placas de Peyer do Jejunó
LADLT	Tecido linfóide associado ao canal lacrimal (<i>Lacrimal Drainage-Associated Lymphoid Tissue</i>)
LBCHV	Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores
LGC	Complexos linfoglandulares (<i>Lymphoglandular Complexes</i>)
LE	Linfoepitélio (<i>Lymphoepithelium</i>)
LTALT	Tecido linfóide associado à laringe e traquéia (<i>Larynx and Trachea-Associated Lymphoid Tissue</i>)

MALT	Tecido linfóide associado à mucosa (<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>)
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MITRA	Mitramicina (<i>Mithramycin A</i>)
MOM	Membrana mitocondrial externa (<i>Mitochondrial Outer Membrane</i>)
NK	Células “ <i>Natural Killers</i> ”
NALT	Tecido linfóide associado às narinas/nasofaringe (<i>Nose/Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue</i>)
NGF	Fator de crescimento neural (<i>Nerve Growth Factor</i>)
NGFR	Receptor para NGF (<i>NGF-receptor</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCD	Morte celular programada (<i>Programmed Cell Death</i>)
PLAD	Domínios pré-ligantes montados (<i>Pre-Ligand-Binding Assembly Domains</i>)
PPG	Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFV
RPM	Rotações por minuto
RPML-1640	Meio de cultivo celular RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
rTdT	“ <i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Recombinant</i> ”
SALT	Tecido linfóide associado às glândulas salivares (<i>Salivary Gland Associated Lymphoid Tissue</i>)
SBm7462	<i>Synthetic Boophilus microplus 7462</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TCR	Receptor de células T
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TNFR	Receptor de TNF (<i>TNF-receptor</i>)
TRAIL-R	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
TUNEL	“ <i>TdT-Mediated dUTP Nick-End Labeling</i> ”
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UI	Unidades Internacionais
θ	Macrófagos

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Tratamentos com as drogas indutoras e inibidoras da AICD, para os grupos I e II, separadamente.	51
Quadro 2. Número animais positivos para o ELISA indireto, para os grupo I e II, seguindo-se as dadas de coleta.	56
Quadro 3. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com Mitramicina, pela técnica do Azul de Tripan.	59
Quadro 4. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos, no tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Mitramicina, pela técnica do Azul de Tripan.	61
Quadro 5. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com Mitramicina, pela técnica do Laranja de Acridina.	62
Quadro 6. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com Mitramicina, pela técnica de TUNEL.	64
Quadro 7. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com Cicloheximide, pela técnica do Azul de Tripan.	65
Quadro 8. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos do tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Cicloheximide, pela técnica do Azul de Tripan.	67
Quadro 9. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com Cicloheximide, pela técnica do Laranja de Acridina.	68
Quadro 10. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com Cicloheximide, pela técnica de TUNEL.	69
Quadro 11. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica do Azul de Tripan.	71

Quadro 12. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos do tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica do Azul de Tripán.	72
Quadro 13. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica do Laranja de Acridina.	73
Quadro 14. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica de TUNEL.	74
Quadro 15. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com Ciclosporina A, pela técnica do Azul de Tripán.	76
Quadro 16. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos do tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Ciclosporina A, pela técnica do Azul de Tripán.	77
Quadro 17. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com Ciclosporina A, pela técnica do Laranja de Acridina.	78
Quadro 18. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com Ciclosporina A, pela técnica de TUNEL.	80

RESUMO

CARVALHO, Gabriel Domingos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2008. **Estudo “*in vitro*” da apoptose induzida em linfócitos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético anti-carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SBm7462) por via oral e nasal.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilória. Co-Orientadores: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Laércio dos Anjos Benjamim.

Com o objetivo avaliar a resposta imune de camundongos BALB/c imunizados por via oral e nasal com o peptídeo sintético anti-carrapato *R. (B.) microplus* SBm7462 e estudar a indução da AICD dos linfócitos T de memória dos animais imunizados, utilizou-se 80 camundongos BALB/c, divididos em quatro grupos experimentais com 20 animais cada (grupo I: imunização por via oral; grupo II: imunização por via nasal; grupo III: animais não imunizados; e um grupo de animais doadores de macrófagos peritoneais). Foram feitas duas imunizações, com intervalo de 21 dias. Aos nove e 15 dias após a primeira e segunda imunização realizou-se as coletas, separadamente para cada grupo, e os linfócitos T isolados foram cultivados em estufa, 5% de CO₂ a 37°C, por 10 dias na presença de 1µg de SBm7462 e APCs. Posteriormente, adicionou-se os diferentes agentes indutores (mitramicina e CHX) ou inibidores (DBR e CsA) de apoptose, subdivididos em tratamentos distintos. Após o período de incubação específico para cada um dos tratamentos, determinou-se a porcentagem de viabilidade celular pela exclusão pelo Azul de Tripán e a porcentagem de células apoptóticas pela coloração com Laranja de Acridina e pela técnica de TUNEL. A natureza específica dos linfócitos T foi confirmada pelo aumento no número de células após re-estimulação “*in vitro*” com SBm7462, os quais se comportaram como linfócitos T de memória. Ocorreu indução da AICD por inibição da expressão do *c-myc* e por aumento da expressão de Fas e a AICD induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 foi mediada por uma via independente da calcineurina e da cinética de regulação do FasL. As vias de mucosa, oral e nasal, podem ser consideradas vias alternativas para a imunização com o peptídeo sintético SBm7462, porém requerem um maior número de doses para induzir uma resposta com altos níveis de imunoglobulinas.

ABSTRACT

CARVALHO, Gabriel Domingos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2008. **“*In vitro*” study of apoptosis induced in lymphocytes of BALB/c mice immunized with synthetic peptide anti-tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SBm7462) via oral and nasal.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilória. Co-Advisers: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo and Laércio dos Anjos Benjamim.

To evaluate the immune response of BALB/c mice immunized with the synthetic peptide anti-tick *R. (B.) microplus* SBm7462 by oral and nasal routes and to study the induction of AICD in memory T cells were used 80 BALB/c mice, divided in four experimental groups with 20 animals each (group I: oral immunization; group II: nasal immunization; group III: animals not immunized; and a group with animals givers of peritoneal macrophages. Two immunizations had been made with an interval of 21 days. At nine and 15 days after the first and the second immunization the collects were realized, separately for each group, and the T cells isolated had been cultivated with 5% CO₂ at 37°C, per 10 days in the presence of 1µg of SBm7462 and APCs. Later, the different agents, inductive (mithramycin and cycloheximide) or inhibiting (benzamide riboside and cyclosporin A) of apoptosis had been added, subdivided in distinct treatments. After the specific incubation period for each one of the treatments, it had been determined the percentage of cellular viability by the exclusion for Tripan Blue and the percentage of apoptotic cells with the dye Acridine Orange and by TUNEL technique. The specific nature of the T cells was confirmed by the increase in the number of cells after re-stimulation *in vitro* with SBm7462, which had held as memory T cells. The induction of AICD occurred by the inhibition of the expression of *c-myc* and by the increase of the expression of Fas and the induced AICD for the synthetic peptide SBm7462 was mediated by an independent way of the calcineurina and the kinetic of regulation of FasL. The mucosa routes, oral and nasal, can be considered alternative ways for the immunization with the synthetic peptide SBm7462 however they require a bigger number of doses to induce a response with high levels of immunoglobulins.

1. INTRODUÇÃO

O processo de vacinação é o método que apresenta a melhor relação custo-benefício para prevenir perdas econômicas e aumentar a qualidade de vida dos animais domésticos (AUCOUTURIER *et al.*, 2001). No âmbito da Medicina Veterinária, muitos imunógenos ainda são produzidos utilizando-se tecnologia convencional, tais como vacinas atenuadas. Porém, com o desenvolvimento de pesquisas que aplicam ferramentas de biotecnologia, as mesmas estão sendo usadas no desenvolvimento de vacinas. Essas vacinas “modernas” não são utilizadas apenas para o controle de doenças infecciosas, mas também para aumentar a produtividade do rebanho e o controle de ectoparasitos (BABIUK, 2002).

A demanda por vacinas parasitárias em saúde animal é crescente, e empresas remetem lucros acima de três bilhões de dólares somente nesse setor (DALTON & MULCAHY, 2001). O avanço das técnicas de biologia molecular providencia ferramentas para compreender muitas questões biológicas, sendo esses métodos aplicados em várias linhas de pesquisa na área de parasitologia veterinária (SANGSTER *et al.*, 2001). O sucesso na prevenção e controle de doenças parasitárias advém do

melhor conhecimento das interações hospedeiro-parasita e também de estudos nas áreas da genômica, proteômica e bioinformática, além dos avanços nas áreas da engenharia genética (PRICHARD & TAIT, 2001).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) representa o principal ectoparasito de bovinos nas regiões tropicais e subtropicais, e o seu controle repousa principalmente na utilização de fármacos carrapaticidas, os quais propiciam a seleção de populações resistentes (SANGSTER, 2001; TAYLOR, 2001). A dependência exclusiva de compostos químicos para o controle desse parasita tem-se tornado uma das principais preocupações técnico-científicas e econômicas da atualidade. Com isso, precebe-se a necessidade de se desenvolver vacinas capazes de induzir a imunidade do hospedeiro contra o parasita.

O Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV) vem desenvolvendo pesquisas visando o constante aprimoramento da vacina sintética anti-carrapato *R. (B.) microplus* (SBm7462), de comprovada eficiência, a qual já foi patenteada no Brasil, USA, México, Austrália e União Européia. Os imunógenos sintéticos são desenhados para estimular uma resposta imune apropriada, incluindo epítomos de células B e T relevantes e excluindo aquelas regiões da proteína que poderiam atuar estimulando a atividade de mecanismos supressores, alérgicos e/ou autoimunes. PATARROYO *et al.* (2002) demonstraram a eficácia de vacinas sintéticas na indução de uma forte atividade estimuladora das células linfóides por meio dos peptídeos sintéticos.

A memória imunológica é carregada por linfócitos T e B, e durante o contato primário com o antígeno, a maioria dessas células são selecionadas para morrerem por apoptose e apenas poucas são selecionadas para gerar células de memória, com uma alta afinidade pelo antígeno (SPRENT, 1997). Essas células são marcadas por moléculas de adesão (marcadores de superfícies celulares) que interagem com fatores inibidores das funções pró-apoptóticas (CORY, 1995). O uso de modelos

animais apropriados para imunizações tem mostrado claramente que há um delicado equilíbrio nas subpopulações de células T ativadas, o que influencia o resultado da vacinação, além de outros fatores como perfil de citocinas produzidas e morte celular por ativação (AICD).

A AICD de linfócitos T hígidos quando induzida por peptídeos sintéticos tem sido pouco estudada, razão pela qual ainda há muitas questões sobre a expressão e regulação dos mecanismos apoptóticos em estudos com esses tipos celulares. Assim, o uso de agentes indutores ou inibidores de apoptose, na presença do peptídeo sintético SBm7462, resultará em proliferação ou maior vulnerabilidade à morte celular como resposta a esses estímulos (SANCHEZ, 2004).

Atualmente, uma das principais metas no desenvolvimento de vacinas é a indução de uma forte resposta imune protetora contra antígenos inoculados por via das superfícies mucosas (KREMER *et al.*, 1998). A vacinação via mucosa consiste na administração de antígenos nestas superfícies, para induzir não só uma resposta imune local como também uma resposta imune sistêmica (AIZPURUA & RUSSELL-JONES, 1988). A imunização via mucosas é um método não invasivo que induz tanto uma resposta imune sistêmica como local (AIZPURUA & RUSSELL-JONES, 1988; BERGQUIST *et al.*, 1997; KOGA *et al.*, 2000), podendo ser uma via uma alternativa viável para administração de vacinas sintéticas.

Este trabalho teve como objetivo foi avaliar a resposta imune a vacina sintética anti-carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SBm7462, administrada pelas vias de mucosa, oral e nasal, e estudar a indução da AICD dos linfócitos T de memória dos animais imunizados, utilizando-se agentes indutores (mitramicina e cicloheximide) e inibidores (benzamida ribósido e ciclosporina A) de apoptose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Dentre as 869 espécies de carrapatos conhecidas no mundo, o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) representa o principal ectoparasito de bovinos nas regiões tropicais e subtropicais. Estudos recentes utilizando metodologias taxonômicas moleculares, demonstraram a proximidade filogenética do gênero *Boophilus* com o *Rhipicephalus*, propondo-se então uma nova classificação para a espécie, que mudaria de *Boophilus microplus* para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL *et al.*, 2000; MURREL *et al.*, 2001; BEATI & KEIRANS, 2001).

Ao longo dos séculos, o *R. (B.) microplus* se difundiu pelas regiões neotropicais juntamente com as migrações de pessoas e suas criações de animais. Importantes divergências genéticas e adaptativas da espécie, distribuídas entre os diferentes continentes, envolvem “plasticidade ecológica” das populações de carrapatos, onde as mudanças globais afetam os parasitas e a forma de manejo e controle dos mesmos (SUTHERST, 2001; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006). Na América Latina, o

R. (B.) microplus encontra-se amplamente distribuído pelo Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Uruguai, leste da Bolívia, Colômbia e Venezuela. No Brasil, destacam-se as regiões Centro-Oeste e Sudeste, locais com intensa atividade pecuária e que, além do hospedeiro, possuem condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento do parasita (ESTRADA-PEÑA, 1999; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2006).

O carrapato *R. (B.) microplus* acarreta severos prejuízos, diretos e indiretos, na produção animal. Os primeiros estão relacionados com a perda de peso, baixa conversão alimentar, perdas na qualidade do couro, toxinas liberadas no hospedeiro, lesões de pele, entre outros. JONSSON (2006) calculou que cada fêmea ingurgitada de *R. (B.) microplus* é responsável por uma redução de aproximadamente 1,37g de peso dos bovinos, além de causar anemia, supressão do apetite e alteração no metabolismo dos animais infestados. As perdas indiretas estão relacionadas com a transmissão de hematozoários, como as espécies dos gêneros *Babesia* e *Anaplasma* (PATARROYO, 1994; SANTOS *et al.*, 1998; RUIZ *et al.*, 2005; OLIVEIRA-SIQUEIRA *et al.*, 2005). Estudos demonstram que os carrapatos provocam efeitos imunossupressores no hospedeiro, o que pode facilitar a transmissão ou a gravidade nos casos de babesioses e anaplasmoses (KASHINO *et al.*, 2005; JONSSON, 2006).

Os prejuízos causados pela infestação de carrapatos e as doenças transmitidas por eles, segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), ultrapassam sete bilhões de dólares anuais no mundo. Somente no Brasil, estudos realizados por GRISI *et al.* (2002) apontaram prejuízos superiores a dois bilhões de dólares anuais.

O controle de carrapatos repousa principalmente na utilização de drogas carrapaticidas que são responsáveis pela seleção de populações resistentes (SANGSTER, 2001; TAYLOR, 2001). Outro problema com o uso de acaricidas é a contaminação com resíduos na carne, leite e derivados e no meio-ambiente. Tudo isso aponta para a necessidade de

pesquisas de métodos alternativos, seguros e eficientes de controle, os quais possam atuar de modo integrado (WILLADSEN, 2006).

2.2. Vacinas contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O processo de vacinação representa uma medida preventiva que oferece vantagens sobre os métodos convencionais de controle químico. Este processo representa uma ação sustentável, livre de resíduos, mais específica e com menores problemas de resistência quando comparado aos fármacos utilizados comumente, além da segurança oferecida (WILLADSEN (2004).

Pesquisas e avanços científicos na área de imunologia favorecem cada vez mais a compreensão sobre a biologia de parasitas. O uso de modernas ferramentas como a biologia molecular e a produção em alta escala permitem que as vacinas parasitárias sejam uma realidade. A vacinação contra carrapatos apresenta maior sucesso do que contra qualquer outro ectoparasita, provavelmente porque eles se alimentam de forma mais lenta do que outros insetos, ficando mais tempo em contato com o sistema imune do hospedeiro, ou talvez pela forma de digestão que eles utilizam (DALTON & MULCAHY, 2001).

Há mais de 70 anos utiliza-se uma variedade de materiais antigênicos como forma de vacinação contra carrapato, incluindo macerados de todo o carrapato, extratos das glândulas salivares, material intestinal, cutículas, entre outros (WILLADSEN, 2004). Porém, os melhores resultados no processo de vacinação contra carrapatos ocorrem normalmente quando se usa antígenos que não estão expostos durante o processo de alimentação do parasita, sendo esses denominados antígenos ocultos ou *concealed antigens* (OLIVEIRA, 1998).

WILLADSEN *et al.* (1989) isolaram uma glicoproteína de 89.000Da de peso molecular e ponto isoelétrico entre 5.1 e 5.6, localizada na

membrana intestinal de uma amostra de *R. (B.) microplus* australiana (*Yeerongpilly*) e denominaram essa proteína de Bm86. Vacinas contendo a Bm86 atuam através de anticorpos anti-Bm86, com o possível envolvimento do complemento e outros mecanismos efetores (DE LA FUENTE *et al.*, 1998; GARCÍA-GARCÍA *et al.*, 1998). O efeito da vacinação é a lise das células intestinais, resultando na redução do número de carrapatos que conseguem completar o seu ciclo de vida, além da menor fertilidade dos carrapatos sobreviventes (RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

A vacina sintética contra o *R. (B.) microplus* denominada de SBm7462 foi desenvolvida a partir de estudos por predição computacional, definindo-se as seqüências que continham determinantes imunogênicos. O imunógeno possui seqüências que foram desenhadas no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV) e sintetizadas no Instituto de Inmunologia del Hospital San Juan de Dios, em Bogotá, Colômbia (PATARROYO *et al.*, 2002).

Os imunógenos sintéticos são desenhados para estimular uma resposta imune apropriada, incluindo-se epítomos B e T relevantes, e excluindo-se aquelas regiões da proteína que poderiam atuar estimulando a atividade de mecanismos supressores, alérgicos e/ou autoimunes. A eficácia da vacina sintética SBm7462 já foi demonstrada pela indução de uma forte atividade estimuladora das células linfóides por meio de peptídeos sintéticos (PATARROYO *et al.*, 1994). O uso de peptídeos sintéticos como imunógenos tem tido bons resultados, indicando o sucesso no desenvolvimento de vacinas sintéticas (MILICH, 1989).

Recentemente, estudos de variabilidade genética em *R. (B.) microplus* de distintos locais e condições geográficas diferentes, de regiões brasileiras e de outros países sul-americanos, demonstraram que a seqüência da vacina sintética SBm7462 manteve-se conservada em todas as populações (SOSSAI *et al.*, 2005; PECONICK, 2008),

concluindo-se que não há variabilidade nessas seqüências, que pudessem interferir na eficiência vacinal, podendo-se considerá-lo um imunógeno universal (PECONICK, 2008).

2.3. Sistema imune de mucosas

No início do século XX, Besredka iniciou as primeiras investigações sobre o papel imunológico e protetor das mucosas no organismo humano (ZAMBRANO *et al.*, 1996). Em 1922, foi detectada a presença de anticorpos nas fezes de pacientes humanos infectados com *Bacillus dysenteriae* antes de seu aparecimento no soro (DAVIES, 1922), sendo esta uma das primeiras pistas para a identificação do papel protetor das secreções orgânicas das mucosas (MIYAKE *et al.*, 2003). Na década de 60, observou-se a transudação de proteínas plasmáticas para o lúmen do trato gastrintestinal, identificando-se diversos tipos de gamaglobulinas presentes na saliva e em outros fluidos biológicos das secreções mucosas (TOMASI, 1962). Em 1980, além da demonstração da presença da IgA secretória em diversos sítios, também foi descrito o tecido linfóide presente nos brônquios e a migração de células linfóides para outros sítios no organismo (BIENENSTOCK & BEFUS, 1980).

A importância do sistema imune de mucosa tem sido estabelecida devido ao seu reconhecimento como primeira linha de defesa pela qual o hospedeiro entra em contato com numerosos patógenos após a ingestão ou inalação destes (MCGHEE & KIYONO, 1993; MCGHEE & KIYONO, 1998; BAUCHEREAU & STEINMAN, 1998). O sistema imune de mucosas está situado em uma variedade de locais anatômicos nos quais o ambiente externo entra em contato com o hospedeiro e tem um papel complexo para a proteção deste, envolvendo uma rede de mecanismos imunológicos e não-imunológicos (ACHESON & LUCCIOLI, 2004).

O sistema imune de mucosas dos mamíferos consiste de uma rede integrada de células linfóides que atuam juntamente com os fatores da imunidade inata do hospedeiro para promover a defesa do organismo (CZERKINSKY *et al.*, 1999). As superfícies mucosas apresentam um grande número de APCs, especialmente células dendríticas, que são responsáveis pela captação de antígenos e estimulação das células T (LIU & MACPHERSON, 1991; LIU & MACPHERSON, 1993; BAUCHEREAU & STEINMAN, 1998). A presença e a alta frequência de células T $\gamma\delta$ no epitélio intestinal é uma característica importantíssima para o sistema imune de mucosa (GOODMAN & LEFRANÇOIS, 1988; BONNEVILLE *et al.*, 1988). Estudos preliminares mostraram que as células T $\gamma\delta$ são essenciais para a manutenção das funções biológicas das células epiteliais intestinais (KOMANO *et al.*, 1995). Essas células T $\gamma\delta$ desempenham um papel importante na indução e regulação da resposta de IgA na mucosa (FUJIHASHI *et al.*, 1996). As células B e T apresentam um papel ímpar nas superfícies mucosas, por induzirem uma resposta antígeno-anticorpo afim e uma resposta T CD4⁺ nos níveis celular, molecular e de proteína (KOGA *et al.*, 2000).

2.3.1. Tecido linfóide associado à mucosa

O tecido linfóide associado à mucosa (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue* - MALT) é definido como um tecido linfóide organizado nas mucosas e que atua apresentando antígenos. As características morfológicas que distinguem o MALT dos outros infiltrados linfóides ainda são discutidas. O MALT tem sido amplamente investigado em animais de laboratório, principalmente nos casos de reações alérgicas. Porém, o seu conhecimento em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos ainda é pequeno. O entendimento das características específicas do MALT em outras espécies animais além dos animais de laboratório, é importante

para a pesquisa comparada, de forma a entender os processos patológicos e imunológicos nas diferentes espécies, sendo essa uma rota potencial para a vacinação via superfícies de mucosa (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006).

Estudos envolvendo tecidos humanos são limitados a biopsias ou ressecção de material. Entretanto, dados obtidos em animais de laboratório têm sido extrapolados para humanos, apesar dos camundongos, ratos e coelhos diferirem tanto dos humanos como de outras espécies, como os animais de produção, no que diz respeito ao seu desenvolvimento, tempo de vida, ambiente (*germ free*), nutrição e fisiologia. A distribuição, ocorrência, morfologia, ontogenia e evolução do MALT variam entre as espécies. As diferenças entre as espécies podem ser determinadas por características anatômicas e fisiológicas distintas, uma vez que as estruturas do MALT estão sempre localizadas estrategicamente em posições sentinelas, visando a melhor captação de antígenos (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006).

O conhecimento sobre o MALT em animais de produção é importante pelas seguintes razões: reconhecimento de estruturas normais para o seu entendimento fisiológico (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006); localização do MALT para sua implicação em testes diagnósticos (THURING *et al.*, 2005); distinção do MALT normal de casos de hiperreatividade ou atividade alterada (ANDERSON *et al.*, 1986; LIEBLER *et al.*, 1995; GREEN *et al.*, 1997); entendimento da patogênese e das interações hospedeiro/parasita (SCHUH *et al.*, 1992; RODRIGUEZ *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2001; SARRADELL *et al.*, 2003); determinação da indução de sítios para a aplicação de vacinas (SCHUH & OLIPHANT, 1992; ASTI *et al.*, 2000; KUMAR & TIMONEY, 2001) e investigação as estruturas do MALT e suas funções sob os aspectos comparativos (GRIEBEL & HEIN, 1996).

O MALT é o sítio inicial de indução da imunidade de mucosa, onde os antígenos são capturados e apresentados a linfócitos T e B, *naive* ou

já estimulados. As estruturas do MALT têm origem no tráfico de linfócitos para os sítios efetores na mucosa. O MALT contém vasos linfáticos que transportam as células do sistema imune e os antígenos para os linfonodos regionais, os quais podem ser chamados de sítios de indução e potencialização da resposta imune de mucosa (BRANDTZAEG & PABST, 2004). A compartimentalização do sistema imune de mucosa tem sido sugerida, uma vez que vacinações pelas rotas oral, nasal e retal induzem uma forte resposta imune, tanto nos sítios próximos ao sítio de indução, como também em sítios mais distantes (HOPKINS *et al.*, 1995; QUIDING-JARBRIN *et al.*, 1995).

As três principais funções do MALT são: proteger as membranas mucosas da colonização e invasão por patógenos; captar antígenos exógenos, e desenvolver resposta imune contra os antígenos (CZERKINSKY *et al.*, 1999).

2.3.1.1. Características do MALT

BRANDTZAEG & PABST (2004) afirmam que somente os tecidos linfóides presentes na mucosa que atendem a certos critérios morfológicos e funcionais devem ser chamados de MALT. As características estruturais do MALT as seguintes:

- a) tecido linfóide localizado em contato íntimo com a superfície mucosa;
- b) presença de tecido linfóide organizado e estruturado: linfonodos e áreas interfoliculares com células T-dependentes; folículos linfóides (primários e com centros germinativos) predominantemente formados por linfócitos B, envolvidos por uma rede de células dendríticas foliculares (FDC), e em menor número linfócitos T CD4⁺ e macrófagos; áreas interfoliculares contendo predominantemente linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺;
- c) o MALT pode ocorrer de forma isolada, como nódulos linfóides isolados (ILF), ou em grandes agregados de muitos nódulos linfóides;

- d) o epitélio que reveste o MALT é formado na maior parte por infiltrado de linfócitos, denominado linfoepitélio (LE). O LE pode conter células morfológicamente distintas, especializadas na captação de antígenos. Essas células são chamadas de células M. “M” é a abreviação de célula “membranosa” (*“membranous” cell*), pois o citoplasma apical dessas células é recoberto por uma fina membrana com a superfície disposta em microvilosidades;
- e) a captação de antígenos ocorre através do LE, por meio das células M ou pelas células dendríticas. REY *et al.* (2004) enfatizam que as células M, por meio de seu transporte seletivo, são tidas como sítio primário pelo qual o antígeno é apresentado subsequentemente ao sistema imune. BANCHEREAU & STEINMAN (1998) referem-se às células dendríticas que estão distribuídas ao longo das mucosas como capazes de capturar e processar antígenos, carreando-os para os nódulos linfáticos proximais;
- f) alguns componentes do MALT estão presentes constitutivamente em sítios definidos na mucosa (como as tonsilas), outros estão presentes constitutivamente em locais variados (como as placas de Peyer no jejuno), enquanto que outros são induzidos pela exposição aos antígenos (como o BALT e o ILF);
- g) a recirculação de linfócitos entre o MALT ocorre através das vênulas endoteliais altas (*high endothelial venules* - HEV) nas áreas interfoliculares. Receptores distintos no HEV regulam a migração tecido-específico de linfócitos.

Essas características morfológicas ajudam a distinguir as estruturas do MALT de focos de infiltrados linfocitários na mucosa, os quais não têm uma organização compartimentalizada e constituem-se predominantemente de linfócitos T, além de não apresentarem contato direto com o epitélio e com os antígenos da luz intestinal. Infiltrados focais podem ser induzidos por infecções, sendo necessário uma análise cuidadosa pra distinguir entre ILF e infiltrado inflamatório (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006).

De acordo com as localizações anatômicas, as estruturas do MALT podem ser subdivididas em (BRANDTZAEG & PABST, 2004):

- tecido linfóide associado à conjuntiva (*conjunctiva-associated lymphoid tissue* - CALT);
- tecido linfóide associado ao canal lacrimal (*lacrimal drainage-associated lymphoid tissue* - LADLT);
- tecido linfóide associado às glândulas salivares (*salivary gland-associated lymphoid tissue/duct-associated lymphoid tissue* - SALT/DALT);
- tecido linfóide associado às narinas/nasofaringe (*nose or nasopharynx-associated lymphoid tissue* - NALT);
- tecidos linfóides do anel de Waldeyer;
- tecido linfóide associado à laringe e traquéia (*larynx and trachea-associated lymphoid tissue* - LTALT);
- tecido linfóide associado aos brônquios (*bronchus-associated lymphoid tissue* – BALT);
- tecido linfóide associado á mucosa gástrica (*gastric mucosa-associated lymphoid tissue* - Gastric MALT);
- tecido linfóide associado ao intestino (*gut-associated lymphoid tissue* - GALT).

2.3.1.2. Tecido linfóide associado à conjuntiva

O CALT tem sido investigado em estudos comparativos entre bovinos, ovinos e suínos. Nessas espécies, o CALT é formado por um número variado de ILF que estão predominantemente localizados ao longo da superfície da pálpebra e da conjuntiva. O CALT tem sido descrito também em humanos, mas não em ratos e camundongos. Folículos linfóides primários e secundários são encontrados nos nódulos linfóides do CALT, com grande número de folículos linfóides. Os nódulos linfóides

são recobertos por áreas de LE, mas morfologicamente distintas das células M (CHODOSH *et al.*, 1998).

O CALT pode ser incluído como um sítio para aplicação de vacinas (SANCHIS *et al.*, 1995). Em ovinos, o CALT tem sido utilizado para o diagnóstico de *scrapie*, uma vez que é um local onde o tecido linfóide periférico pode ser facilmente coletado dos animais vivos, sem nenhum comprometimento clínico. Comparando-se amostras de tecidos da terceira pálpebra, tonsilas e linfonodos mandibulares, demonstrou-se que há um alto aproveitamento de folículos linfóides em biópsias de terceira pálpebra (THURING *et al.*, 2005).

2.3.1.3. Tecido linfóide associado às narinas/nasofaringe

O NALT está bem descrito e caracterizado em pequenos animais de laboratório (SMALL *et al.*, 1985; SPIT *et al.*, 1989; WU *et al.*, 1997; KRAAL, 2004). Em animais de produção, nenhum agregado compatível ao NALT foi encontrado; porém, ILF têm sido descritos em eqüinos e ovinos (MAIR *et al.*, 1987; MAIR *et al.*, 1988; STANLEY *et al.*, 2001).

O NALT está presente em agregados linfóides pareados no assoalho da cavidade nasal, próximo à entrada da faringe (KRAAL, 2004). ILF aparentemente estão presentes na mucosa nasal de algumas espécies de animais de produção, mas ainda não foram bem investigados. Uma razão prática para isso pode se dar pelo fato de que a mucosa nasal é difícil de ser dissecada da cavidade nasal e as preparações histológicas envolvidas incluem processos de descalcificação que podem inibir as características imunohistoquímicas das células linfóides ali presentes (MAIR *et al.*, 1988; STANLEY *et al.*, 2001). A quantidade de tecido linfóide na cavidade nasal é menor do que nos tecidos linfóides do anel de Waldeyer (MAIR *et al.*, 1988).

O NALT apresenta folículos linfóides marcados por um infiltrado intraepitelial de linfócitos. As áreas foliculares são organizadas em células B e as áreas intrafoliculares (células T). O NALT de roedores contém uma grande quantidade de células dendríticas. Os folículos linfóides são cobertos por um epitélio ciliado contendo poucas células caliciformes e numerosas células M. As células M do NALT parecem ser idênticas às das placas de Peyer e estão relacionadas a funções imunológicas similares, como captação de antígenos (SMINIA & KRAAL., 1999).

2.3.1.4. Tecidos linfóides do anel de Waldeyer

Ao contrário dos roedores de laboratório, os tecidos linfóides do anel de Waldeyer são bem desenvolvidos em animais de produção e em humanos. Entretanto, o interesse está centrado mais no NALT (KRAAL, 2004). Os tecidos linfóides do anel de Waldeyer encontram-se nas passagens da cavidade nasal e oral para a faringe. Eles são formados por grandes agregados de nódulos linfóides denominados tonsilas, que ocorrem constitutivamente em locais anatômicos distintos na faringe de cada espécie animal, e os ILF podem variar em número. Na região da orofaringe estão presentes as tonsilas lingual, palatina e tonsila do palato mole, e na região da nasofaringe estão presentes as tonsilas faringeal e tubal. As tonsilas são importantes como sítio de indução de imunidade nas mucosas (HORTER *et al.*, 2003) elas são a primeira linha de defesa contra antígenos, tanto respiratórios como intestinais (PABST & BINNS, 1986).

As tonsilas possuem estrutura interna morfológicamente similar às placas de Peyer, com folículos, células M e HEV (PABST & BINNS, 1986). O epitélio das tonsilas contém um número significativo de células dendríticas, células M, células B de memória e células B e T dispersas. Diferentemente das placas de Peyer, as tonsilas exibem uma

diferenciação *in situ* considerável para plasmócitos (BERNSTEIN *et al.*, 1999).

As tonsilas são tecidos altamente importantes para estudos de diagnóstico de doenças infecciosas (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006). As tonsilas faríngea e tubal são as mais importantes para vacinações nasais, devido algumas características como a relativa acessibilidade e a alta permeabilidade delas, além das condições do microambiente, como pH levemente ácido, baixos níveis de atividade enzimática e sem interferência da digestão ruminal (STANLEY *et al.*, 2001).

2.3.1.5. Tecido linfóide associado à laringe e traquéia

O tecido linfóide associado à laringe tem sido descrito na epiglote e no vestíbulo laringeal de bovinos, ovinos, suínos e eqüinos (SCHUMMER & NICKEL, 1978). Unidades criptolinfáticas (CLU) foram encontradas na epiglote de suínos e ovinos nas forma de tonsila paraepiglótica. Acumulados de nódulos linfóides encontrados no processo vocal de bovinos são denominados de tonsila glótica (MAIR *et al.*, 1988).

Na traquéia, nódulos linfóides têm sido descritos somente em eqüinos, e eles ocorrem em eqüinos acima de dois anos de idade. Nódulos linfóides na faringe e laringe de eqüinos apresentam uma organização típica do MALT; porém, infiltrados de tecido linfóide não organizado também podem ocorrer (MAIR *et al.*, 1987).

2.3.1.6. Tecido linfóide associado aos brônquios

O trato respiratório é a segunda maior superfície mucosa dos mamíferos, ficando atrás somente do trato gastrintestinal (PABST &

BINNS, 1989). Ao contrário das tonsilas do anel de Waldeyer e do GALT, o BALT não está presente antes do nascimento em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos (ANDERSON *et al.*, 1986; MAIR *et al.*, 1988; BARMAN *et al.*, 1996). O BALT não está presente constitutivamente em animais de produção e humanos; porém, é muito dinâmico nessas espécies (HILLER *et al.*, 1998; PABST & BINNS, 1994; BIMCZOK & ROTHKÖTTER, 2006). Esta é uma característica tida como típica para espécies com o anel de Waldeyer bem desenvolvido, enquanto que em espécies com pouco tecido linfático no anel de Waldeyer, como ratos, camundongos e coelhos, grandes quantidades de BALT estão presentes constitutivamente (KRAAL, 2004).

A ocorrência e desenvolvimento do BALT em animais de produção é antígeno-dependente e pode aumentar severamente em certos casos infecções do trato respiratório. As estruturas do BALT estão estrategicamente localizadas em locais implicados na captação dos antígenos. BALT é importante em animais de produção, uma vez que infecções do trato respiratório representam um problema comum e de importância econômica nesses animais. É reconhecido que a imunidade respiratória está correlacionada com a resposta imune local, e o tecido linfóide presente nos pulmões contribui para essa resposta. Portanto, o conhecimento sobre o BALT deve auxiliar no desenvolvimento de métodos para estimulação da imunidade respiratória local (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006).

O BALT está mais presente nos lobos pulmonares craniais do que caudais. Embora o termo tecido linfóide associado aos brônquios (*bronchus-associated lymphoid tissue*) seja usado, ele ocorre sem preferência em todos os níveis das vias aéreas. O tecido linfóide está localizado abaixo do epitélio que reveste os bronquíolos. Nos bronquíolos, o BALT está freqüentemente localizado adjacente às arteríolas. Tanto nódulos linfóides organizados com folículos linfóides primários e secundários, quanto agregados linfóides não organizados de linfócitos

podem ser encontrados (ANDERSON *et al.*, 1986; GREGSON *et al.*, 1979). Os linfócitos contidos no BALT são similares aos descritos nas placas de Peyer (PABST & BINNS, 1989). Os linfócitos que chegam ao BALT via HEV após o contato com os antígenos migram para os linfonodos regionais através dos vasos linfáticos aferentes, e depois para a corrente sanguínea (PABST & BINNS, 1995).

Não há dúvidas de que o trato respiratório é um bom local para induzir tanto a resposta imune de mucosa quanto a sistêmica (CHARLOTTA *et al.*, 1997). Diversos estudos já estabeleceram que em animais e humanos, a imunização via nasal propicia uma resposta de anticorpos no trato respiratório superior (TAKAHASHI *et al.*, 1991; ANDERSON *et al.*, 1992; GALLICHAN *et al.*, 1993; BERGQUIST *et al.*, 1995; QUIDING-JARBRINK *et al.*, 1995; GORSE *et al.*, 1996; HASIGUCCI *et al.*, 1996; RUDIN *et al.*, 1998).

2.3.1.7. Tecido linfóide associado à mucosa gástrica

Em animais de produção, o MALT gástrico está presente unicamente em suínos. Nódulos linfóides individuais estão presentes na submucosa e na lâmina própria da curvatura menor do estômago e no divertículo gástrico (GREEN *et al.*, 1997).

O MALT gástrico foi inicialmente discutido como uma evidência nos casos de gastrite experimental em suínos infectados com *Helicobacter pylori* (KRAKOWKA *et al.*, 1991). Estudos consecutivos em suínos saudáveis não infectados revelaram que o MALT gástrico já se desenvolve nos fetos, estando presente ao nascimento, assim como as outras estruturas do MALT (DRIESSEN *et al.*, 2002).

A atividade do MALT gástrico pode ser induzida pela colonização por *H. pylori* (GREEN *et al.*, 1997). Desde que o MALT gástrico foi descrito em humanos, particularmente após a infecção por *H. pylori*, o

estômago de suínos ganhou interesse para estudos e investigações comparativas (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006).

2.3.1.8. Tecido linfóide associado ao intestino

A mucosa intestinal constitui a maior superfície de contato do organismo com o ambiente externo, permitindo o contato com uma imensidão de antígenos patogênicos e não patogênicos (RUSSELL & MESTECKY, 1988; WOLD *et al.*, 1989; MOWAT *et al.*, 1995; ACHESON & LUCCIOLI, 2004). Para lidar com essa intensa exposição aos antígenos, o GALT possui uma variedade de mecanismos efetores. A ativação destes mecanismos resulta em imunoestimulação (levando a proteção ou rejeição aos antígenos patogênicos) ou imunossupressão (resultando em tolerância para alguns antígenos, como os alimentares) (THOMAS & PARROT, 1974; THOMAS, 1980; ACHESON & LUCCIOLI, 2004).

O GALT é a parte do MALT que tem sido mais bem estudada, por ser uma importante via de entrada para muitos antígenos e agentes infecciosos. Numerosos estudos foram conduzidos para descrever sua distribuição e para investigar a captação de partículas solúveis ou agentes infecciosos, apesar das dificuldades em se usar grandes animais nesses experimentos (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006). O LE do GALT pode ser marcado por patógenos específicos ou pode se tornar infectado por eles. Alterações no GALT não causam somente lesões locais, mas também afetam as defesas de toda a barreira gastrintestinal, uma vez que reduz o número de células plasmáticas precursoras (GRIEBEL & HEIN, 1996).

Os nódulos linfáticos conhecidos como placas de Peyer são os locais primários do GALT, e onde a resposta imune é gerada (MACDONALD, 1983; MATTINGLY, 1984). As placas de Peyer do jejuno

(JPP) estão distribuídas irregularmente ao longo da face anti-mesentérica do jejuno e contribuem com aproximadamente um terço das placas de Peyer do GALT do intestino delgado, enquanto que as placas de Peyer do íleo (IPP) contribuem com os outros dois terços. No intestino grosso a maior parte do GALT é formada pelas placas de Peyer do cólon proximal (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006).

O GALT, em diferentes partes do intestino, tem a organização típica das estruturas do MALT, mas há diferenças regionais distintas (LANDSVERK *et al.*, 1991). As JPP têm pequenos folículos linfóides periformes e grandes áreas interfoliculares. As IPP possuem longos folículos linfóides ovais e pequenas áreas interfoliculares. Com o aumento da idade, os folículos linfóides com criptas epiteliais ocorrem particularmente nas IPP (HEBEL, 1960). No intestino grosso, nódulos linfóides são encontrados na lâmina própria ou em complexos linfoglandulares (LGC). Os LGC são caracterizados por um ou mais folículos linfóides na submucosa e uma ou mais criptas epiteliais estendendo-se pela superfície mucosa no tecido linfóide (LIEBLER *et al.*, 1988).

As células M do LE das placas de Peyer desempenham um papel essencial na captação de antígenos do lúmen intestinal e o transporte desses antígenos para apresentá-los aos linfócitos presentes na camada basolateral (KATO & OWEN, 1999). O LE e as células M têm sido identificados em todos os sítios do GALT de bovinos; além dessas, outras células enteroabsorvitivas também estão presentes no LE das JPP e LGC, enquanto que o LE das IPP é composto por uma população uniforme de células M (LANDSVERK, 1981; LANDSVERK *et al.*, 1991; PARSONS *et al.*, 1991; TORRES-MEDINA, 1981). Diferenças no desenvolvimento das microvilosidades das células M do LE do intestino grosso representam diferentes estágios de maturação celular (LIEBLER *et al.*, 1988; LIEBLER *et al.*, 1991). Múltiplas células intraepiteliais invaginam nas células M, pela membrana basolateral, proporcionando a aparência

“membranosa”. Há diferenças regionais na eficiência das células M em internalizar materiais (PAAR *et al.*, 1992), portanto, essas diferenças devem ser consideradas no desenvolvimento de vacinas orais (LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006). Já foi demonstrado que a imunização oral estimula a imunocompetência das células nas placas de Peyer (FUJIHASHI *et al.*, 2001).

De acordo com o conceito de sistema imune de mucosas, imunócitos induzidos no GALT migram não somente para todo o intestino, mas também para outros tecidos de mucosa de outros órgãos (MCDERMOTT & BIENENSTOCK, 1979). Para que os linfócitos sejam drenados para os linfonodos, o trato intestinal é equipado com estruturas linfóides específicas. Os linfócitos sanguíneos chegam às placas de Peyer via HEV. Já os linfócitos ativados pelos antígenos deixam as placas de Peyer via vasos linfáticos aferentes (REYNOLDS & PABST, 1984). A maior parte da expansão e maturação dos linfócitos derivados das placas de Peyer ocorre nos linfonodos mesentéricos (ROTHKÖTTER *et al.*, 1999).

Os linfonodos mesentéricos servem como sítio primário de indução para os linfócitos que chegam diretamente da corrente sanguínea. Linfócitos marcados deixam os linfonodos mesentéricos, via vasos linfáticos eferentes, chegam à corrente sanguínea e migram para os sítios efetores, como a lâmina própria, LE, ou linfonodos periféricos (PABST & BINNS, 1989). Os linfócitos derivados do intestino migram de volta, preferencialmente, para o GALT e linfonodos mesentéricos (PABST & REYNOLDS, 1987).

2.3.2. Vacinação via mucosa

A grande maioria dos patógenos de humanos e animais colonizam e invadem o hospedeiro através das superfícies mucosas (WILLIAMS &

GIBBONS, 1972; WINNER *et al.*, 1991; COTTER *et al.*, 1995; MCGHEE *et al.*, 1999; MACKAY & ROSEN, 2001). Portanto, uma resposta imune induzida, forte e persistente nesses locais, representa uma via atrativa e racional para o desenvolvimento de vacinas (OGRA & KARZON, 1969; SVENNERHOLM *et al.*, 1984; MACKAY & ROSEN, 2001).

A vacinação via mucosa consiste na administração de antígenos nas superfícies mucosas para induzir não só de uma resposta imune local como também uma resposta imune sistêmica (AIZPURUA & RUSSELL-JONES, 1988; MCGHEE & KIYONO, 1993; MCGHEE & KIYONO, 1998; RUDIN *et al.*, 1998; BERGQUIST *et al.*, 1997; KOGA *et al.*, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2001). Os antígenos vacinais estimulam os linfócitos nos tecidos linfóides associados às mucosas de diferentes órgãos, e as células ativadas são transportadas pelo sangue periférico aos locais efetores do sistema imune de mucosas (BRANDTZAEG, 1985; QUIDING-JARBRINK *et al.*, 1995; BERGQUIST *et al.*, 1997).

Uma das vantagens dessa técnica sobre as imunizações tradicionais (via parenteral) é o fato de ser uma via não invasiva, que além de induzir uma resposta imune sistêmica induz também a produção de anticorpos secretores nos locais de captação dos antígenos (KREMER *et al.*, 1998). Estratégias de imunização não invasivas têm conquistado confiança para seu uso e aplicabilidade; entretanto, uma limitação importante para a administração de imunógenos via mucosas é a pouca imunogenicidade de alguns antígenos. Muitos antígenos são pouco imunogênicos quando administrados via mucosa, provavelmente porque eles falham ao interagir efetivamente com o tecido linfóide associado às mucosas (AIZPURUA & RUSSELL-JONES, 1988). Muitas proteínas e polissacarídeos dos antígenos são pouco imunogênicos devido, particularmente, a dificuldades em se aos receptores ligantes (HOLMGREN *et al.*, 1994).

Nas últimas duas décadas o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas da imunologia e biologia molecular, lançou bases

para o desenvolvimento e implementação de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação em todo o mundo (SCHATZMAYR, 2003). Uma variedade de estratégias, incluindo o uso de bactérias como vetores, micropartículas biodegradáveis, lipossomas e adjuvantes de mucosa, estão sob investigação para intensificar a apresentação dos antígenos nas superfícies mucosas (SIZEMORE *et al.*, 1995; ZHO & NEUTRA, 2002).

O uso de vetores recombinantes vivos capazes de colonizar as superfícies mucosas e de carrear os antígenos exógenos aos tecidos linfóides associados às mucosas é uma ferramenta eficiente que pode superar esse obstáculo da fraca imunogenicidade (KREMER *et al.*, 1998). Muitos esforços já foram realizados para o desenvolvimento de vetores que possam ser administrados oralmente. Entretanto, essa rota de imunização requer geralmente doses maiores e administrações repetidas, devido à instabilidade dos antígenos e ao ambiente proteolítico e ácido do estômago, além da forte competição ecológica entre os vetores e os microrganismos residentes no trato gastrintestinal. Uma alternativa atraente para a rota oral é a nasal, pois o trato respiratório é um ambiente menos ácido e proteolítico e é menos colonizado por microrganismos que o trato gastrintestinal.

Já foi relatado que em uma única dose de antígeno administrada por via nasal foi mais eficiente do que a oral (HIRABAYASHI *et al.*, 1990). Vários autores citam que a imunização oral é um procedimento que geralmente requer uma quantidade maior de antígenos para poder ultrapassar a barreira do trato gastrintestinal (MOWAT, 1994; KE & KAPP, 1996; SUN *et al.*, 1999; GABITUS, 2001). Alguns estudos ainda citam a possibilidade de se combinar diferentes rotas mucosas para imunização conjunta, ou a associação da administração via mucosa e via parenteral (ROBBINS *et al.*, 1995).

Estudos experimentais em animais têm indicado a possibilidade de se usar antígenos protéicos, como vacinas administradas na mucosa

respiratória para induzir resposta imune local e sistêmica (HOPKINS *et al.*, 1995; DI TOMMASO *et al.*, 1996; RUSSELL *et al.*, 1996). HATHAWAY *et al.* (1995) demonstraram evidências para a imunização nasal com peptídeos sintéticos. LEHNER *et al.* (1993) destacaram a influência das rotas de imunização no repertório de epítomos induzidos, mostrando sua importância para o desenho de peptídeos sintéticos usados para imunização via nasal.

BENMOHAMED *et al.* (2002) chamaram a atenção para os novos modelos de imunização via mucosa com uma variedade de imunógenos sintéticos ou vacinas recombinantes de subunidades, os quais ampliam as perspectivas de vacinas administradas em *spray*, *drops*, aerossóis e gels, como alternativas vacinais não invasivas, mais atrativas e que possam não requerer o uso de adjuvantes. OGRA *et al.* (2001) apontaram que o futuro do desenvolvimento de vacinas via mucosas envolve muitas outras estratégias que incluem o desenvolvimento de vacinas de subunidades, vacinas de DNA e vacinas desenvolvidas em plantas e outros produtos recombinantes. QUADROS (2004) destacou que as vantagens das vacinas com administração via mucosas são discutidas tendo em vista a plausibilidade biológica demonstrada em experimentos em animais, e que vacinas orais obtidas de plantas transgênicas representam uma abordagem promissora cuja validade está demonstrada inclusive em ensaios em seres humanos. Algumas vantagens potenciais dos fitofármacos incluiriam a administração via oral, a termoestabilidade dos imunógenos e o menor custo para a fabricação do princípio ativo.

2.4. Apoptose

Em muitos órgãos e sistemas celulares há uma produção contínua de células devido a um processo de perda também contínua, tanto para o exterior (*turnover* de células intestinais e epiteliais) quanto por morte

celular (*turnover* de neutrófilos) (COHEN, 1991). Essa capacidade que muitas células possuem, de poder controlar o seu tempo de vida por meio de um processo de morte celular programada (PCD - *Programmed Cell Death*), é chamado de apoptose (do grego *apo* – forma; *ptosis* – queda, como referência as folhas que caem das árvores) (NELSON & COX, 2005).

O processo de morte celular pode ser fisiológico ou patológico. A morte celular fisiológica, PCD, está relacionada com as fases do desenvolvimento do organismo ou com processos envolvidos na manutenção deste. Já a morte celular patológica nunca é programada, ela ocorre após injúria celular, quando a célula é mecanicamente corrompida ou quando há comprometimento da homeostase, sendo esse processo de morte chamado de necrose (COHEN, 1991). O processo de apoptose é extremamente importante no desenvolvimento, na homeostase, no controle de neoplasias e nas funções do sistema imune (WAJANT, 2002), além da remoção de células em excesso, defeituosas, lesadas ou reativas (MARSDEN & STRASSER, 2003).

Em 1885, Flemming realizou a primeira descrição morfológica do processo natural de morte celular, atualmente conhecido como apoptose, um termo conferido por KERR *et al.* (1972) para descrever a morfologia única associada a morte celular que a difere de necrose. KERR *et al.* (1972) descreveram a morfologia de amostras de células em PCD, processo inicialmente chamado de “necrose de encolhimento”, no qual a célula perde 30% do seu volume por perda de água.

Resumidamente, as principais características da apoptose são: processo no qual a célula morre de forma programada; os estágios iniciais envolvem a clivagem da cromatina e colapso nuclear; condensação do citoplasma e mudanças na membrana plasmática para que a célula seja reconhecida e englobada por fagócitos, sem a presença de inflamação (SAVILL *et al.*, 1990; COHEN, 1992; GOLSTEIN & COHEN, 1991; RAFF, 1992; JOHNSON *et al.*, 1997).

Os eventos que carregam a apoptose diferem daqueles da necrose. O processo de necrose é primeiramente marcado pela perda da integridade da membrana celular. O citoplasma e a mitocôndria da célula em necrose estão aumentados, e a célula e muitas de suas organelas internas sofrem lise. Não há formação de vesículas ou corpos apoptóticos no processo de necrose, e este afeta grupos de células adjacentes, além de provocar um processo inflamatório *in vivo*. A apoptose não provoca uma resposta inflamatória, e somente células individuais são afetadas pela apoptose *in vivo*. Apoptose e necrose representam dois extremos de morte celular (LEIST & JÄÄTTELÄ, 2001).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada primeiramente por mudanças no índice de refração das células, seguido de retração do citoplasma e condensação nuclear (HENGARTNER, 1997). A característica ímpar da apoptose é a extrema condensação da cromatina no núcleo. O colapso da cromatina forma, ao redor do envelope nuclear, estruturas esféricas isoladas ou múltiplas (SAVILL *et al.*, 1990). A condensação nuclear vista no processo de apoptose é resultado da clivagem de DNA por endonucleases endógenas específicas, resultando em fragmentos de DNA compostos por mono e oligonucleossomas (WYLLIE, 1980). O DNA é fragmentado em regiões marcadas entre nucleossomas e cores de histona, eventualmente espaçado em 180 a 200 pares de bases ao longo da dupla hélice do DNA. Essa clivagem do DNA é randomizada. Essa distribuição de fragmentos de DNA não é vista na necrose e, propicia um índice para estimar a apoptose em populações celulares ou em tecidos (SELLINS & COHEN, 1991). Ainda não se sabe porque o DNA é clivado. Certamente, isto ocorre para prevenir reparos a sérios danos ao DNA, porém, sessões na transcrição de mRNA, isoladamente, não levam à morte celular em horas, como é visto na apoptose. Embora a clivagem internucleossomal do DNA seja uma característica da apoptose, é provável que ela não ocorra em todos os tipos celulares (SELLINS & COHEN, 1991).

O núcleo é o local onde ocorre as mudanças mais significativas na apoptose. Essas mudanças podem ser visualizadas nas células, usando-se corantes fluorescentes de DNA, como a Laranja de Acridina (CROMPTON *et al.*, 1992).

Além da condensação do citoplasma e do núcleo, levando a uma redução do volume celular, também ocorre a formação de bolhas na membrana plasmática devido a filamentos do citoesqueleto que se alinham de forma paralela no citoplasma e o retículo endoplasmático dilata fusionando-se à membrana plasmática (JOHNSON *et al.*, 1997). A membrana celular começa a apresentar bolhas ou pontos (protusões da membrana), dependendo do tipo de célula (WILLIAMSON *et al.*, 2000). Essas alterações levam a um comprometimento da integridade da membrana plasmática, pela perda de assimetria dos fosfolipídios, das microvilosidades e das uniões célula-célula. Como consequência disto, a célula se dissocia das vizinhas, sofre redução de tamanho e formam-se pequenas protuberâncias separadas pela união das membranas intracitoplasmáticas para, posteriormente, serem separados em “corpos apoptóticos” que são rapidamente reconhecidos e fagocitados por células vizinhas ou macrófagos (JOHNSON *et al.*, 1997).

Antes de morrer, a célula apoptótica sinaliza para ser fagocitada por células vizinhas ou por fagócitos. Isto permite que ela seja destruída antes de sofrer lise e liberar o seu conteúdo celular pró-inflamatório (SAVILL *et al.*, 1990). Uma característica fundamental deste processo é que a membrana celular permanece intacta, prevenindo o extravasamento do conteúdo celular, assegurando assim uma resposta não inflamatória (SAVILL *et al.*, 1990; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003). Bioquimicamente, ocorre a exposição de moléculas na superfície celular que vão sinalizar para a fagocitose da célula apoptótica, como a fosfatidilserina (presente na face interna da membrana celular, onde estão normalmente confinados) (FADOK *et al.*, 1992; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003). Os macrófagos têm receptores para fosfatidilserina

e os usam para se ligarem à célula em apoptose (FADOK *et al.*, 1992). Na apoptose, a membrana mitocondrial externa (MOM) também passa por mudanças que incluem a perda de seu gradiente eletroquímico, possivelmente pela formação de poros nessa membrana, e substâncias como o citocromo C deixam a MOM e passam para o citoplasma. Finalmente, células adjacentes ou macrófagos fagocitam os corpos apoptóticos e as células mortas (LEIST & JÄÄTTELÄ, 2001).

A revolução que ocorreu na pesquisa da apoptose é resultado direto de um melhor entendimento do programa genético e dos mecanismos bioquímicos desse processo. Nas décadas de 70 e 80 do século XX, estudos revelaram que a apoptose não somente tem características morfológicas específicas, como também é regulada por processos bioquímicos específicos. Estudos com linhagens celulares do nematóide *Caenorhabditis elegans* contribuíram para o melhor entendimento dos mecanismos da apoptose (HENGARTNER, 1997).

A via final da apoptose é o resultado da ativação de endonucleases que levam à fragmentação do DNA. O processo de apoptose é controlado geneticamente, havendo genes que podem promovê-lo ou inibi-lo (GUPTA, 1996). Esta via genética de eliminação celular pode responder a estímulos normais e patológicos (MARSDEN & STRASSER, 2003). Genes individuais têm sido associados à apoptose de duas formas: ou eles estão expressos em células em processo de apoptose ou eles modulam os efeitos do processo. Entre esses genes, o proto-oncogene *c-myc* participa da regulação para proliferação celular ou para apoptose. Esse gene programa a célula para crescer, e se esse procedimento for impedido (por falta de fatores de crescimento, ou por oncogenes secundários) a célula entra em processo de morte. A expressão de *c-myc* é necessária para o processo de apoptose (EVAN *et al.*, 1992).

Estudos realizados *in vitro* por TAMAOKI & NAKANO (1990) mostraram evidências de que todas as células animais expressam constitutivamente as proteínas necessárias para sofrer apoptose. A

apoptose é um processo complexo que envolve uma variabilidade de vias de sinalização que levam a múltiplas mudanças na célula em processo de morte (ALNEMRI *et al.*, 1996; CARDONE *et al.*, 1998). As vias fundamentais da apoptose têm sido conservadas ao longo da evolução (CRABTREE, 1989).

2.4.1. Mecanismos da apoptose

Na década de 80 do século XX, vários experimentos mutagênicos foram realizados em larga escala com o nematóide *C. elegans*, através dos quais foi possível identificar mutações que interrompem a PCD, os genes de morte celular anormal (genes *ced* - *cell death*) (HEDGECOCK *et al.* 1983; ELLIS & HORVITZ, 1986). Análises genéticas mostraram que um determinado gene, o *ced-3*, foi fundamentalmente requerido para a apoptose no *C. elegans*. O gene *ced-3* foi clonado e descobriu-se que ele codifica uma proteína que contém um resíduo de cisteína no sítio de atividade e que cliva seu substrato depois do aminoácido aspartato (cysteine + aspartate = *caspase*) (YUAN *et al.* 1993).

As caspases constituem uma grande família de proteínas que são altamente conservadas em organismos multicelulares. Essa família pode ser dividida em duas subfamílias: caspases que estão envolvidas no processo da inflamação e tem homologia com a caspase-1 (*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*) e as caspases que estão relacionadas ao *ced-3* e estão primariamente envolvidas na apoptose (CSISZAR, 2004).

As caspases são, direta ou indiretamente, responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas que caracterizam o processo da apoptose (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; REED, 2000). A maquinaria efetora de morte celular direcionada pela família de caspases cliva muitas proteínas celulares vitais, e ativa proteoliticamente enzimas que contribuem para a destruição celular (THORNBERRY & LAZEBNIK,

1998). Algumas vias de tradução de sinal e de ativação da maquinaria de morte celular têm sido identificadas, demonstrando-se que há vias de ligação entre o estímulo externo e a resposta celular, seja ela de morte ou de sobrevivência (REED, 2000).

Muitas caspases estão presentes constitutivamente em células normais, como pró-enzimas cataliticamente inativas (zimogênios) e que são proteoliticamente processados antes de adquirirem atividade total em resposta a sinais programados e também a estímulos de estresse que induzem apoptose (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Os zimogênios contêm muitos domínios, com predominância de um domínio N-terminal. A ativação das caspases envolve a clivagem dos zimogênios em uma região ácido aspártico específica na região entre as subunidades maiores e menores. O sítio de atividade é formado por um heterodímero contendo uma subunidade maior e uma menor, e a proteína caspase de atividade completa é um tetrâmero composto por dois heterodímeros (CSISZAR, 2004).

Diversos reguladores de caspases também têm sido descobertos, incluindo ativadores e inibidores dessas proteases (REED, 2000). As proteínas inibidoras de apoptose (IAP - *inhibitor of apoptosis proteins*) suprimem a apoptose por bloquear a atividade das caspases. Essa supressão pode ser realizada pela Smac/DIABLO, uma proteína mitocondrial liberada no citosol em resposta a um estímulo apoptótico (FESIK & SHI, 2001).

As caspases são consideradas as executoras da apoptose, uma vez que sua ativação leva à clivagem de importantes substratos celulares. Em linfócitos T maduros, a apoptose induzida por falta de fatores de crescimento e a morte celular induzida por ativação são mediadas por estes complexos enzimáticos (DE ALBORÁN *et al.*, 2003).

Outro gene identificado no *C. elegans* é o gene *ced-9*, que protege contra a apoptose. A perda genética da sua função aumenta o índice de apoptose (HENGARTNER *et al.* 1997). A proteína codificada pelo *ced-9* é

homóloga à do gene *bcl-2* em mamíferos, um proto-oncogene (TSUJIMOTO & CROCE, 1986).

A família de proteínas Bcl-2 inclui um grande número de proteínas que compartilham domínios Bcl-2 homólogos (BH). Estruturalmente, as proteínas Bcl-2 podem ser divididas em três grupos: grupo I inclui proteínas Bcl-2 que são anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e A1), e os grupos II e III os membros que são pró-apoptóticos. Os membros do grupo II (Bax, Bak e Bok) contêm três domínios BH (BH-1, BH-2 e BH-3) e os do grupo III (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa e Puma) possuem somente um domínio, o BH-3 (“*BH3-only*”). Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 estão implicados na permeabilidade da MOM, permitindo a saída de proteínas para o citoplasma, como a citocromo C. Os membros anti-apoptóticos dessa família, como o Bcl-2, protege as células do processo de apoptose por meio do seqüestro de proteínas pró-apoptóticas ou por interferir em suas atividades (DANIEL *et al.* 2003; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003).

2.4.2. Vias de ativação da apoptose

A apoptose mediada pela família das caspases é o principal tipo de morte celular programada em muitos processos fisiológicos (ALNEMRI *et al.*, 1996; CARDONE *et al.*, 1998). Este fato poderia ser perigoso para o organismo, uma vez que dependeria de uma só família de proteases para a remoção de células não desejadas e que são potencialmente perigosas. Entretanto, alguns estudos indicam que a PDC pode ocorrer na completa ausência de caspases, como no caso de dano de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático ou lisossomos, que aumentam a liberação de cálcio e algumas espécies de radicais livres de oxigênio, além da liberação de proteínas efetoras (JÄÄTTELA & TSCHOPP, 2003).

Embora possam existir muitas vias para ativação das caspases, unicamente duas vias foram bem elucidadas detalhadamente, a via intrínseca, mitocondrial, e a via extrínseca, que é ativada por ligações nos “receptores de morte” (WALLACH *et al.*, 1998; SALVENSEN & DIXIT, 1997; REED, 2000; WAJANT, 2002). Outros estudos ainda sugerem uma terceira via para a ativação da apoptose, a qual envolveria o retículo endoplasmático (NAKAGAWA *et al.* 2000).

A apoptose induzida em resposta a estímulos externos (via extrínseca) inclui a ativação de receptores de superfície celular como Fas (também chamado CD95 ou Apo-1), TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*, também chamado p55 ou CD120a), TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*), TRAIL-R2, p75-NGFR (*p75-nerve growth factor receptor*) (WAJANT *et al.* 2003) e outros como CAR1, DR3 (também chamado Apo3, WSL-1, TRAMP ou LARD) (CHINNAIYAN *et al.*, 1996), DR4 e DR5 (também chamado Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2 ou KILLER) (SMITH *et al.*, 1995). Esses “receptores de morte” transmitem sinais apoptóticos iniciados por ligantes específicos e podem ativar as caspases em segundos, causando eliminação apoptótica da célula em horas (ASHKENAZI & DIXIT, 1998). Os receptores de morte têm dois motivos distintos para sinalização: o domínio de morte (DD) e o domínio efetor de morte (DED), que permitem interagir com outras proteínas envolvidas na cascata da apoptose. Tipicamente, a via extrínseca envolve a ativação e a iniciação das caspases, principalmente da caspase-8, a qual ativa a caspase-3 ou cliva o membro da família Bcl-2, Bid, levando à formação de uma apoptosoma e ativação da caspase-9 (HENGARTNER, 1997).

A sinalização extrínseca na superfície celular pode ser iniciada pela agregação dos receptores Fas quando eles se ligam ao seu ligante multivalente, FasL (*Fas Ligand*). Essa agregação libera no citoplasma os domínios dos receptores de membrana em contato próximo e induz a mudanças conformacionais que permitem a montagem de uma

sinalização complexa, o complexo de sinalização de morte induzida (DISC - *death inducing signaling complex*), na cauda citoplasmática dos receptores. Alguns estudos sugerem que os receptores de morte podem ser pré-agregados na membrana através de interações com pré-ligantes de domínios montados (PLAD - *pre-ligand-binding assembly domains*) (CHAN *et al.* 2000; SIEGEL, *et al.* 2000). Os DISC compreendem os receptores e ligantes como “adaptadores” de proteínas, FADD (*Fas associated death domain protein*) que se liga através do DD c-terminal ao receptor ligante e recruta a pró-caspase-8. O Fas é uma proteína de membrana homóloga aos receptores de fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento neural (NGF) (ITOH *et al.*, 1991; OEHM *et al.*, 1992).

O sistema Fas/FasL tem um papel muito importante porque é o mediador de três tipos de morte celular fisiológica: deleção periférica de células T ativadas ao final de uma resposta imune; morte de células infectadas por vírus ou células cancerígenas por células T citotóxicas e por células assassinas naturais (NK – *natural killers*); e por último, morte de células inflamatórias em sítios imunologicamente privilegiados como olho, testículo e ovário (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

A via mitocondrial (via intrínseca) envolve os membros da família de proteínas Bcl-2, e pode ser ativada pelos receptores de morte ou por estímulos que são independentes dos receptores de morte, como eventos relacionados a dano ao DNA, inibição de topoisomeras, retirada de fatores tróficos e liberação do citocromo C da mitocôndria (RICH *et al.* 1999; PARONE *et al.* 2003).

Alguns membros da família Bcl-2, como Bax, Bad e Bid, regulam uma variedade de mecanismos que incluem o processamento proteolítico, fosforilação e seqüestramento por inibição de proteínas. Sinais pró-apoptóticos direcionados pelos membros da família Bcl-2 para a mitocôndria interagem com os membros anti-apoptóticos dessa mesma família (Bcl-2 e Bcl-XL) para determinar se a apoptose será ou não iniciada. Se as proteínas pró-apoptóticas se sobressaem, o citocromo C e

outras moléculas são liberadas da MOM. Uma vez que o citocromo C é liberado da mitocôndria, ele pode interagir com Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*, um homólogo em mamíferos da *C. elegans* CED-4), dATP (2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate) e pró-caspase-9 em um complexo de proteínas chamado de apoptosoma. A caspase-9 é processada e ativada como parte do apoptosoma, onde pode clivar e ativar a caspase-3. (ZOU *et al.* 1997).

A família de proteínas Bcl-2 representa um ponto crítico na via intrínseca, pois a expressão de *bcl-2* aumenta a resistência de linfócitos para muitos estímulos de morte, incluindo diminuição de citocina, dano ao DNA e estresse oxidativo (HOCKENBERY *et al.*, 1990; HOCKENBERY *et al.*, 1993)

2.5. Morte celular induzida por ativação (AICD)

A morte celular está associada com a renovação de células danificadas ou de células que não recebem suporte do seu microambiente (fatores de sobrevivência). No curso da resposta imune, a morte celular neutraliza uma expansão clonal excessiva principalmente por dois mecanismos: privação de fatores de crescimento e morte celular induzida por ativação (AICD) (JANSSEN *et al.*, 2000).

A AICD é um processo que regula a duração e a intensidade da resposta imune primária de células T (GENESTIER *et al.*, 1999). AICD em células T *in vivo* tem sido proposta primeiro como forma de limitar a expansão da resposta imune por eliminação de células efectoras que não são mais necessárias, e também para eliminar a auto-reatividade de células T que tenham escapado da seleção tímica (LYNCH *et al.*, 1995). Tem sido sugerido que a persistência de células T de memória é dependente de períodos de re-estimulação por antígenos específicos ou reatividade cruzada (BEVERLEY, 1990; GRAY & MATZINGER, 1991). A

AICD ocorre nas células T após o reconhecimento do antígeno, a união de um anticorpo a seu antígeno receptor ou exposição a mitógenos (GREEN & SCOTT, 1994). As células T que sofrem AICD apresentam as mudanças morfológicas típicas associadas à apoptose (JANSSEN *et al.*, 2000).

GROSSMAN *et al.* (2004) consideram que o número, a frequência e a eficácia das doses requeridas para que um programa de vacinação alcance uma efetividade prolongada, deverá otimizar o equilíbrio entre as populações de células efectoras e aquelas com grande capacidade para expansão clonal. Isso garante uma memória imunológica, uma vez que a estimulação antigênica repetida pode ser um potente estímulo para a apoptose, causando imunodepressão mais do que memória imunológica.

A AICD de células T depende do estado de ativação da célula, ou seja, células T ativadas recentemente são resistentes à indução de apoptose e esta resistência inicial precede a um posterior fenótipo sensível. Este processo representa a fase de diminuição da resposta imune e a eliminação de clones reativos. Somente poucas células T sobrevivem como células de memória. A AICD ocorre por mecanismos suicidas ou fratricidas, envolvendo prematuramente o sistema Fas após estimulação do receptor de células T (TCR), e o TNF-R2 nos estágios posteriores. A importância do sistema Fas/FasL para AICD foi demonstrada pelo descobrimento de um receptor solúvel chamado DcR3, que se liga ao FasL inibindo a apoptose quando induzida por este fator (SCAFFIDI *et al.*, 1999). AICD ocorre como uma consequência de um estímulo através do CD3/TCR das células T (ITOH *et al.*, 1991; RUSSEL *et al.*, 1993). A interação entre Fas e Fas-L está envolvida na apoptose induzida pelo TCR/CD3 na célula T, como foi demonstrado nos estudos realizados por DEHIN *et al.* (1995) e YANG *et al.* (1995). As evidências de que AICD de células T é mediada por Fas-FasL foi demonstrada em muitos grupos de células T de hibridomas, células T de linhagem leucêmica Jurkat e células T pré-ativadas não transformadas (DEHIN *et*

al., 1995; JU *et al.*, 1995), sendo que os estudos *in vitro* com células Jurkat é tido como o sistema modelo de avaliação da AICD via ativação do complexo TCR/CD3 (RUIZ, 1997).

Estudos usando *c-myc* (SHI *et al.*, 1992) ou domínios recíprocos negativos mutantes de Myc ou Max (BISSONNETTE *et al.*, 1994), os quais antagonizam a função do heterodímero Myc/Max, demonstraram que a função do c-Myc é requerida para AICD em células T (GENESTIER, *et al.*, 1999). Foi também observado que em células T de linhagens leucêmicas humanas e em outros tipos de células linfóides, a expressão de *c-myc* é fundamental para proteger essas células da indução de apoptose (THULASI *et al.*, 1993; FISCHER *et al.*, 1994).

A expressão de FasL durante a AICD requer a ativação de fatores de transcrição. HUEBER *et al.* (1997) reportaram que a apoptose induzida por *c-myc* requer a expressão de Fas e FasL. Entretanto GENESTIER, *et al.* (1999) sugerem que c-Myc pode ser essencial para a função do FasL e subsequente apoptose em alguns sistemas, e que TGF- β 1 (*transforming growth factor*) inibe a expressão de FasL via *down-regulation* da expressão de *c-myc* mRNA, e que o requerimento de c-Myc durante a AICD pode ser ao nível da expressão de FasL. NGUYEN & RUSSELL (2001) discutem que algumas células T que expressam altos níveis de FasL podem entrar em processo de AICD, enquanto outras expressam baixos níveis de FasL são sensíveis à AICD, sugerindo que a susceptibilidade da AICD não está correlacionada com a cinética de “*up*” ou “*down-regulation*” de FasL.

O processo de AICD pode ocorrer em células T imaturas ou em células transformadas, assim como também em células T maduras e ativadas de sangue periférico (JONES *et al.*, 1990; NEWELL *et al.*, 1990; WESSELBORG *et al.*, 1993; THOME *et al.*, 1997; KRAMMER, 2000; HILDEMAN *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003). Isolados frescos de linfócitos T esplênicos são relativamente resistentes à indução de AICD desenvolvida via TCR ou à associação do complexo CD3, embora a pré-

ativação via complexo TCR/CD3 as torna susceptíveis (OWEN-SCAUB *et al.*, 1992).

Os linfócitos usam vários mecanismos para iniciar a morte celular na fase de declínio da resposta imune. Além do sistema Fas/FasL, outro mecanismo que ajuda na resolução de uma resposta imune seriam os sinais traduzidos pelo receptor do antígeno e as moléculas co-estimulatórias (TCR/CD3) que começam a diminuir, levando conseqüentemente a uma diminuição na interação com as células apresentadoras de antígeno. Esta diminuição dos sinais leva à redução na expressão de moléculas anti-apoptóticas e aumento nas pró-apoptóticas. Então, tanto os receptores de morte quanto o desequilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas seriam os responsáveis pela diminuição dos linfócitos antígeno-específicos originados durante uma resposta imune adaptativa (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003).

Em linfócitos existem vários sinais inibitórios que evitam a morte celular, por exemplo, vários membros da família de interleucinas têm mostrado que possuem atividade anti-apoptóticas. A exposição de uma célula T a um estímulo antigênico origina sua ativação, e como conseqüência, se produz um aumento na síntese de receptores de citocinas que se dispõem na membrana plasmática, bem como um aumento na síntese de citocinas que regulam o crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose das células T e de outras células do sistema imune (CRABTREE, 1989). A IL-2, por exemplo, atua na ativação e proliferação de células T e também protege estas células pelo aumento da expressão de Bcl-2, mas também podem mediar a morte celular (AYROLD *et al.*, 1998). A IL-12 é uma citocina imunoregulatória, estimula a produção e secreção de muitas outras citocinas, especialmente interferon gama (IFN- γ) (WU *et al.*, 1993). Uma importante atividade da IL-12, agindo juntamente com o IFN- γ , é direcionar a resposta imune para um fenótipo mais Th1 ou Th2 (O'GARRA, 1998). VARADHACHARY *et al.* (1997) analisaram clones de células T para sua susceptibilidade a AICD

em resposta a ligação CD3/TCR. Eles observaram que AICD ocorreu somente em clones Th1, mediada pelo Fas, e os clones Th2 resistiram a AICD.

SANCHEZ (2004) demonstrou que linfócitos T SBm7462-reativos expressam constitutivamente a maquinaria necessária para a indução de apoptose após ativação com o peptídeo sintético, e que o processo de síntese *de novo* de proteínas não está envolvido na AICD após sinalização via TRC. A AICD induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 foi mediada por uma via independente da calcineurina e não houve inibição do gene *c-myc* após re-estimulação de linfócitos SBm7462-reativos.

2.5.1. Agentes indutores e inibidores da AICD

A mitramicina é um antibiótico obtido do *Streptomyces plicatus* e capaz de inibir a transcrição e síntese de proteínas, por se ligar ao DNA pela cromatina. O mecanismo de ação da mitramicina está fundamentado na união a seqüências de DNA ricas em G-C, impedindo a união do fator de transcrição SP1 a este tipo de seqüências situadas na região promotora de alguns genes, dentre eles o *c-myc* (SNYDER *et al.*, 1991). O tratamento com 50nM de mitramicina mostrou que este medicamento inibe a proliferação celular, constatando-se também que a partir de 8 horas há uma redução nos níveis do mRNA de *c-myc*, o qual desaparece praticamente após 15 horas de tratamento. Apesar desses resultados, o papel de *c-myc* na indução de apoptose parece ser dual, sendo dependente do tipo celular e do agente indutor (RUIZ, 1997).

Cicloheximide (CHX) é um antibiótico produzido pelo *Streptomyces griseus* (KOMINEK, 1975). Sua principal atividade biológica é a inibição da translação em eucariotas (SMITH *et al.*, 1997), resultando na inibição da síntese de proteínas, levando a célula a se desenvolver até a sua morte. CHX tem sido usado para a inibição controlada da síntese de

proteínas (LIN & HSU, 2000), super-indução da expressão de proteínas (MIZEL & MIZEL, 1981; MA *et al.*, 2000), indução de apoptose (TAMAOKI & NAKANO, 1990; CLEMENS *et al.*, 1998) e facilitação da apoptose induzida pelos receptores de morte (FULDA *et al.*, 2000). Na presença de CHX ocorre uma diminuição progressiva da quantidade total de RNA em culturas celulares, provavelmente como reflexo da diminuição da viabilidade celular (EFRAT & KAEMPFER, 1984).

Estudos com células Jurkat estimuladas com o ionóforo de cálcio A23187 na presença de 10µg/ml de CHX, mostraram que não se produziu o bloqueio da morte celular induzida pelo ionóforo, e constatou-se que a própria CHX provoca perda importante da viabilidade celular e induz à degradação do DNA (RUIZ, 1997). O tratamento de neutrófilos circulantes com TNF- α na presença de 1µg/ml de CHX aumentava significativamente a capacidade do TNF de induzir apoptose. Paralelamente, constataram que o tratamento só com CHX acelerava o processo de morte celular. Os autores sugeriram que no modelo utilizado, a síntese de proteínas não seria necessária para a indução de apoptose, embora a apoptose espontânea dos neutrófilos seja inibida por proteínas sintetizadas *de novo* (NIWA *et al.*, 1999).

BLOM *et al.* (1999), utilizando cultura primária de hepatócitos e CHX em concentrações variando de 1µM - 300µM, observaram que a apoptose se iniciava a partir de 2 horas da adição de CHX. Eles observaram apoptose máxima após 4 horas em concentrações de 100 µM e constataram que não havia diferença na intensidade da morte celular com o uso de concentrações maiores. MAROTTA *et al.* (2002) observaram que o tratamento de neurônios da camada granular do cerebelo com 10µM de CHX diminuía em 18,2% a sua sobrevivência, enquanto que concentrações de 10⁻²⁷M aumentavam a viabilidade neuronal em 5%, sugerindo um efeito neuroprotetor da CHX quando utilizada em concentrações muito baixas. KONGPHANICH *et al.* (2002) usando as linhas celulares HUT102 e MT-2, células T humanas

transformadas pelo vírus HTLV-I e o anticorpo monoclonal anti Fas CH11, para medir a sensibilidade à morte mediada por Fas na presença de 10 μ g de CHX constataram aumento significativo de células apoptóticas. Também observaram durante os três dias de tratamento que foi mínimo o efeito da CHX sozinha.

O 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole riboside (DRB) é análogo da adenosina e tem sido usado para inibir a síntese de mRNA. Tem sido proposto que DRB bloqueia a síntese de RNA nuclear e Ad-2 RNA pela acentuação da terminação prematura na atenuação das regiões do DNA (LAUB, *et al.*, 1980). DRB é tido como um inibidor seletivo da síntese de mRNA (MARTIN *et al.*, 1998). Alguns trabalhos têm mostrado que o uso de DRB em concentrações de 125 μ M, o qual atua após ser convertido na sua forma ativa BAD (dinucleotídeo adenina benzamida), um análogo de NAD (dinucleotídeo adenina nicotinamida), com frequência não inibe a morte por apoptose em células Jurkat estimuladas com A23187 (RUIZ, 1997). Porém, o tratamento de células leucêmicas L1210 com BR nas doses de dois, 5 ou 10 μ M, induziu apoptose dose-dependente, sendo a intensidade de fragmentação do DNA 2,6; 3,4 e 4,3 vezes maior nas doses utilizadas quando comparada com o controle (RAUKO *et al.*, 2001). Na concentração de 40 μ M, DRB inibe a síntese de RNA em culturas celulares em 70% (EFRAT & KAEMPFER, 1984).

Ciclosporina A (CsA) é um metabólito oligopetídeo cíclico não-polar do fungo *Tolytocladium inflantum*. Tem sido usado como antibiótico, mas possui potente propriedade imunossupressora (DREYFUSS *et al.*, 1976). Tem mostrado capacidade de inibir o funcionamento de muitas proteínas nucleares envolvidas na ativação de células T ao nível da transcrição no mRNA. A ação da CsA tem efeito imunossupressivo devido à sua habilidade de inibir eventos relacionados com a ativação de linfócitos T, como a transcrição de genes de linfocinas em resposta as sinais iniciados pelos receptores de antígenos. A CsA inibe diretamente a função de proteínas nucleares críticas para ativação de linfócitos T, inibindo a ação

de membros da cascata de transmissão que vai do receptor de antígeno até o núcleo (EMMEL *et al.*, 1989).

A CsA inibe a expressão de FasL pela inibição do fator de atividade nuclear (NF-AT - *nuclear factor of activated*) de células T (BRUNNER *et al.*, 1996; LATINIS *et al.*, 1997). A CsA tem apresentado aparente especificidade para inibir a atividade de ligação do DNA a NF-At, AP-3, e também NF-kappa B, além de proteínas nucleares importantes na atividade de transcrição de genes para IL-2 e seus receptores, bem como outras linfocinas (EMMEL *et al.*, 1989). Ela também pode bloquear a ativação e transcrição do gene da IL-2 (WIEDERRECHT *et al.*, 1993; RUIZ, 1997), como também a apoptose induzida a través do complexo receptor para o antígeno (FRUMAN *et al.*, 1992). Além disto, tem-se demonstrado que a CsA forma um complexo com o receptor intracelular *cyclophilin* o qual se liga à calcineurina, inibindo sua atividade enzimática e, bloqueando a indução da expressão de FasL, bloqueando a transcrição do gene que codifica FasL, após a ativação da célula T (ANEL *et al.*, 1994).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune de mucosas e a indução de morte celular por ativação (AICD) de linfócitos T de memória em camundongos BALB/c imunizados por via oral e nasal com o peptídeo sintético anti-carrapato *R. (B.) microplus* SBm7462.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de agentes indutores de AICD pela inibição da expressão de *c-myc* mediante tratamento com 50nM de mitramicina SIGMA® durante 72 horas, e inibição da síntese de proteínas e aumento na expressão de Fas com 10µg/mL de cicloheximide (CHX) SIGMA® durante 10 horas;

- Avaliar o efeito de agentes inibidores de AICD pela inibição da transcrição do RNA com 125µM de benzamida ribósido (DRB) SIGMA® durante 15 horas, e inibição de calcineurina e FasL com 200ng/mL de ciclosporina A (CsA) SIGMA® durante 24 horas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Antígeno SBm7462

Para a indução da apoptose de linfócitos T, foi utilizado como antígeno o peptídeo sintético SBm7462¹, desenhado no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV/BIOAGRO/DVT/UFV) e sintetizado com o auxílio da Fundação Instituto de Imunologia da Colômbia (FIDIC), em Bogotá, Colômbia.

4.2. Animais

Foram utilizados 80 camundongos BALB/c, adultos, com idade acima de dois meses, pesando em torno de 25 gramas, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa e mantidos durante o período experimental no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

¹ Patente Nacional PI0001717-5; Patente Internacional PCT/BR01/00057

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais com 20 animais cada, e mantidos em experimentação por 12 semanas. Durante todo o experimento, para proporcionar conforto, eles permaneceram em salas com monitoramento de temperatura e umidade, sendo submetidos a um regime diário de luz artificial de 12 horas. Os animais receberam ração comercial com composição nutricional adequada para roedores e água *ad libitum*.

4.3. Imunização dos animais

Os animais foram imunizados duas vezes, com intervalo de três semanas, de acordo com os seguintes tratamentos:

- Grupo I (20 animais): animais imunizados por via oral com 100 μ g do peptídeo SBm7462 diluído em 50 μ L de água milliQ q.s.p.;
- Grupo II (20 animais): animais imunizados por via nasal com 100 μ g do peptídeo SBm7462 diluído em 50 μ L de água milliQ q.s.p.;
- Grupo III (20 animais): animais não inoculados, utilizados como doadores de baço;
- Grupo IV (20 animais): animais não inoculados, utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais.

4.4. Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, sendo o projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da UFV (DVT/UFV), no processo nº 28/2006 e registrado

na Pró-reitoria de Pós-Graduação da UFV sob o número 21101155103/PPG/UFV. Todos os procedimentos técnicos foram realizados por Médicos Veterinários.

Aos nove, 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização, foram eutanasiados cinco animais dos grupos I e II, para se proceder a coleta das amostras. Os animais do grupo III foram eutanasiados 24 horas antes das coletas dos grupos I e II, sendo eutanasiados cinco animais por coleta. Os animais do grupo IV foram eutanasiados 24 horas antes de se proceder aos estudos da AICD.

4.5. Coleta de sangue dos animais para a obtenção de soro

Os animais dos grupos I, II e III tiveram seu sangue coletado nas datas citadas anteriormente. As amostras de sangue foram coletadas no plexo retro-orbital, com os animais mantidos sob sedação com éter. O sangue foi coletado em tubos de vidro sem anticoagulante e após coagularem, foram centrifugadas durante cinco minutos a 3500 rpm (rotações por minuto), para se obter o soro dessas amostras. Os soros foram aliquotados em tubos, com auxílio de pipetas Pasteur, identificados e conservados a -20°C.

4.6. Pesquisa de anticorpos no soro por meio de ELISA indireto

Foi utilizado o teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para a pesquisa de anticorpos no soro dos animais imunizados nos grupos I e II. As placas de ELISA foram sensibilizadas com 1µg/poço do antígeno SBm7462 diluído em solução de tampão carbonato pH 9,6 (0,159g de Na₂CO₃; 0,293g de NaHCO₃; 100mL de H₂O milliQ q.s.p.), deixando-se adsorver a 4°C por um tempo médio de

12 horas. Decorrido este período, as placas foram lavadas duas vezes com solução de tampão de lavagem (9,0g de NaCl; 0,5mL de Tween 20; 1000mL de H₂O milliQ q.s.p.), e em seguida armazenadas em geladeira por 24 horas. Em temperatura ambiente, adicionou-se nos poços da placa a solução de bloqueio – caseína 2% em PBS pH 7,6 (4,25g de NaCl; 0,64g de Na₂HPO₄; 0,068g de NaH₂PO₄.H₂O; 500mL de H₂O milliQ q.s.p.) e deixou-se reagir por uma hora. Após este período de tempo, as placas foram lavadas duas vezes com solução de tampão de lavagem e, posteriormente, adicionou-se 100μL/poço dos soros dos animais diluídos 1:100 em tampão de incubação (87,5 mL de PBS pH 7,6; 12,5 mL de caseína 2% em PBS pH 7,6; 50μL de Tween 20) e deixou-se incubar por duas horas à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas seis vezes com solução de tampão de lavagem. Procedeu-se a incubação por duas horas, em temperatura ambiente, do anticorpo secundário (IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (título 1:40.000) diluído em tampão de incubação, no volume de 100μL/poço. Após esse período de incubação, as placas foram lavadas novamente por seis vezes com solução de tampão de lavagem e adicionou-se a solução reveladora no volume de 100μL/poço, composta de 20mL de solução de tampão substrato (7,19g de Na₂HPO₄; 5,19g de ácido cítrico; 1000mL de H₂O milliQ q.s.p.) e 4mg de O.P.D. (θ-fenildiaminobenzeno) e 2,5μL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), deixando-se reagir por um período de 20 minutos em local escuro. A reação foi interrompida adicionando-se 30μL/poço de solução de ácido sulfúrico 1:20.

A leitura das amostras foi feita em leitor de ELISA a 492nm. Para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo, utilizou-se a média dos valores dos controles negativos, acrescida de dois desvios-padrão. Os valores foram expressos em médias de absorbância para cada grupo, individualmente.

4.7. Isolamento de células esplênicas

Após a eutanásia dos animais dos grupos I e II, eles foram mergulhados em álcool 70% durante cinco minutos. Sob condições de esterilidade em capela de fluxo laminar, retirou-se a pele do abdome de cada animal e após a incisão dos músculos abdominais a cavidade peritoneal foi exposta e retirou-se o baço, o qual foi imediatamente colocado em meio de cultura RPMI-1640 incompleto mantido em gelo. Todos os baços, obtidos de cada grupo separadamente, foram macerados em malha metálica com auxílio de êmbolo de seringa plástica. A suspensão obtida desse macerado de baços foi lavada três vezes com meio de cultura RPMI-1640 incompleto e tampão de lise de hemácias ACK pH 7,2 (90mL de solução A: NH_4Cl 0,15M e 10ml de solução B: Tris 0,17M) na proporção de 3:1 a 1500 rpm durante cinco minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em meio de cultura RPMI-1640 incompleto. Realizou-se a contagem das células coradas com Azul de Tripán SIGMA[®], em câmara de Neubauer.

4.8. Separação de linfócitos T

Suspensões de células esplênicas podem ser fracionadas levando-se em consideração a sua capacidade de aderência diferencial às fibras de náilon. A 37°C e na presença de soro fetal bovino, linfócitos B se unem avidamente a colunas de lã de náilon levando a uma efluente população de linfócitos T virtualmente puros.

Foram colocados 600mg de lã de náilon estéril em seringa de plástico de 20mL, a qual foi lavada com meio DMEM contendo 5% de SFB e, em seguida, incubada a 37°C por uma hora, em estufa com 5% de CO_2 . Após a incubação, a coluna foi retirada da estufa e lavada novamente com meio DMEM contendo 5% de SFB, para corrigir qualquer

mudança de pH ocorrida durante a incubação. Foram adicionados 2 mL de suspensão celular, na concentração de 5×10^7 linfócitos/mL, provenientes dos grupos de animais inoculados com o peptídeo sintético SBm7462 (grupos I e II, separadamente). A coluna foi tampada e incubada por 45 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂, depois lavada com 25 mL de meio DMEM completo contendo antibiótico (sulfato de gentamicina 50µg/mL), antimicótico (anfotericina B 2,5µg/mL), glutamina (2mM) e 10% de SFB, a 37°C. As células livres foram coletadas e concentradas por centrifugação a 1300rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, determinou-se o número de linfócitos viáveis usando a técnica de exclusão pelo Azul de Tripán SIGMA®.

Para todas as coletas, alíquotas de células foram criopreservadas usando-se solução de criopreservação contendo 40% de albumina sérica bovina a 20% e 60% de solução crioprotetora manipulada (FARMOTERAPICA®), acrescida de 10% da solução final de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2UI de heparina sódica/mL. Os criotubos foram preenchidos na proporção 1:1 (500µL da solução celular e 500µL da solução crioprotetora) e mantidos em freezer a -70°C.

4.9. Obtenção de células apresentadoras de antígeno do baço

Após a eutanásia dos animais do grupo III, eles foram mergulhados em álcool 70% durante cinco minutos. Sob condições de esterilidade, em capela de fluxo laminar retirou-se a pele do abdome de cada animal e, após incisão dos músculos abdominais, a cavidade peritoneal foi exposta e retirou-se o baço, o qual foi imediatamente colocado em meio de cultura RPMI-1640 incompleto mantido no gelo. Os baços foram macerados em malha metálica com auxílio de êmbolo de seringa plástica. A suspensão obtida desse macerado de baços foi lavada três vezes com meio de

cultura RPMI-1640 incompleto e tampão ACK pH 7,2 na proporção de 3:1 a 1500 rpm durante cinco minutos a 4°C.

O sedimento obtido foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 incompleto e, em seguida, foram adicionados 50µg/mL de mitomicina C SIGMA® na suspensão celular com concentração 5×10^7 células/mL, para ativá-las como células apresentadoras de antígenos (APCs). A solução celular foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante 20 minutos, evitando-se a exposição direta à luz. Após este período, fez-se uma lavagem com meio RPMI-1640 com 5% de SFB, a 1200 rpm a 4°C, durante 10 minutos. Repetiu-se o procedimento por duas vezes. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em meio de cultura RPMI-1640 completo, contendo antibiótico (sulfato de gentamicina 50µg/mL), antimicótico (anfotericina B 2,5µg/mL), glutamina (2mM) e 10% de SFB. Realizou-se a contagem das células coradas com Azul de Tripán SIGMA®, em câmara de Neubauer.

4.10. Obtenção de linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos

Após a contagem das células esplênicas ativadas pela mitomicina C, conforme descrição no item anterior, as mesmas foram semeadas na concentração de 6×10^6 APCs/poço, em placas de cultivo celular de 24 poços, acrescidas de meio de cultivo RPMI-1640 completo e cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas. Decorrido este tempo, foram adicionados os linfócitos T isolados dos animais imunizados com o peptídeo sintético, na concentração de 2×10^6 células/poço, em placas de cultivo individuais para cada grupo (grupos I e II). Acrescentou-se também 1µg do peptídeo sintético SBm7462/ 1×10^6 células, completando-se com meio RPMI-1640 completo para um volume final de 2,5mL por poço. As placas de cultivo foram incubadas por 10 dias em

estufa a 37°C com 5% de CO₂. Os meios de cultura foram trocados a cada 48 horas.

4.11. Obtenção de macrófagos peritoneais

Após a eutanásia dos animais do grupo IV, eles foram mergulhados em álcool 70% durante cinco minutos. Em condições de esterilidade retirou-se a pele do abdômen e inoculou-se na cavidade peritoneal 5mL de solução gelada de 10% de dextrose em meio RPMI-1640 incompleto. Após a inoculação, fez-se massagem no peritônio dos animais com a ponta dos dedos durante quatro minutos e, em seguida, coletou-se o meio inoculado com as células liberadas, passando-o imediatamente para tubos de plásticos de poliestireno mantidos em gelo. A seguir, fez-se lavagem das células com meio de cultura RPMI-1640 incompleto a 1500 rpm, durante cinco minutos, a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI-1640 completo. Foram contadas as células coradas pelo Azul de Tripán SIGMA[®], em câmara de Neubauer e, em seguida, foram semeadas em placas de cultivo celular de 24 poços, na proporção de 6x10⁶célula/poço. As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

4.12. Avaliação da AICD

Os linfócitos T SBm7462-reativos, após os 10 dias de cultivo em estufa, foram incubados em placas de cultivo celular de 24 poços, na concentração de 2x10⁶linfócitos/poço, acrescidos de 6x10⁶macrófagos peritoneais pré-tratados com 1µg de peptídeo SBm7462/1x10⁶células durante quatro horas. Todos os poços foram preenchidos com meio de cultivo RPMI-1640 completo até completar 2,5mL e as placas foram

mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, foram adicionados os diferentes agentes indutores ou inibidores da apoptose, sendo que os linfócitos T SBm7462-reativos obtidos de cada grupo animal imunizado foram subdivididos em tratamentos distintos, de acordo com o esquema mostrado no quadro 1. Para o controle dos agentes indutores ou inibidores de apoptose, em cada tratamento, foram mantidos poços onde os macrófagos não foram pré-tratados com peptídeo e também poços onde não foram colocadas as respectivas drogas. As dosagens dos agentes foram determinadas em pesquisas realizadas na linha leucêmica humana de linfócitos T CD4 Jurkat, a qual é utilizada como modelo para estudo de AICD (RUIZ, 1997; SANCHEZ, 2004).

Quadro 1. Tratamentos com as drogas indutoras e inibidoras da AICD, para os grupos I e II, separadamente.

<u>TRATAMENTO</u>	Mitramicina (50nM) 72h	CHX (10µg/mL) 10h	DRB (125µM) 15h	CsA (200ng/mL) 24h
Linf. T SBm7462-reativos θ peritoneais Peptídeo SBm7462 (<i>Tratamento I</i>)	não	não	não	não
Linf. T SBm7462-reativos θ peritoneais Peptídeo SBm7462 (<i>Tratamento II</i>)	sim	sim	sim	sim
Linf. T SBm7462-reativos θ peritoneais (<i>Tratamento III</i>)	sim	sim	sim	sim

4.13. Viabilidade celular pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán

Após o período de incubação específico para cada um dos tratamentos citados acima, determinou-se a viabilidade celular dos

linfócitos pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán SIGMA[®]. Alíquotas de 20µL das culturas celulares foram coletadas individualmente, acrescidas de 20µL de solução de Azul de Tripán 0,4%, e colocadas em câmara de Neubauer. Após 10 minutos de repouso e com auxílio microscópio de luz, com objetiva de 40X, contou-se o número de células viáveis nos cinco quadrantes da câmara, ajustando-se o fator de diluição para se obter o número total de células viáveis. Para determinação da porcentagem de viabilidade celular utilizou-se a seguinte fórmula: Viabilidade Celular (%) = $\frac{\text{total de células viáveis}}{\text{total de células viáveis e não viáveis}} \times 100$.

4.14. Preparações em citocentrífuga

Após o período de incubação específico para cada um dos tratamentos, os linfócitos foram coletados e concentrados por centrifugação a 1500rpm por 5 minutos, a 4°C, e o sedimento ressuspendido em meio RPMI-1640 completo. Os linfócitos tratados foram depositados em lâminas de vidro após centrifugação. As lâminas foram preparadas em citocentrífuga (modelo Cytofuge2-StatSpin) a 1300rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e fixadas em solução de paraformaldeído a 4%.

4.15. Detecção de apoptose pela coloração com Laranja de Acridina

As lâminas, após fixadas, foram coradas pela Laranja de Acridina SIGMA[®]. Foram adicionados 30µL de solução de Laranja de Acridina SIGMA[®] (10mg/mL) sobre cada lâmina, cobrindo-a com uma lamínula. Imediatamente, fez-se a leitura em microscópio de fluorescência de luz verde, com objetiva de 40X, contando-se as células apoptóticas e não

apoptóticas em 10 campos diferentes para cada lâmina. O número de células apoptóticas para cada tratamento, em cada data de coleta de cada grupo, foi expresso na forma de porcentagem.

4.16. Detecção de apoptose pela técnica de TUNEL

Utilizou-se neste experimento o APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit (INVITROGEN™)², que detecta a incorporação do BrdU aos sítios terminais do DNA fragmentado por meio do anticorpo *Alexa Fluor® 488 dye-labeled anti BrdU*, o qual é conjugado com fluoresceína e permite visualização diretamente por microscópio de fluorescência.

As lâminas confeccionadas foram processadas seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante do kit. As lâminas foram lavadas em solução de lavagem por cinco minutos e incubadas a 37°C por 60 minutos em câmara úmida, para ação da solução *DNA-Lable*, composta por tampão, TdTenzym, RD_UTP e água deionizada. Após incubação, as lâminas foram lavadas durante cinco minutos com o tampão de lavagem, por duas vezes. Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com o anticorpo *Alexa Fluor®*, por quatro horas, em temperatura ambiente, em câmara úmida protegida da luz. Depois, fez-se a incubação com a solução reveladora de *propidio iodide*, por 30 minutos, em temperatura ambiente, protegido da luz, recobrando-se as lâminas com uma lamínula de vidro. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência de luz verde, com objetiva de 40X, contando-se o número de linfócitos positivos à reação de TUNEL em cinco campos diferentes para cada lâmina. O número de células apoptóticas para cada tratamento, em cada data de coleta, para cada grupo, foi expresso na forma de porcentagem.

² APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit *with Alexa Fluor® 488 anti-BrdU* - Invitrogen Ltd.

4.17. Análise estatística

Com base nos valores dos números de linfócitos SBm7462-reativos obtidos após 10 dias de cultivo, para cada data de coleta, foram ajustadas regressões para cada grupo, utilizando-se o método quasi-Newton do programa STATISTCA versão 6.0 (STATSOFT, 1996). Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, no coeficiente de determinação e no comportamento do fenômeno em estudo.

As médias obtidas pelas técnicas de TUNEL, Laranja de Acridina e Azul de Tripán foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e posterior comparação pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Realizou-se comparação entre as médias obtidas em cada grupo (I e II), para cada época (nove, 15, 30 e 45 dias) em cada tratamento (I, II e III); comparação entre as médias de cada época, nos três tratamentos, para cada grupo individualmente; e comparação entre as médias obtidas nas épocas nove e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento e para cada grupo individualmente.

Para um melhor acompanhamento da ação das drogas, analisou-se a porcentagem de viabilidade celular no Tratamento II (linfócitos T SBm7462-reativos + θ peritoneais + peptídeo sintético SBm7462 + Droga) após diferentes horas, para cada droga em particular, em ambos os grupos. As médias obtidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e posterior comparação pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias obtidas em cada grupo (I e II) foram comparadas para cada época (nove, 15, 30 e 45 dias), nas diferentes horas, e, compararam-se as médias de cada época, nas diferentes horas, em cada grupo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sistemas para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 1993).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados do teste de ELISA

O quadro 2 apresenta as médias de absorvância óptica obtidas no ELISA indireto das amostras em duplicatas de cada um dos cinco animais eutanasiados em cada data de coleta, para cada grupo imunizado com o peptídeo sintético SBm7462.

A leitura das amostras foi feita em leitor de ELISA a 492nm e, para discriminar o ponto de corte entre positivo e negativo, utilizou-se a média dos valores de absorvância dos controles negativos (0,188), acrescida de dois desvios-padrão (0,0078951). O ponto de corte (PC) estabelecido foi 0,203 sendo os valores acima deste considerados como positivos.

Para a data de coleta do dia 9, somente um animal do grupo I foi positivo e no grupo II dois animais foram positivos. Para as datas 15 e 30, somente o grupo II apresentou animais com reação positiva em duas e uma amostras, respectivamente. Na coleta do dia 45, somente um animal do grupo I foi positivo, e no grupo II, três animais foram positivos.

Quadro 2. Número animais positivos para o ELISA indireto, para os grupo I e II, seguindo-se as datas de coleta.

Datas de coleta (dias)	Grupo I (oral)	Grupo II (nasal)
09	1	2
15	0	2
30	0	1
45	1	3
Total de animais positivos	2	8

5.2. Estabelecimento da linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos

O cultivo celular a partir da suspensão de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético SBm7462, proporcionou culturas celulares formadas por populações de células homogêneas, as quais proliferaram ativamente em suspensão. Em esfregaços confeccionados com essas células e corados por Giemsa, observaram-se células com o formato arredondado e com características fenotípicas de linfócitos, tais como núcleo volumoso e citoplasma escasso.

5.3. Comprovação da natureza específica dos linfócitos T para o peptídeo sintético SBm7462.

As culturas celulares dos linfócitos T isolados de cada grupo imunizado, separadamente, após 10 dias de cultivo e acompanhando-se

as datas de coleta (nove, 15, 30 e 45 dias após a primeira imunização), a partir de uma concentração celular inicial de 2×10^6 células, apresentaram proliferação e reprodutibilidade “*in vitro*”.

Os valores obtidos experimentalmente e as curvas obtidas por análise de regressão, do número de linfócitos T SBm7462-reativos, nos grupos I e II, em função do tempo, apresentaram um comportamento cúbico, seguindo a equação $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, conforme mostra a figura 1.

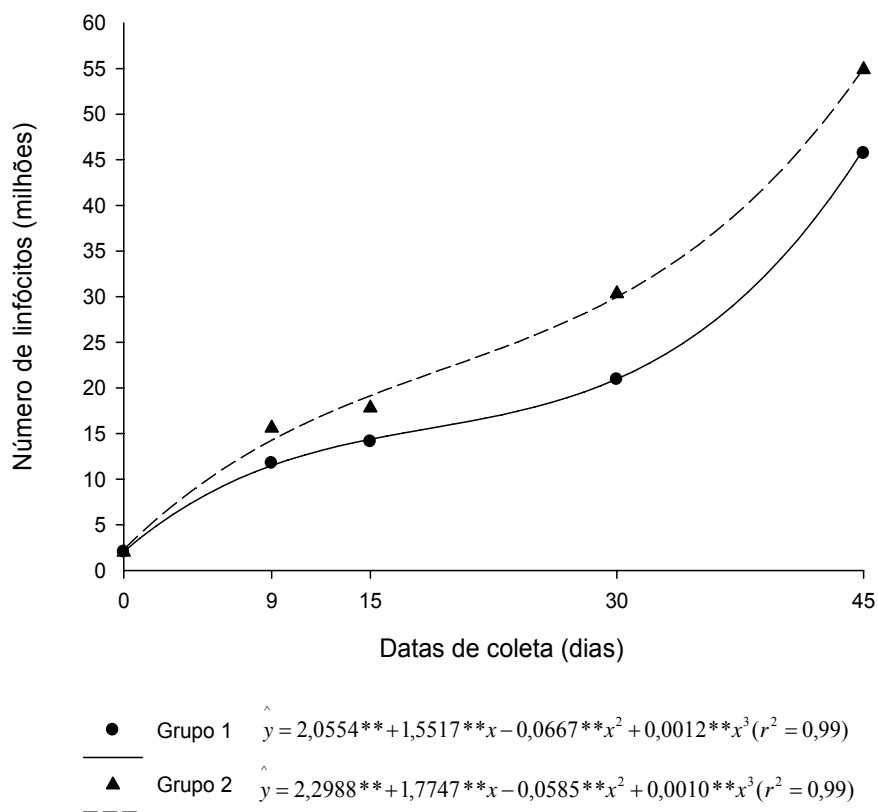


Figura 1. Curvas de regressão do número de linfócitos T SBm7462-reativos (número de linfócitos em milhões), nos grupos I e II, em função do tempo.

Observa-se na figura 1 que houve aumento do número de linfócitos, para os grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, sendo que ocorreu maior proliferação nas datas de coleta após a segunda imunização dos animais.

Para todas as datas de coleta, o grupo II (imunização nasal) apresentou uma maior proliferação celular “*in vitro*”, após o estímulo com o peptídeo sintético SBm7462, estatisticamente significativa ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.4. Efeito das drogas indutoras da AICD

5.4.1. Mitramicina

Os valores das médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos, por meio da técnica do Azul de Tripán, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com mitramicina estão representados no quadro 3.

Para as datas de coleta 30 e 45, no tratamento II, o grupo I apresentou um valor médio de porcentagem de viabilidade celular maior que o grupo II, indicando que no grupo II ocorreu um maior número de morte celular após a época 30 dias, que corresponde a nove dias após a segunda imunização.

As diferenças estatísticas observadas nas comparações das médias entre os três tratamentos, para cada época, nos dois grupos, permite observar que ocorreu uma maior indução da morte celular nos tratamentos onde a droga mitramicina foi administrada (tratamentos II e III). Os tratamentos I, II e III apresentaram diferenças entre si para ambos os grupos.

Quadro 3. Médias de porcentagem de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com Mitramicina, pela técnica do Azul de Tripán.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	96,12 A a a	95,65 A a a
	15	88,81 A a a	88,80 A a a
	30	66,67 A a b	66,67 A a b
	45	64,79 A a b	62,38 A a b
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 Mitramicina	9	82,22 A b a	82,56 A b a
	15	63,73 A b a	63,98 A b a
	30	51,18 A b b	51,30 A b b
	45	36,84 A b b	38,78 A b b
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Mitramicina	9	49,33 A c a	49,21 A c a
	15	48,72 A c a	44,54 A c a
	30	42,49 A c b	36,84 B c b
	45	37,34 A b b	31,67 B c b

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

No tratamento I houve o reconhecimento do peptídeo pelas células e indução da AICD dos linfócitos T SBm7462-reativos, que aumentou progressivamente com o tempo, seguindo as datas de coleta após as imunizações.

O tratamento II, no qual houve o estímulo de indução dos linfócitos T por meio do peptídeo sintético e a ação da droga mitramicina, foi o tratamento onde o número médio de porcentagem de viabilidade celular foi menor, indicando que ocorreu tanto morte celular por AICD (por

reconhecimento do peptídeo pelos linfócitos T SBm7462-reativos), como pela ação da droga.

No tratamento III, houve morte celular por ação da droga; porém, esse número foi menor quando comparado com o tratamento II, onde ocorreu ação da droga e o estímulo de indução pelo peptídeo.

Quando comparadas as médias de porcentagem de viabilidade celular entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento, para os dois grupos individualmente, observou-se que houve diferença estatística entre as médias das épocas, sendo que os valores médios nas épocas 30 e 45 dias foram sempre os menores quando comparados com as épocas 9 e 15 dias, para todos os três tratamentos, indicando que houve um maior número de morte celular nas culturas após a segunda data de imunização.

No quadro 4 estão representadas as médias da porcentagem de viabilidade dos linfócitos T SBm7462-reativos cultivados no tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com mitramicina.

Não houve diferença estatística entre as médias dos valores de porcentagem de viabilidade celular nos grupos I e II, exceto para os 30 e 45 dias após 72 horas de estímulo com a droga, o que já foi discutido previamente.

Com relação aos valores de porcentagem de viabilidade celular para cada época (9, 15, 30 e 45 dias) nas três diferentes horas (24, 48 e 72), pode-se observar que houve diferença estatística entre as médias após 24 horas, quando comparadas com as médias de 48 e 72 horas. A diminuição no valor da viabilidade celular, observado estatisticamente, indica que a morte celular ocorre após 24 horas de contato das culturas celulares com a droga mitramicina; porém, o número de mortes se intensificou após 48 horas, e os menores valores de porcentagem de viabilidade celular ocorreram após 72 horas desse contato.

Quadro 4. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos, no tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Mitramicina, pela técnica do Azul de Tripán.

HORAS	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
24	9	81,13 A a	81,82 A a
	15	64,66 A a	71,84 A a
	30	48,81 A a	55,36 A a
	45	46,33 A a	48, 72 A a
48	9	45,68 A b	44,98 A b
	15	44,78 A b	43,69 A b
	30	42,82 A b	42,49 A b
	45	40,77 A b	41,11 A b
72	9	49,33 A b	49,21 A b
	15	48,72 A b	44,54 A b
	30	42,49 A b	36,84 B c
	45	37,34 A c	31,67 B c

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nas diferentes horas, dentro de cada grupo.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica do Laranja de Acridina, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com mitramicina estão representados no quadro 5.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos, exceto para a época 9, no tratamento III.

Quadro 5. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com Mitramicina, pela técnica do Laranja de Acridina.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	18,70 A b a	18,02 A b a
	15	17,44 A b a	12,88 A b b
	30	15,64 A c a	17,86 A c a
	45	23,48 A c a	23,63 A c a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 Mitramicina	9	22,72 A b b	20,40 A b b
	15	36,62 A b b	35,62 A b b
	30	31,01 A b a	32,76 A b a
	45	62,89 A b a	65,83 A b a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Mitramicina	9	37,50 A a a	32,81 B a b
	15	38,17 A a b	39,65 A a b
	30	41,46 A a a	42,86 A a a
	45	72,28 A a a	72,83 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

As diferenças estatísticas observadas nas comparações das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos, permite observar que ocorreu um maior efeito da droga mitramicina, induzindo a morte celular, nos tratamentos onde ela foi administrada (tratamentos II e III), sendo que no tratamento III foi o que apresentou as maiores das médias de porcentagem de células apoptóticas.

Quando comparadas as médias de porcentagem de células apoptóticas entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada

tratamento, para os dois grupos individualmente, observou-se que houve diferença estatística entre as médias das épocas 9 e 30, no tratamento I, no grupo II, entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, nos tratamentos II e III, para ambos os grupos, sendo que os valores médios nas épocas 30 e 45 dias foram sempre os maiores, para todos os três tratamentos, indicando que houve um maior número de morte celular as culturas celulares coletadas após a segunda data de imunização.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica de TUNEL, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com mitramicina estão representados no quadro 6.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos.

As diferenças estatísticas observadas nas comparações das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos, permite observar que ocorreu um maior efeito da droga mitramicina, induzindo a morte celular, nos tratamentos onde ela foi administrada (tratamentos II e III), sendo que o tratamento III foi o que apresentou as maiores das médias de porcentagem de células apoptóticas.

Quando comparadas as médias de porcentagem de células apoptóticas entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento, para os dois grupos individualmente, observou-se que houve diferença estatística entre as médias das épocas 9 e 30, no tratamento I, no grupo II, entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, nos tratamentos II e III, para ambos os grupos, sendo que os valores médios nas épocas 30 e 45 dias foram sempre os maiores, para todos os três tratamentos, indicando que houve um maior número de morte celular as culturas celulares coletadas após a segunda data de imunização.

Quadro 6. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 72 horas de estímulo com Mitramicina, pela técnica de TUNEL.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	12,70 A b a	13,12 A b a
	15	15,24 A b a	16,28 A b b
	30	16,20 A c a	17,63 A c a
	45	19,45 A c a	18,38 A c a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 Mitramicina	9	22,35 A a b	20,40 A a b
	15	25,26 A a b	26,51 A a b
	30	31,10 A b a	32,54 A b a
	45	42,93 A b a	45,92 A b a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Mitramicina	9	24,25 A a b	22,14 A a b
	15	29,26 A a b	30,56 A a b
	30	41,35 A a a	43,79 A a a
	45	52,28 A a a	54,93 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

5.4.2. Cicloheximide

Os valores das médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos, por meio da técnica do Azul de Tripán, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com a droga cicloheximide estão representados no quadro 7.

O grupo II, para a data de coleta 45 dias, nos tratamento II e III, apresentou valores médios de porcentagem de viabilidade celular diferentes estatisticamente e menores do que os do grupo I, indicando

que no grupo II ocorreu um maior número de morte celular após a época 45 dias, que corresponde a 15 dias após a segunda imunização.

Quadro 7. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com Cicloheximide, pela técnica do Azul de Tripán.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	57,84 A a b	50,99 A a b
	15	73,85 A a b	71,90 A a b
	30	70,45 A a a	72,13 A a a
	45	94,40 A a a	94,61 A a a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 CHX	9	44,09 A b a	42,87 A b a
	15	36,19 A c b	33,33 A b b
	30	37,75 A b b	33,98 A c b
	45	71,52 A b a	66,88 B b a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais CHX	9	57,33 A a b	62,86 A a a
	15	50,84 A b b	54,64 A b b
	30	69,41 A a a	62,39 A b a
	45	80,01 A b a	73,38 B b a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

No tratamento I houve o reconhecimento do peptídeo pelas células e indução da AICD dos linfócitos T SBm7462-reativos. No tratamento III, houve morte celular por ação da droga cicloheximide; porém, quando comparada as médias desse tratamento com as do tratamento I, ocorreu

diferença significativa somente para as datas 15 e 45 dias, e o maior número de mortes ocorreu no tratamento onde a droga foi administrada.

O tratamento II, no qual houve o estímulo de indução dos linfócitos T por meio do peptídeo sintético e a ação da droga cicloheximide, foi o tratamento onde o número médio de porcentagem de viabilidade celular foi menor, indicando que ocorreu tanto morte celular por AICD (por reconhecimento do peptídeo pelos linfócitos T SBm7462-reativos), como pela ação da droga.

Na comparação entre os valores médios porcentagem de viabilidade celular de cada época (9, 15, 30 e 45 dias) entre os tratamentos (I, II e III), observou-se diferença estatística em todas as datas de coleta em todos os três tratamentos, nos grupos I e II, separadamente. Os maiores valores foram encontrados no tratamento I, no qual a droga não foi ministrada. O tratamento II, onde a droga cicloheximide foi administrada juntamente com o peptídeo sintético, foi onde se obtiveram os menores valores médios de porcentagem de viabilidade celular.

Comparando-se as datas de coleta no tratamento I, pode-se observar que houve diferença estatística entre as médias dos dias 9 e 30 e 15 e 45, para ambos os grupos. Os maiores valores foram aos 45 dias, que corresponde a 15 dias após a segunda data de imunização.

Para ambos os grupos, no tratamento II, as diferenças significativas observadas na comparação entre as datas de coletas indicam que houve uma diminuição na viabilidade celular na época 30, que corresponde a nove dias após a segunda imunização.

No tratamento III houve diferença significativa entre as datas 9 e 30 e 15 e 45 dias para o grupo I e entre 15 e 45 dias para o grupo II.

No quadro 8 estão representadas as médias da porcentagem de viabilidade dos linfócitos T SBm7462-reativos cultivados no tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com a droga cicloheximide.

A diferença observada em todas as datas de coleta (9, 15, 30 e 45), em ambos os grupos, mostra que os menores valores de porcentagem de viabilidade celular se encontram após 10 horas, indicando que após esse período de contato com a droga cicloheximide ocorreu um maior número de morte celular.

Não houve diferença significativa entre os grupos I e II em nenhuma das datas de coleta, para ambas as horas, exceto para o dia 45, para hora 10, já discutido previamente.

Quadro 8. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos do tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Cicloheximide, pela técnica do Azul de Tripán.

HORAS	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
05	9	51,22 A a	50,82 A a
	15	54,64 A a	51,55 A a
	30	67,21 A a	65,67 A a
	45	89,01 A a	87,65 A a
10	9	44,09 A b	42,87 A b
	15	36,19 A b	33,33 A b
	30	37,75 A b	33,98 A b
	45	71,52 A b	66,88 B b

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nas diferentes horas, dentro de cada grupo.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica de Laranja de Acridina, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com a droga cicloheximide estão representados no quadro 9.

Quadro 9. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com Cicloheximide, pela técnica do Laranja de Acridina.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	8,80 A b a	9,27 A b a
	15	7,56 A b a	10,90 A b a
	30	7,90 A a a	7,47 A a a
	45	11,66 A a a	10,27 A b a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 CHX	9	11,95 A ab a	13,04 A ab a
	15	17,16 A a a	16,85 A a a
	30	13,48 A a a	12,11 A a a
	45	12,51 A a a	14,73 A ab a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais CHX	9	17,23 A a a	16,13 A a a
	15	15,92 A ab a	15,88 A a a
	30	13,00 A a a	12,55 A a a
	45	16,20 A a a	16,75 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos.

Na comparação das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos, não houve diferença estatística para a maioria das médias, exceto para as das épocas 9 e 45, em ambos os grupos, com o tratamento I apresentando os menores valores de porcentagem de células apoptóticas.

Quando comparadas as médias de porcentagem de células apoptóticas entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento, para os dois grupos individualmente, também não observou-se que houve diferença estatística entre as médias nos diferentes tratamentos.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica de TUNEL, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com a droga cicloheximide estão representados no quadro 10.

Quadro 10. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 10 horas de estímulo com Cicloheximide, pela técnica de TUNEL.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	8,98 A b a	9,18 A b a
	15	8,12 A b a	9,02 A a a
	30	10,29 A b a	10,27 A a a
	45	11,36 A a a	12,13 A a a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 CHX	9	9,51 A b a	9,14 A b a
	15	10,16 A a a	11,65 A a a
	30	12,15 A a a	12,87 A a a
	45	11,13 A a a	13,73 A ab a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais CHX	9	14,17 A a a	15,63 A a a
	15	9,58 A a b	9,98 A a b
	30	13,98 A a a	12,65 A a a
	45	14,60 A a a	15,25 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos.

Na comparação das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos, não houve diferença estatística para a maioria das médias, exceto para as das épocas 9, 15 e 30, no grupo I e 9 e 15 no grupo II. Para ambos os grupos, os tratamentos I e II apresentaram os menores valores de porcentagem de células apoptóticas.

Quando comparadas as médias de porcentagem de células apoptóticas entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento, para os dois grupos individualmente, somente observou-se que houve diferença estatística entre as médias dos dias 15 e 45, no tratamento III, em ambos os grupos.

5.5. Efeito das drogas inibidoras da AICD

5.5.1. Benzamida ribósido

Os valores das médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos, por meio da técnica do Azul de Tripán, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com a droga benzamida ribósido, estão representados no quadro 11.

Tanto no tratamento II quanto no tratamento III, para a época 9 houve diferença significativa entre os grupos I e II, sendo que as maiores médias foram as do grupo I.

Para as médias de porcentagem de viabilidade celular das coletas dos dias 9 e 30 não houve diferença estatística entre os tratamentos I e III, mas ambos diferiram do tratamento II. O dia 9 do tratamento I obteve a menor média e o dia 30 a maior. Para o dia 15, todos os tratamentos

diferiram entre si. As maiores médias foram observadas nos tratamentos II e III, nos quais havia a presença da droga.

As diferenças significativas observadas nos três tratamentos, em ambos os grupos, quando comparadas as datas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, mostram que os maiores valores foram os dos dias 9 e 45.

Quadro 11. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica do Azul de Tripán.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	83,93 A b a	81,67 A a a
	15	59,78 A c b	57,39 A c b
	30	68,93 A b b	67,64 A b b
	45	91,64 A a a	90,53 A a a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 DRB	9	86,21 A b a	77,55 B b a
	15	63,30 A b b	61,09 A b b
	30	75,86 A a b	72,50 A a a
	45	93,33 A a a	91,94 A a a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais DRB	9	94,04 A a a	81,67 B b a
	15	92,13 A a a	92,86 A a a
	30	69,74 A b b	70,64 A a b
	45	94,27 A a a	91,67 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

No quadro 12 estão representadas as médias da porcentagem de viabilidade dos linfócitos T SBm7462-reativos cultivados no tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com a droga benzamida ribósido.

Para as comparações das médias entre os grupos, o grupo II apresentou diferença estatística para as médias dos dias 9 e 15, após 5 horas de tratamento com DRB.

Quadro 12. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos do tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica do Azul de Tripán.

HORAS	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
05	9	88,19 A a	80,30 B b
	15	91,24 A a	88,64 B a
	30	74,42 A a	74,19 A a
	45	91,04 A a	90,52 A a
10	9	89,71 A a	88,98 A a
	15	53,60 A c	52,46 A c
	30	67,06 A b	66,78 A b
	45	93,94 A a	91,25 A a
15	9	86,21 A a	77,55 B b
	15	63,30 A b	61,09 A b
	30	75,86 A a	72,50 A a
	45	93,33 A a	91,94 A a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nas diferentes horas, dentro de cada grupo.

No grupo II houve diferença entre as médias do dia 9 para as três diferentes horas. A média obtida na coleta do dia 15 apresentou diferença estatística para os três tratamentos (5, 10 e 15 horas).

Para ambos os grupos as médias do dia 30 dos tratamentos 5 e 15 horas difere do tratamento 10 horas. Pode-se inferir que mesmo a droga DRB atuando de forma a inibir a morte celular, esta ainda ocorreu.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica de Laranja de Acridina, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com a droga DRB estão representados no quadro 13.

Quadro 13. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica do Laranja de Acridina.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	15,57 A a a	17,01 A a a
	15	12,80 A a a	13,39 A a a
	30	15,58 A a a	15,82 A a a
	45	10,99 A a a	12,01 A a a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 DRB	9	12,53 A ab a	14,66 A ab a
	15	9,96 A a a	10,27 A ab a
	30	14,90 A a a	15,64 A a a
	45	12,78 A a a	13,28 A a a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais DRB	9	9,52 A b a	11,07 A b a
	15	10,86 A a a	12,80 A a a
	30	14,28 A a a	16,81 A a a
	45	14,18 A a a	14,30 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos. Na comparação das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos, não houve diferença

estatística para a maioria das médias, exceto para a época 9, em ambos os grupos, do tratamento III, que apresentou a menor média de porcentagem de células apoptóticas, sendo que o tratamento II não diferiu do tratamento I e nem do III. Então os tratamentos I e III diferiram entre si.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica de TUNEL, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com a droga Benzamida Ribósido estão representados no quadro 14.

Quadro 14. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 15 horas de estímulo com Benzamida Ribósido, pela técnica de TUNEL.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	09,02 A a a	10,71 A a a
	15	11,20 A a a	10,98 A a a
	30	12,64 A a a	12,22 A a a
	45	11,25 A a a	11,12 A a a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 DRB	9	11,73 A a b	10,98 A a b
	15	12,96 A a a	12,67 A a a
	30	14,90 A a a	15,68 A a a
	45	12,31 A a a	12,82 A a a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais DRB	9	9,56 A a b	10,17 A a b
	15	10,23 A a a	11,20 A a a
	30	13,30 A a a	14,18 A a a
	45	12,48 A a a	12,43 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos e nem na comparação das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos.

Quando comparadas as médias de porcentagem de células apoptóticas entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento, para os dois grupos individualmente, somente observou-se diferença estatística entre as médias de 9 e 30 dias, tratamentos II e III, em ambos os grupos.

5.5.2. Ciclosporina A

Os valores das médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos, por meio da técnica do Azul de Tripán, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com a droga Ciclosporina A estão representados no quadro 15.

Houve diferença estatística entre os grupos I e II para as médias do dia 45, no tratamento I e do dia 15 nos tratamentos II e III.

Houve diferença estatística entre as datas de coletas, nos três tratamentos diferentes, em ambos os grupos. As maiores médias de porcentagem de viabilidade celular se encontram no tratamento II.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos I e III, para todas as épocas do grupo I e também para a maioria das épocas do grupo II. Ambos os tratamentos diferiram do tratamento II.

No tratamento I houve o reconhecimento do peptídeo pelas células e indução da AICD dos linfócitos T SBm7462-reativos. Nos tratamentos onde a droga CsA foi aplicada (tratamentos I e II) ocorreu morte celular, sendo os valores observados muito próximos daqueles do tratamento

onde a droga não foi administrada e a morte celular se deu somente por AICD.

Quadro 15. Médias das porcentagens de viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com Ciclosporina A, pela técnica do Azul de Tripán.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	57,89 A b a	57,63 A a a
	15	61,41 A b b	61,50 A b b
	30	56,01 A b a	57,69 A b a
	45	88,28 A b a	85,16 B b a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 CsA	9	66,29 A a b	67,47 A a b
	15	77,65 A a b	72,16 B a b
	30	81,11 A a a	80,96 A a a
	45	89,72 A a a	89,98 A a a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais CsA	9	58,82 A b b	59,62 A a b
	15	68,79 A b b	66,35 B b b
	30	76,09 A b a	78,41 A a a
	45	93,37 A b a	92,26 A ab a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

No tratamento I houve diferença entre os dias 15 e 45, para ambos os grupos. Nos tratamentos II e III, houve diferença entre 9 e 30 dias e entre 15 e 45 dias, para ambos os grupos, sendo que as maiores médias foram observadas em 30 e 45 dias.

No quadro 16 estão representadas as médias da porcentagem de viabilidade dos linfócitos T SBm7462-reativos cultivados no tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com a droga Ciclosporina A.

Houve diferença estatística entre os tratamentos 12 e 24 horas para os dias 9 e 45, em ambos os grupos e para o dia 15 somente no grupo I.

Quadro 16. Viabilidade de linfócitos T SBm7462-reativos do tratamento II, em diferentes horas após o estímulo com Ciclosporina A, pela técnica do Azul de Tripán.

HORAS	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de viabilidade)	Grupo II (% de viabilidade)
12	9	56,94 A b	52,05 A b
	15	81,88 A b	82,52 A a
	30	84,26 A a	80,08 A a
	45	88,07 A a	83,04 A b
24	9	66,29 A a	67,47 A a
	15	77,65 A a	72,16 B a
	30	81,11 A a	80,96 A a
	45	89,72 A a	89,98 A a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nas diferentes horas, dentro de cada grupo.

As maiores médias de porcentagem de viabilidade celular foram observadas em 24 horas, podendo-se inferir que a ação da droga Ciclosporina A como inibidora da morte celular ocorreu mais evidentemente após 12 horas.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica do Laranja de Acridina, nos diferentes tratamentos e

épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com a droga Ciclosporina A estão representados no quadro 17.

Quadro 17. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com Ciclosporina A, pela técnica do Laranja de Acridina.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	11,05 A b a	11,37 A b b
	15	10,28 A b a	12,27 A b a
	30	12,92 A b a	15,69 B b a
	45	13,12 A b a	14,89 A b a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 CsA	9	22,77 A a a	23,48 A a a
	15	16,87 A ab b	19,15 A a b
	30	26,05 A a a	25,61 A a a
	45	29,47 A a a	30,08 A a a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais CsA	9	19,59 A a b	20,91 A a b
	15	22,29 A a b	24,97 A a b
	30	27,27 A a a	25,29 A a a
	45	26,65 A a a	28,75 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos.

Na comparação das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos, houve diferença estatística para todas as médias, em ambos os grupos, sendo que o tratamento II não diferiu do tratamento III, mas ambos diferiram do tratamento I, que apresentou as menores médias.

Quando comparadas as médias de porcentagem de células apoptóticas entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento, para os dois grupos individualmente, somente houve diferença estatística entre as médias de 9 e 30, no tratamento I e entre 15 e 45 tratamento II e entre 9 e 30 dias e 15 e 45 dias para o tratamento III, sendo as menores médias as das épocas 9 e 15.

Os valores das médias de porcentagem de células apoptóticas, por meio da técnica de TUNEL, nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com a droga Ciclosporina A estão representados no quadro 18.

Não houve diferença estatística entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos e nem na comparação das médias em cada época, entre os três tratamentos, nos dois grupos, exceto para a época 30 do tratamento I que diferiu do tratamento III, mas não do II.

Quando comparadas as médias de porcentagem de células apoptóticas entre as épocas 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, em cada tratamento, para os dois grupos individualmente, somente observou-se diferença estatística entre as médias de 9 e 30 dias, tratamentos II e III, em ambos os grupos.

Quadro 18. Médias de porcentagem de células apoptóticas nos diferentes tratamentos e épocas de coletas, após 24 horas de estímulo com Ciclosporina A, pela técnica de TUNEL.

TRATAMENTO	Datas de coleta (dias)	Grupo I (% de células apoptóticas)	Grupo II (% de células apoptóticas)
I Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462	9	9,65 A a a	9,15 A a a
	15	9,88 A a a	10,02 A a a
	30	11,28 A a a	10,98 A b a
	45	10,62 A a a	11,29 A a a
II Linf. T SBm7462-r θ peritoneais Peptídeo SBm7462 CsA	9	8,36 A a b	9,18 A a b
	15	10,37 A a a	10,15 A a a
	30	13,16 A a a	14,51 A a a
	45	10,97 A a a	11,12 A a a
III Linf. T SBm7462-r θ peritoneais CsA	9	8,79 A a b	9,35 A a b
	15	10,22 A a a	11,27 A a a
	30	12,27 A a a	12,68 A ab a
	45	11,34 A a a	11,79 A a a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre os grupos. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação de cada época, nos três tratamentos dentro de cada grupo. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas e itálicas, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as médias de 9 e 30 dias e 15 e 45 dias, dentro de cada tratamento, dentro de cada grupo.

6. DISCUSSÃO

O ELISA indireto aqui usado já havia apresentado bons resultados em trabalhos anteriores com o peptídeo SBm7462, devido à sua boa sensibilidade e especificidade (PIMENTEL, 2002; PATARROYO *et al.*, 2002; SALES-JUNIOR *et al.*, 2005). Tais autores observaram que ocorreu um aumento nos valores de absorbância após a segunda imunização com o peptídeo.

A não detecção de níveis significativos de imunoglobulinas pode ser pelo fato de que a resposta após a primeira inoculação corresponde a uma resposta imune primária, na qual se tem a estimulação de clones de linfócitos B reativos ao peptídeo pela primeira vez, com a produção indetectável de imunoglobulinas (PORTELA, 2000). Pode-se considerar, também, que somente duas imunizações não foram suficientes para induzir uma resposta imune mais eficiente, com altos níveis de imunoglobulinas, sendo necessário a realização de mais imunizações. Alguns autores encontraram um pico de IgG após a terceira imunização como o peptídeo sintético SBm7462 (PORTELA, 2000; PIMENTEL, 2002; SALES-JUNIOR *et al.*, 2005).

Alguns autores sugerem que a imunização por via oral requer doses maiores e administrações repetidas, devido à instabilidade dos

antígenos e o ambiente proteolítico e ácido do estômago (HIRABAYASHI *et al.*, 1990). Outros autores também citam que a imunização oral é um procedimento que requer uma quantidade maior de antígenos para poder ultrapassar a barreira do trato gastrintestinal (MOWAT, 1994; KE & KAPP, 1996; SUN *et al.*, 1999; GABITUS, 2001). Muitos antígenos são pouco imunogênicos quando administrados por via mucosa, provavelmente porque falham ao interagir efetivamente com o tecido linfóide associado às mucosas (AIZPURUA & RUSSELL-JONES, 1988). LEHNER *et al.* (1993) destacaram a influência das rotas de imunização no repertório de epítomos induzidos, mostrando sua importância para o desenho de peptídeos sintéticos.

As vias de mucosa oral e nasal podem ser consideradas vias alternativas para a imunização com o peptídeo sintético SBm7462, porém, a imunização por essas vias parece requer um maior número de doses para induzir uma resposta imune com altos níveis de imunoglobulinas. A via nasal foi a apresentou melhores resultados para a imunização com o peptídeo sintético SBm7462.

A natureza específica dos linfócitos T foi confirmada pelo aumento no número de células após re-estimulação “*in vitro*” com o peptídeo sintético SBm7462, podendo-se considerar esses como clones afins, uma vez que os linfócitos selecionados para gerar a memória imunológica possuem uma alta afinidade pelo antígeno, após um contato primário (SPRENT, 1997).

SANCHEZ (2004) utilizando da mesma metodologia também obteve uma linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos após cultura e re-estímulo “*in vitro*” de linfócitos isolados de animais imunizados por via subcutânea, com somente duas inoculações do peptídeo sintético SBm7462.

Como observado na figura 1, houve aumento do número de linfócitos, para os grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, sendo que ocorreu maior proliferação nas datas de coleta após a segunda

imunização dos animais e para todas as datas de coleta, o grupo II (imunização nasal) apresentou uma maior proliferação celular “*in vitro*”, após o estímulo com o peptídeo sintético SBm7462, estatisticamente significativa ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

HIRABAYASHI *et al.* (1990) propõem que a rota nasal é mais viável que a oral, pois o trato respiratório é um ambiente menos ácido e proteolítico e também menos colonizado por microrganismos. A maior proliferação de linfócitos T de memória obtidos neste trabalho com os animais imunizados por via nasal corrobora os estudos desses autores que mostraram que esta via é uma rota viável para a administração de antígenos. LEHNER *et al.* (1993) destacaram a importância da rota de imunização para o desenho de peptídeos sintéticos usados para imunização via nasal.

A AICD ocorre nas células T após o reconhecimento do antígeno pelo TCR ou por exposição a mitógenos (GREEN & SCOTT, 1994), e as células T que sofrem AICD apresentam as mudanças morfológicas típicas associadas à apoptose (JANSSEN *et al.*, 2000), o que foi observado tanto para técnica de Laranja de Acridina como pela técnica de TUNEL.

OWEN-SCAUB *et al.* (1992) demonstraram que isolados frescos de linfócitos T esplênicos são relativamente resistentes à indução de AICD desenvolvida via TCR, embora a pré-ativação via complexo TCR/CD3 as torna susceptíveis. Como a AICD de células T depende do estado de ativação da célula, células T ativadas recentemente são resistentes à indução de apoptose, e esta resistência inicial precede a um posterior fenótipo sensível (SCAFFIDI *et al.*, 1999). Sendo assim, pode-se observar que independente da técnica aplicada (Azul de Tripán, Laranja de Acridina ou TUNEL) e dos tipos de tratamento (I, II e III), os valores de morte celular apresentaram-se de forma crescente, acompanhando-se as datas de coleta. Os valores de morte celular obtidos na data 09 dias sempre foram menores, quando comparados com os valores da data 45 dias, onde sempre ocorreu um maior valor de morte celular.

No presente trabalho não se teve como objetivo comparar as diferentes técnicas de determinação da porcentagem de viabilidade celular (Azul de Tripán) e de determinação da porcentagem de células apoptóticas (Laranja de Acridina e TUNEL), pois cada uma segue uma metodologia distinta. Também não se comparou a ação das drogas entre si, pois cada uma também age de forma diferente no maquinário celular e, em tempos de exposições diferentes.

Nos tratamentos onde a droga mitramicina foi administrada ocorreu maior indução da morte celular e o grupo I apresentou maior porcentagem de viabilidade celular que o grupo II, indicando que no grupo II ocorreu um maior número de morte celular após a época 30 dias, que corresponde a nove dias após a segunda imunização. Para ambos os grupos, houve um maior número de morte celular para as coletas realizadas após a segunda data de imunização (épocas 30 e 45 dias).

Houve o reconhecimento do peptídeo pelas células e ocorreu a indução da AICD dos linfócitos T SBm7462-reativos, aumentando progressivamente com o tempo, após as imunizações. Nos tratamentos onde houve o estímulo de indução dos linfócitos T por meio do peptídeo sintético e a ação da droga mitramicina, a porcentagem de morte celular foi maior quando comparado com o tratamento onde houve somente o estímulo pelo peptídeo, indicando que ocorreu tanto morte celular por AICD (por reconhecimento do peptídeo pelos linfócitos T SBm7462-reativos), como pela ação da droga. Houve também morte celular somente por ação da droga mitramicina; porém, em número menor quando comparado com os tratamentos onde ocorreu ação da droga e o estímulo de indução pelo peptídeo.

A diminuição no valor da viabilidade celular foi observado estatisticamente após 24 horas de contato das culturas celulares com a droga mitramicina; porém, o número de mortes se intensificou após 48 horas, e os menores valores de porcentagem de viabilidade celular ocorreram após 72 horas desse contato.

A diminuição no valor da viabilidade celular e o aumento na porcentagem de mortes por apoptose observados estatisticamente nas culturas celulares com a droga mitramicina após 72 horas de contato indica que houve ação indutora da droga induzindo a apoptose.

RUIZ (1997) constatou que a partir de 8 horas de contato com a mitramicina já há uma redução nos níveis do mRNA de *c-myc*, que desaparece após 15 horas de tratamento, entretanto, o papel de *c-myc* na indução de apoptose parece ser dual, sendo dependente do tipo celular e do agente indutor. CHATTERJEE *et al.* (2001) descreveram a inibição da expressão do gene *c-myc* nas primeiras 24 horas de contato de culturas de neurônios com a droga mitramicina.

Em todos os tratamentos deste trabalho onde a droga mitramicina foi administrada ocorreu morte celular, provavelmente por inibição da expressão de *c-myc*. A expressão do gene *c-myc* é necessária para o processo de apoptose (EVAN *et al.*, 1992) e a função do c-Myc é requerida para AICD em células T (GENESTIER *et al.*, 1999). Foi demonstrado por alguns autores que a expressão de *c-myc* é fundamental para proteger as células da indução da apoptose (THULASI *et al.*, 1993; FISCHER *et al.*, 1994). HUEBER *et al.* (1997) reportaram que a apoptose induzida por *c-myc* requer a expressão de Fas e FasL.

Embora a síntese de macromoléculas seja considerada essencial para a morte celular por apoptose, considera-se que de acordo com o sistema celular utilizado experimentalmente e a presença de inibidores da síntese protéica pode levar à prevenção ou à estimulação da apoptose (LEMAIRE *et al.*, 1999).

SANCHEZ (2004) utilizando uma linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos obtidos de animais imunizados por via subcutânea, observou que a droga cicloheximide não induziu a morte celular, pois não houve diferença estatística entre os tratamentos ela foi administrada. RUIZ (1997) em seus estudos também constatou que CHX não bloqueou a indução de apoptose.

Os efeitos da CHX sobre a indução da apoptose leva a sugestão de que a maquinaria apoptótica pode ser constitutivamente expressa de uma forma latente, sob baixa restrição de proteínas ou de fatores anti-apoptóticos (LEMAIRE *et al.*, 1999).

Neste trabalho, houve o reconhecimento do peptídeo pelas células e ocorreu a indução da AICD dos linfócitos T SBm7462-reativos. Nos tratamentos onde a droga CHX foi administrada ocorreu maior indução da morte celular. O Tratamento III apresentou os maiores valores de porcentagem morte celular para ambos os grupos.

A CHX possivelmente agiu inibindo a síntese de proteínas celulares ou aumentando da expressão de Fas, pois em linfócitos T maduros, a apoptose induzida por falta de fatores de crescimento e a AICD são mediadas via caspases (DE ALBORÁN *et al.*, 2003) e, portanto, necessitam da expressão de FasL (HUEBER *et al.*, 1997). A AICD ocorre por mecanismos que envolvem o sistema Fas após estimulação do TCR (SCAFFIDI *et al.*, 1999).

Na presença de CHX ocorre uma diminuição progressiva da quantidade total de RNA em culturas celulares, provavelmente como reflexo da diminuição da viabilidade celular (EFRAT & KAEMPFER, 1984). Estudos realizados por SHI *et al.* (1989) mostraram que a síntese de proteínas é um pré-requisito para indução de apoptose em hibridomas de células T.

A dualidade dos efeitos da Cicloheximide já foi descrita por vários autores em hibridomas de células T (MARTIN *et al.*, 1990; MEISENHOLDER *et al.*, 1996; RUIZ, 1997), em cultivos primários de hepatócitos (BLOM *et al.*, 1999) e em neurônios (MAROTTA *et al.*, 2002), sendo que os mecanismos pelos quais a CHX induz a apoptose ainda não são bem entendidos.

TSUCHIDA *et al.* (2002) sugerem que dependendo da concentração de CHX, seus efeitos são diversos e freqüentemente não relacionados com a inibição da síntese de proteínas. A preservação da

morte celular na presença de CHX tem sido atribuída ao fato dela interferir em processos ativos, através da inibição da síntese de produtos de genes de morte, como também o aumento da expressão de moléculas envolvidas na via mitocondrial, incluído os Bcl-2.

A diminuição no valor da viabilidade celular foi observado estatisticamente neste trabalho após 10 horas de contato das culturas celulares com a droga CHX e observou-se que a data de coleta 42 dias apresentou os maiores valores de porcentagem de morte celular tanto após 05 como em 10 horas desse contato.

BLOM *et al.* (1999), utilizando cultura primária de hepatócitos e administração de CHX, observaram que a morte celular se iniciava a partir de 2 horas da adição de CHX, alcançando valores máximos após 4 horas em concentrações de 100 μ M, e constataram que não havia diferença na intensidade da morte celular com o uso de concentrações maiores.

Para ambos os grupos, os tratamentos onde a droga DRB foi administrada (tratamentos II e III) apresentaram as maiores médias de viabilidade, porém esses não diferiram dos tratamentos onde a droga não foi administrada, podendo-se inferir que mesmo quando a droga DRB foi administrada visando inibir a morte celular, esta ainda ocorreu.

Não houve diferença estatística também entre as médias de porcentagem de células apoptóticas nos grupos I e II, nas diferentes épocas de coleta, para os três tratamentos com DRB.

O DRB inibe a síntese de mRNA (LAUB, *et al.*, 1980; MARTIN *et al.*, 1998); porém, alguns trabalhos têm mostrado que o uso de DRB não inibe a morte por apoptose em algumas linhagens celulares (RUIZ, 1997) e, dependendo da dose administrada pode induzir um processo de apoptose dose-dependente (RAUKO *et al.*, 2001).

SANCHEZ (2004) já havia demonstrado que linfócitos T SBm7462-reativos apresentaram a AICD mediada por uma via independente da calcineurina, sob a qual a CsA deveria agir de forma inibitória, bem como também inibir a expressão de FasL (ANEL *et al.*, 1994).

No presente trabalho, não houve diferença estatística entre os tratamentos I e III, para todas as épocas do grupo I e também para a maioria das épocas do grupo II, porém, ambos os tratamentos diferiram do tratamento II. No tratamento I houve o reconhecimento do peptídeo pelas células e indução da AICD dos linfócitos T SBm7462-reativos.

Nos tratamentos onde a droga CsA foi aplicada (tratamentos I e II) ocorreu morte celular, sendo os valores observados muito próximos daqueles do tratamento onde a droga não foi administrada e a morte celular se deu somente por AICD, indicando que a CsA não foi eficaz na inibição da apoptose.

A CsA inibi a expressão de FasL pela inibição do fator de atividade nuclear (NF-AT - *nuclear factor of activated*) de células T (BRUNNER *et al.*, 1996; LATINIS *et al.*, 1997). Ela também pode bloquear a ativação e transcrição do gene da IL-2 (WIEDERRECHT *et al.*, 1993; RUIZ, 1997), como também a apoptose induzida a través do TCR (FRUMAN *et al.*, 1992). Entretanto NGUYEN & RUSSELL (2001) mostraram que algumas células T que expressaram altos níveis de FasL podem entrar em processo de AICD, enquanto que outras que expressam baixos níveis de FasL são sensíveis a AICD, sugerindo que a susceptibilidade da AICD não está correlacionada com a cinética de “*up*” ou “*down-regulation*” de FasL. Portanto, pode deduzir que a AICD induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 foi mediada por uma via independente da calcineurina e da cinética de regulação do FasL, não sendo expressivos os efeitos da droga ciclosporina A.

Em alguns dos métodos avaliados não houve diferença estatística entre os grupos, tal fato pode ter justificativa relacionada ao ato de imunização, pois quando os animais foram inoculados por via nasal, uma parte da vacina pode ter sido absorvida pelo BALT e outra parte pode ter sido incorporada pelas estruturas linfóides presentes na faringe e nas tonsilas, estruturas comuns às duas vias mucosas, tanto oral quanto nasal, podendo-se ainda considerar que no momento em que o animal

inalava a vacina administrada por via nasal, uma fração dela poderia ter sido aspirada pela via digestória, sendo posteriormente absorvida pelos constituintes do GALT, aceitando-se que a natureza dos linfócitos possua algumas características comuns com relação à resistência ou sensibilidade à AICD.

Os resultados observados neste trabalho após o tratamento com as diferentes drogas mostram que após o re-estímulo com o antígeno, houve respostas diferentes em relação à sensibilidade dos linfócitos à AICD. Como os linfócitos usam vários mecanismos para iniciar a morte celular, tanto os receptores de morte quanto o desequilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas são responsáveis pela morte dos linfócitos antígeno-específicos (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003). A re-estimulação com o antígeno marca as células de memória a expressarem altos níveis de FLIP, um inibidor de apoptose mediada por Fas, tornando as células resistentes à AICD. Também a alta expressão de CD43 nessas células contribui para sua resistência à apoptose via Fas (CHEN *et al.*, 2003).

CRITCHFIELD *et al.* (1995) afirmam que o estabelecimento de clones de células T não transformadas podem selecionar variantes que diferem daquelas presentes nos órgãos linfóides periféricos. ZHANG *et al.* (1997) comentam quem há diferenças na susceptibilidade à AICD entre clones de células Th1 e Th2 e que uma das desvantagens da seleção *in vitro* é justamente a obtenção de células que são relativamente resistentes a morte celular.

Conforme SANCHEZ (2004) já havia demonstrado em seu modelo experimental de cultura *in vitro* de linfócitos obtidos de camundongos BALB/c inoculados com o peptídeo sintético SBm7462 por via subcutânea, os linfócitos T SBm7462-reativos expressam constitutivamente a maquinaria necessária para a indução de apoptose após ativação com o peptídeo sintético. Pode-se observar que o peptídeo

sintético SBm7462 induz a AICD dos linfócitos T SBm7462-reativos, os quais são clones afins para este antígeno.

Deve-se considerar também que a AICD de linfócitos pode estar relacionada ao número de doses ou aplicações do imunógeno, à natureza do imunógeno e à via de inoculação, fatores que podem influenciar na cinética de uma resposta imune. Assim, mais estudos são necessários para avaliar a indução de apoptose em órgãos linfóides após a inoculação de imunógenos sintéticos, além do perfil de citocinas produzidas.

7. CONCLUSÕES

- As vias de mucosa, oral e nasal, podem ser consideradas vias alternativas para a imunização com o peptídeo sintético SBm7462.
- A via nasal foi a apresentou melhores resultados para a imunização com o peptídeo sintético SBm7462.
- Os linfócitos T SBm7462-reativos obtidos neste trabalho se comportam como linfócitos T de memória, clones altamente afins que proliferaram após o re-estímulo *in vitro*.
- Os linfócitos T SBm7462-reativos obtidos dos animais imunizados por via nasal apresentaram uma maior proliferação celular *in vitro*, após re-estimulação.
- Ocorreu indução da morte celular por inibição da expressão do *c-myc*, após estímulo via TCR e por ação da droga mitramicina.
- Ocorreu indução da morte celular por aumento da expressão de Fas, após estímulo via TCR e por ação da droga cicloheximide.
- A droga benzamida ribósido não inibiu a apoptose e AICD induzida pelo peptídeo sintético SBm7462.
- A AICD induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 foi mediada por uma via independente da calcineurina e da cinética de regulação do FasL, não sendo expressivos os efeitos da droga ciclosporina A.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D. W. K., LUCCIOLI, S. 2004. Mucosal immune responses. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. 18 (2): 387-404.
- AIZPURUA, H. J., RUSSELL-JONES, G. J. 1988. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. **Journal of Experimental Medicine**. 167:440-451.
- ALNEMRI, E. S., LIVINGSTON, D. J., NICHOLSON, D. W., SALVESEN, G., THORBERRY, N. A., WONG, W. W., YUAN, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell**. 87:171.
- ANDERSON, E. L., NEWMAN, F. K., MAASSAB, H. F. BELSHE, R. B. 1992. Evaluation of a cold adapted influenza B/Texas/84 reassortant virus (CRB-87) vaccine in young children. **Journal of Clinical Microbiology**. 30: 2230-2235.
- ANDERSON M. L., MOORE P. F., HYDE, D. M., DUNGWORTH D. L. 1986. Bronchus associated lymphoid tissue in the lungs of cattle: relationship to age. **Research Veterinary Science**. 41: 211–220.
- ANEL, A., BUFERNE, M., BOYER, C., SCHMITT-VERHULST, A. M., GOLSTEIN, P. 1994. T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine Kinase

inhibitors and cyclosporin A. **European Journal of Immunology**. 24: 2469-2476.

ASHKENAZI, A., DIXIT, V. M. 1998. Death Receptors: signaling and modulation. **Science**. 281, 1305-1308.

ASTI R. N., KURTDEDE N., ALTUNAY H., OZEN, A. 2000. Electron microscopic studies on conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in Angora goats. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**. 107: 196–198.

AUCOUTURIER, J. DUPUIS, L., GANNE, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**. 19: 2666 – 2672.

AYROLDI, E., ZOLLO, O., CANNARILE, L., D'ADAMIO, F., GROHMANN, U., DELFINO, D.V., RICCARDI, C. 1998. Interleukin-6(IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/FasL expression and cell death. **Blood**. 92: 4212-4219.

BABIUK, L. A. 2002. Vaccination: A Management Tool in Veterinary Medicine. **The Veterinary Journal**. 164: 188-201.

BARMAN, N. N., BHATTACHARYYA, R., UPADHYAYA, T. N., BAISHYA, G. 1996. Development of bronchus-associated lymphoid tissue in goats. **Lung**. 174: 127-131.

BAUCHEREAU, J., STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**. 392: 245-252.

BEATI, L., KEIRANS, J. E. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**. 87(1): 32-48.

BENMOHAMED, L., BELKAID, Y., LOING, E., BRAHIMI, K., GRASMASSE, H., DRUILHE, P. 2002. Systemic immune responses induced by mucosal administration of lipopeptides without adjuvant. **European Journal of Immunology**. 32: 2274-2281.

BERNSTEIN, J. M., GORFIEN, J., BRANDTZAEG, P. 1999. **The immunobiology of the tonsils and adenoids**, p. 1339-1362. *In*: OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J.,

- MCGHEE, J. R. (ed.). Mucosal immunology, 2nd, Ed. Academic Press, New York, 1999.
- BERGQUIST, C., JOHANSSON, E-L., LAGERGÅRD, T., HOLMGREN, J., RUDIN, A. 1997. Intranasal Vaccination of Humans with Recombinant Cholera Toxin B Subunit Induces Systemic and Local Antibody Responses in the Upper Respiratory Tract and the Vagina. **Infection and Immunity**. 65(7): 2676-2684.
- BERGQUIST, C., LAGERGÅRD, T., LINDBLAD, M., HOLMGREN, J. 1995. Local and systemic responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates. **Infection and Immunity**. 63:2021–2025.
- BEVERLEY, P. C. 1990. Is T-cell memory maintained by crossreactive stimulation? **Immunology Today**. 11:203-205.
- BIENENSTOCK J, BEFUS A. 1980. Mucosal immunology. **Immunology**. 41:249-270.
- BIMCZOK, D., ROTHKÖTTER, H. J. 2006. Lymphocyte migration studies. **Veterinary Research**. 37: 325-338.
- BISSONNETTE, R. P., MCGAHON, A., MAHBOUBI, A., GREEN, D. R.. 1994. Functional Myc-Max heterodimer is required for activation-induced apoptosis in T cell hybridomas. **Journal of Experimental Medicine**. 180:2413-2418.
- BLOM, M., BONT, H. J. G. D., MEIJERMAN, I., MULDER, G. J., MAGELKERKE, J. F. 1999. Prevention of Cycloheximide-Induced apoptosis in hepatocytes by adenosine and by caspase inhibitors. **Biochemical Pharmacology**. 58: 1891-1898.
- BONNEVILLE, M., JANEWAY, C. A., ITO, K., HASER, W., ISHIDA, I., NAKANISHI, N., TONEGAWA, S. 1988. Intestinal intraepithelial lymphocytes are a distinct set of *gd* T cells. **Nature**. 336:479.
- BRANDTZAEG, P. 1985. Cells producing immunoglobulins and other immune factors in human nasal mucosa. **Protides of the Biological Fluids: Proc. Colloquium**. 32:363-366.

BRANDTZAEG, P., PABST, R. 2004. Let's go mucosal: communication on slippery ground. **Trends Immunology**. 25: 570-577.

BRUNNER, T., YOO, N. J., LAFACE, D., WARE, C. F., GREEN, D. R. 1996. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. **International Immunology**. 8:1017-1026.

CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S., REED, J. C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**. 282: 1318-1321.

CHAN, F. K., CHUN, H. J., ZHENG, L., SIEGEL, R. M., BUI, K. L., LENARDO, M. J. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. **Science**. 288: 2351-2354.

CHATTERJEE, S., ZAMAN, K., RYU, H., CONFORTO, A., RATAN, R.R. 2001. Sequence-selective DNA binding drugs mithramycin A and chromomycin A3 are potent inhibitors of neuronal apoptosis induced by oxidative stress and DNA damage in cortical neurons. **Annual Neurology**. 49, 345-354.

CHEN, A., ZHENG, G., TYKOCINSKI, M. L. 2003. Quantitative interplay between activating and pro-apoptotic signals dictates T cell responses. **Cellular Immunology**. 221, 128-137.

CHINNAIYAN, A. M., O'ROUKE, K., YU, G.-L., LYONS, R. H., GARG, M., DUAN, D. R., XING, L., GENTZ, R., NI, J., DIXIT, V. M. 1996 Signal Transduction by DR3, a Death Domain-Containing Receptor Related to TNRF-1 and CD95. **Science**. 274: 990.

CHODOSH, J., NORDQUIST, R. E., KENNEDY, R. C. 1998. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. **Developmental and Comparative Immunology**. 22: 621-630.

CLEMENS, M. J., BUSHELL, M., MORLEY, S. 1998. Degradation of eukaryotic polypeptide chain initiation factor (eIF) 4G in response to

induction of apoptosis in human lymphoma cell lines. **Oncogene**. 17: 2921-2931.

COHEN, J. J. 1991. Programmed cell death in the immune system. **Advances in immunology**. 50:55-85.

COHEN, J. J. 1992. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. **Chest**. 103: 99-101.

CORY, S. 1995. Regulation of lymphocyte survival by the *bcl-2* gene family. **Annual Review of Immunology**. 13: 513-544.

COTTER, T. W., MENG, Q., SHEN, Z. L., ZHANG, Y. X., SU, H., CALDWELL, H. 1995. Protective efficacy of major outer membrane protein-specific immunoglobulin A (IgA) and IgG monoclonal antibodies in a murine model of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. **Infection and Immunity**. 63:4704–4714.

CRABTREE, G. R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. **Science**. 243: 355-361.

CRITCHFIELD, J.M., BOEHME, S.A. AND LENARDO, M.J. 1995. The regulation of antigen-induced apoptosis in mature T lymphocytes. In: C.D. Gregory (Ed) **Apoptosis and The immune Response**. Wiley-Liss Inc., New York. 55-114.

CROMPTON, T., PEITSCH, M. C., MACDONALD, H. R., TSCHOPP, J. 1992. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 183: 532-537.

CSISZAR, A., UNGVARI, Z., KOLLER, A., EDWARDS, J. G., KALEY, G. 2004. Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in ageing. **Physiological Genomics**. 17: 21-30.

CZERKINSKY, C., ANJUERE, F., MCGHEE, J. R., GEORGE-CHANDY, A., HOLMGREN, J., KIENY, M. P., FUJIYASHI, K., MESTECKY J. F., PIERREFITE-CARLE, V., RASK, A. C., SUN, L. B. 1999. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. **Immunological Reviews**. 170: 197-222.

- DALTON, J. P., MULCAHY, G. 2001. Parasite vaccine - a reality? **Veterinary Parasitology**. 98: 149 – 167.
- DANIEL, P. T., SCHULZE-OSTHOFF, K., BELKA, C., GÜNER, D. 2003. Guardians of cell death: The Bcl-2 family proteins. **Essays in Biochemistry**. 39: 73–88.
- DAVIES A. 1922. An investigation into the serological properties of dysentery stools. **Lancet**. 1009-1012.
- DE ALBORÁN, I. M., ROBLES, M. S., BRAS, A., BAENA, E. MARTÍNEZ, A. C. 2003. Cell death during lymphocyte development and activation. **Seminars in Immunology**. 15, 125-133.
- DE LA FUENTE, J., RODRÍGUEZ, M., REDONDO, M., MONTERO, C., GARCÍA-GARCÍA, J. C., MÉNDEZ, L., SERRANO, E., VALDÉS, M., HENRÍQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUÉ, O., MACHADO, H., LLEONART, R., DE ARMAS, C. A., REY, S., RODRÍGUEZ, J. L., ARTILES, M., GARCÍA, L. 1998. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac TM against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**. 16: 336-373.
- DI TOMMASO, A., G. SALETTI, M. PIZZA, R. RAPPUOLI, G., DOUGAN, S., ABRIGNANI, G., DOUCE, M., DE MAGISTRIS, T. 1996. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxina as a mucosal adjuvant. **Infection and Immunity**. 64:974-979.
- DHEIN, J., WALCKZAK, H., BÄUMLER, C., DEBATIN, K. M. KRAMMER, P. H. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(fas/CD95). **Nature**. 373, 438-441.
- DREYFUSS, M., HARN, E., HOFFMANN, H. 1976. Cyclosporin A and C. New metabolites from *Trichoderma polysporum*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. 3: 125-133.
- DRIESSEN, A., VAN GINNEKEN, C., CREEMERS, J., LAMBRICHTS, I., WEYNS, A., GEBOES, K., ECTORS, N. 2002. Histological and

immunohistochemical study of the lymphoid tissue in the normal stomach of the gnotobiotic pig. **Virchows Archives**. 441: 589–598.

EFRAT, S., KAEMPFER, R. 1984. Control of biologically active interleukin 2 messenger RNA formation in induced human lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 81: 2601-2605.

ELLIS, H. M., HORVITZ, H. R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**. 44: 817–829.

EMMEL, E. A., VERWEIJ, C. L., DURAND, D. B., HIGGINS, K. M., LACY, E., CRABTREE, G. R. 1989. Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. **Science**. 246: 1617-1620.

ESTRADA-PEÑA, A. 1999. Geostatistic and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *R. (B.) microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**. 81: 73-82.

ESTRADA-PEÑA, A., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J. L., GUGLIELMONE, A., HORAK, I., JONGEJAN, F., LATIF, A., PEGRAM, R., WALKER, A. R. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental & Applied Acarology**. 38:219–235.

EVAN, G. I., WYLLIE, A. H., GILBERT, C. S, LITTLEWOOD, T. D., LAND, H. 1992. **Cell**. 69, 119-128.

FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L., HENSON, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**. 148: 2207-2216.

FESIK, S. W., SHI, Y. 2001. Structural Biology: Controlling the Caspases. **Science**. 294(5546): 1477 – 1478.

FISCHER, G., KENT, S. C., JOSEPH, L., GREEN, D. R., SCOTT, D. W. 1994. Lymphoma models for B cell activation and tolerance. X. Anti-MIU-mediated growth arrest and apoptosis of murine B cell lymphomas is

prevented by the stabilization of myc. **Journal of Experimental Medical.** 179: 221-228.

FRUMAN, D. A., MATHER, P. E., BURAKOFF, S. J. BIERER, B. E. 1992. Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. **European Journal of Immunology.** 22: 2513-2517.

FULDA, S., MEYER, E., DEBATIN, K. M. 2000. Metabolic Inhibitors Sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced Apoptosis by Down-Regulating Fas-associated Death Domain-like Interleukin 1-Converting Enzyme Inhibitory Protein Expression. **Cancer Research.** 60: 3947-3956.

FUJIHASHI, K., DOHI, T., RENNERT, YAMAMOTO, P. D., KOGA, M., KIYONO, T., H., MCGHEE, J. R. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 98(6): 3310-315.

FUJIHASHI, K., MCGHEE, J. R., KWEON, M. N., COOPER, M. D., TONEGAWA, S., TAKAHASHI, I., HIROI, T., MESTECKY, J., KIYONO, H.. 1996. *g/d* T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. **Journal of Experimental Medicine.** 183: 1929.

GABIUS, H. J. 2001. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe and galectin-1. **Biochimie.** 83: 659-666.

GALLICHAN, W. S., JOHNSON, D. C., GRAHAM, F. L., ROSENTHAL, K. L. 1993. Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B. **Journal of Infectious Diseases.** 168:622-29.

GARCIA-GARCIA, J. C., SOTOT, A., NIGRO, F., MAZZA, M., JOGLAR, M., HECHEVARRIA, M., LAMBERTI, J., DE LA FUENTE, J. 1998. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastors*. **Vaccine.** 16: 1053-1055.

GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**. 119: 493–501.

GENESTIER, L., KASIBHATLA, S., BRUNNER, T., GREEN, D. R. 1999. Transforming Growth Factor β 1 Inhibits Fas Ligand expression and subsequent Activation-induced Cell Death in T cells via downregulation of c-Myc. **Journal of Experimental Medicine**. 189(2): 231-239.

GENG, Y. J., WU, Q., MUSZYNSKI, M., HANSON, G. K., LIBBY, P. 1996. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 16: 19-27.

GOLSTEIN, P., OJCIUS, D. M., YOUNG, D. E. 1991. Cell death mechanisms and the immune system. **Immunology Review**. 121:29-65.

GOODMAN, T., LEFRANCOIS, L.. 1988. Expression of the *gd* T-cell receptor on intestinal CD81 intraepithelial lymphocytes. **Nature**. 333:855.

GORSE, G. J., OTTO, E. E., POWERS, D. C., CHAMBERS, G. W., EICKHOFF, C. S., NEWMAN, F. K.. 1996. Induction of mucosal antibodies by live attenuated and inactivated influenza virus vaccines in the chronically ill elderly. **Journal of Infection Disease**. 173:285-290.

GRAY, D., MATZINGER, P. 1991. T cell memory is shortlived in the absence of antigen. **Journal of Experimental Medicine**. 174: 969-974.

GREEN, D .R., SCOTT, D. W. 1994. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**. 6: 476-487.

GREEN, W. B., EATON, K., KRAKOWKA, S. 1997. Porcine gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT): stimulation by colonization with the gastric bacterial pathogen, *Helicobacter pylori*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 56: 119-131.

GREGSON, R. L., DAVEY, M. J., PRENTICE, D. E. 1979. Postnatal development of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the rat, *Rattus norvegicus*. **Laboratorial Animal**. 13: 231-238.

- GRIEBEL, P. J., HEIN, W. R. 1996. Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. **Immunology Today**. 17: 30-39.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**. 21(125): 8-10.
- GROSSMAN, Z.; MIN, B.; MEIER-SCHELLERSHEIM, M. PAUL, W. 2004. Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis. **Nature Review of Immunology**. 4: 387-395.
- GUPTA, S. 1996. **Apoptosis/Programmed Cell Death: A historical Perspective**. In: P. Press (Ed) Mechanisms of lymphocyte Activation and Immune Regulation VI, Vol. 406. Plenum Publishing Corporation, New York, p. 270.
- HASIGUCCI, K., OGAWA, H., ISHIDATE, T., YAMASHITA, R., KAMIYA, H., WANATABE, K., HATTORI, N., SATO, T., SUZUKI, Y., NAGEMINE, T., AIZAWA, C., TAMURA, S., KURATA, T., OYA, A. 1996. Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with *Escherichia coli* heat labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin. **Vaccine**. 14:113-119.
- HATHAWAY, L. J., PARTIDOS, C. D., VOHRA, P., STEWARD, M. W. 1995. Induction of systemic immune responses to measles virus synthetic peptides administered intranasally. **Vaccine**. 13(16): 1495-1500.
- HEBEL, R. 1960. Research on the occurrence of lymphatic intestinal crypts in the tunica submucosa of the intestines of swine, cattle, sheep, dogs and cats, **Anatomischer Anzeiger**. 109: 7-27.
- HEDGECOCK, E. M., SULSTON, J. E, THOMSON, J. N. 1983. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**. 220:1277-9.
- HENGARTNER, M.O. 1997. **Programmed Cell Death**. In: *C. elegans* II. RIDDLE, D. L. *et al.* eds. 383-496. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1997.

- HIRABAYASHI, Y., KURATA, H., FUNATO, H., NAGAMINE, T., AIZAWA, C., TAMURA, S., SHIMADA, K., KURATA, T. 1990. Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. **Vaccine**. 8:243-248.
- HILDEMAN, D. A., ZHU, Y., MITCHELL, T. C., KAPPLER, J., MARRACK, P. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. **Current Opinion in Immunology**. 14, 354-359.
- HILLER, A. S., TSCHERNIG, T., KLEEMANN, W. J., PABST, R. 1998. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and larynx-associated lymphoid tissue (LALT) are found at different frequencies in children, adolescents and adults. **Scandinavian Journal of Immunology**. 7: 159-162.
- HOCKENBERY, D., NUNEZ, G., MILLIMAN, C., SCHREIBER, R. D., KORSMEYER, J. T. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**. 348: 334-336.
- HOCKENBERY, D. M., OLTVAI, Z. N., YIN, X. M., MILLIMAN, C. L., KORSMEYER, S. J. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**. 75: 241-251.
- HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C., LYCKE, N., SVENNERHOLM, A. M. 1994. Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen carrier and adjuvant. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 50(5):42-54.
- HOPKINS, S., KRAEHENBUHL, J. P., SCHODEL, F., POTTS, A., PETERSON, D., DE GANDI P., NARDELLI-HAEFLIGER, D. 1995. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. **Infection and Immunity**. 63:3279-3286.
- HORTER, D. C., YOON, K. J., ZIMMERMAN, J. J. 2003. A review of porcine tonsils in immunity and disease. **Animal health research reviews**. 4: 143-155.

- HUEBER, A. O., ZORNIG, M., LYON, D., SUDA, T., NAGATA, S., EVAN, G. I. 1997. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. **Science**. 278:1305-1309.
- ITOH, N., YONEHARA, S., ISHII, A., YONEHARA, M., MIZUSHIMA, S., SAMESHIMA, M., HASE, A., SETO, Y., NAGATA, S. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell**. 66: 223–243.
- JÄÄTTELÄ, M., TSCHOPP, J. 2003. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. **Nature immunology**. 4: 416-422.
- JANSSEN, O., SANZENBACHER, R., KABELITZ, D. 2000. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. **Cell and Tissue Research**. 301: 85-99.
- JOHANSSON, E. L., WASSEN, L., HOLMGREN, J., JERTBORN, M., RUDIN, A. 2001. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. **Infection and Immunity**. 69: 7481-7486.
- JONES, L. A., CHIN, L. T., LONGO, D. L., KRUISBEEK, A. M. 1990. Peripheral clonal elimination of functional T cells. **Science**. 250: 1726-1729.
- JONSSON, N. N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**. 137: 1-10.
- JOHNSON, S., HARRISON, D. J., WYLLIE, A. H. 1997. **Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease**. In: KAUFMANN, S. H. (Ed) Apoptosis: Pharmacologic implications and therapeutic opportunities, Vol. 41. Academic Press, Rochester, Minnesota. 1997.
- JU, S. T., PANKA, D. J., CUI, H., ETTINGER, R., EL-KHATIB, M., SHERR, D. H., STANGER, B. Z., HARSHAK-ROTHSTEIN, A. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. **Nature**. 373: 444–448.

KASHINO, S. S., RESENDE, J., SACCO, A. M. S., ROCHA, C., PROENÇA, L., CARVALHO, W. A., FIRMINO, A. A., QUEIROZ, R., BENAVIDES, M., GERSHWIN, L. J., DE MIRANDA-SANTOS, I. K. F. 2005. *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**. 110: 12-21.

KATO, T., OWEN, R. L. 1999. *In: Mucosal Immunology*. OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R. (Eds). Academic, San Diego: p.115–132.

KE, Y., KAPP, J.A. 1996. Oral antigen inhibits priming of CD8+ CLT, CD4+ T cells, and antibody response while activating CD8+ suppressor T cells. **Journal of Immunology** 156:916-921.

KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. 26:239-57.

KOGA, T.; MCGHEE, J. R.; KATO, H.; KATO, R.; KIYONO, H.; FUJIHASHI, K. 2000. Evidence for early aging in the Mucosal Immune System. **The Journal of Immunology**. 165: 5352–5359.

KOMANO, H., FUJIURA, Y., KAWAGUCHI, M., MATSUMOTO, S., HASHIMOTO, Y., OANA, S., MOMBAERTS, P., TONEGAWA, S., YAMAMOTO, H., ITOHARA, S. 1995. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial *gd* T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 92:6147.

KOMINEK, L. A. 1975 Cycloheximide Production by *Streptomyces griseus*: Control Mechanisms of Cycloheximide Biosynthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherpy**. 7: 856-860.

KONGPHANICH, A., HIEDA, M., KUROKAWA, K., MURATA, T., KOBAYASHI, N. 2002. Overcoming the blockade at the ustream of caspase cascade in Fas-resistant HTLV-I-infected T cells by cycloheximide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 294: 714-718.

- KRAAL, G. 2004. **Nasal-associated lymphoid tissue**. *In*: MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R., MAYER, L. (Eds.), *Mucosal immunology*, vol.1, 3rd ed., Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 2004, p.415-422.
- KRAKOWKA, S., EATON, K. A., RINGS, D. M., MORGAN, D. R. 1991. Gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. **Reviews of Infectious Diseases**. 13(8): S681-S685.
- KRAMMER, P. H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**. 407: 789-795.
- KREMER, L., DUPRE, L., RIVEAU, G., CAPRON, A., LOCHT, C. 1998. Systemic and Mucosal Immune Responses after Intranasal Administration of Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Gue´rin Expressing Glutathione S-Transferase from *Schistosoma haematobium*. **Infection and Immunity**. 66(12): 5669-5676.
- KUMAR, P., TIMONEY, J. F. 2001. Light and electron microscope studies on the nasopharynx and nasopharyngeal tonsil of the horse. **Anatomia Histologia Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series**. 30: 77-84.
- LANDSVERK, T. 1981. The epithelium covering Peyer's patches in young milk-fed calves. An ultrastructural and enzyme histochemical investigation. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 22: 198-210.
- LANDSVERK, T. 1988. Phagocytosis and transcytosis by the follicle-associated epithelium of the ileal Peyer's patch in calves. **Immunology Cell Biology**. 66: 261-268.
- LANDSVERK, T., HALLERAKER, M., ALEKSANDERSEN, M., MCCLURE, S., HEIN, W., NICANDER, L. 1991. The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 28: 1-16.
- LAUB, O., JAKOBOVITS, E. B., ALONI, Y. 1980. Premature termination of late transcription of simian virus 40 DNA. 5,6-Dichloro-1-f3-

ribofuranosylbenzimidazole enhances premature termination of late transcription of simian virus 40 DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 77: 5297-5301.

LATINIS, K. M., NORIAN, L. A., ELIASON, S. L., KORETZKY, G. A. 1997. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. **Journal of Biological Chemistry**. 272:31427-31434.

LEHNER, T., BROOKS, R., PANAGIOTIDI, C. TAO L, KLAVINSKIS LS, WALKER J, WALKER P. 1993. T and B cell functions and epitope expression in nonhuman primates immunized with simian immunodeficiency virus antigen by the rectal route. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 90: 8638-8642.

LEMAIRE, C., ANDRÉAU, K., SOUVANNAVONG, V., ADAM, A. 1999. Specific dual effect of cycloheximide on b lymphocyte apoptosis: involvement of cyp32/caspase-3. **Biochemical Pharmacology**. 58: 85-93.

LEIST, M., JÄÄTTELÄ, M. 2001. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 2: 589-598.

LIEBLER, E. M., KÜSTERS, C., POHLENZ, J. F. 1995. Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer's patches and in lymphoid nodules of large intestine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 48: 233-248.

LIEBLER, E. M., PARA, M., POHLENZ, J. F. 1991. M cells in the rectum of calves. **Research in Veterinary Science**. 51: 107-114.

LIEBLER, E. M., POHLENZ, J. F., WOODE, G. N. 1988. Gut associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. I Distribution and histology. **Veterinary Pathology**. 25: 503-508.

LIEBLER-TENORIO, E. M., PABST, R. 2006. MALT structure and function in farm animals. **Veterinary Research**. 37: 257-280.

- LIN, W. W., HSU, Y. W. Cycloheximide-induced cPLA(2) activation is via the MKP-1 down-regulation and ERK activation 2000. **Cell Signaling**. 12: 457-461.
- LIU, L. M., MACPHERSON, G. G. 1991. Lymph-borne (veiled) dendritic cells can acquire and present intestinally administered antigens. **Immunology**. 73:281.
- LIU, L. M., MACPHERSON, G. G. 1993. Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. **Journal of Experimental Medicine**. 177:1299-1307.
- LYNCH, D.H., RAMSDELL, F., ALDERSON, M.R. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. **Immunology Today**. 16:569-574.
- MA, Q., RENZELLI, A. J., BALDWIN, K. T., ANTONINI, J. M. 2000. Superinduction of CYP1A1 Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**. 275: 12676-12683
- MACDONALD, T. 1983. Immunosuppression caused by antigen feeding: suppressor T cells mask Peyer's patch B cell priming to orally administered antigen. **European Journal of Immunology**. 13:138.
- MACKAY, I. R., ROSEN F. S. 2001. Vaccines and vaccination. **New England Journal of Medicine**. 345:1042-1053.
- MAIR, T. S., BATTEN, E. H., STOKES, C. R., BOURNE, F. J. 1987. The histological features of the immune system of the equine respiratory tract. **Journal of Comparative Pathology**. 97: 575-586.
- MAIR, T. S., BATTEN, E. H., STOKES, C. R., BOURNE, F. J. 1988. The distribution of mucosal lymphoid nodules in the equine respiratory tract. **Journal of Comparative Pathology**. 99: 159-168.
- MAROTTA, D., MARINI, A., BANAUDHA, K., MAHARAJ, S., IVES, J., MORRISSETTE, C. R., JONAS, W. B. 2002. Non-linear effects of Cycloheximide in glutamate-treated cultures rat cerebellar neurons. **Neurotoxicology**. 23: 307-312.

- MARSDEN, V. S., STRASSER, A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl2, BH3-Only proteins and More. **Annual Review of Immunology**. 21: 71-105.
- MARTIN, D. P., SCHMIDT, R. E., DISTEFANO, P. S., LOWRY, O. H., CARTER, J. G., JOHNSON, E. M. 1988. Inhibitors of Protein Synthesis and RNA Synthesis Prevent Neuronal Death Caused by Nerve Growth Factor Deprivation. **The Journal of Cell Biology**. 106: 829-844.
- MARTIN, S.J., LENNON, S.V., A.M., BONHAM, A.M., COTTER, T.G. 1990. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. **Journal of Immunology**. 145: 1859-1867.
- MATTINGLY, J. A. 1984. Immunological suppression after oral administration of antigen: activation of suppressor-inducer cells in the Peyer's patches. **Cell Immunology**. 86:46.
- MCDERMOTT, M. R., BIENENSTOCK, J.. 1979. Evidence for a common mucosal immune system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory and genital tissues. **Journal of Immunology**. 122:1892-1898.
- MCGHEE, J. R., KIYONO, H. 1998. **Mucosal immunology**. In: Fundamenta Immunology. PAUL, W. E. ed. Academic Press, San Diego, p.909.
- MCGHEE, J. R., KIYONO, H. 1993. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. **Infection Agents Disease**. 2:55.
- MCGHEE, J. R., LAMM, M. E., STROBER, W. 1999. **Mucosal immune responses: an overview**. In: Mucosal Immunology, 2nd Ed. OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R. (Eds) Academic Press, San Diego: p.485.
- MEISENHOLDER, G.W., MARTIN, S.J., GREEN, D.R., NORDBERG, J., BABIOR, B.M., GOTTLIEB, R.A. 1996. Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. **Journal of Biological Chemistry**. 271: 16260-16262.

- MILICH, D. R. 1989. Synthetic T and B cell recognition sites: implications for vaccine development. **Asthma and Immunology**. 45: 195-264.
- MIYAKE, M. A. M., RAMOS, C. C., VENOSA, A. R., LIMA, A. S., MARONE, S. A. M. 2003. Mecanismos Imunológicos da Mucosa das Vias Aéreas Superiores e Fisiopatologia do Anel Linfático de Waldeyer: Conceitos Atuais. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**. 7:2.
- MIZEL S. B., MIZEL D. 1981. Purification to apparent homogeneity of murine interleukin 1. **Journal of Immunology**. 126: 834-837.
- MOWAT, A. M. 1994. **Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens**. In: OGRA, P. L., STROBER, W., MESTECKY, J., MCGHEE, J. R., LAMM, M. E., BIOENENSTOCK, J. E. (ed.). Handbook of Mucosal Immunity. San Diego: Academic Press: p.185-201.
- MURREL, A., CAMPBELL, N. J. H., BARKER, S. C. 2000. Phylogenetic analyses of Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 16 (1): 1-7.
- MURRELL, A., CAMPBELL, N. J. H., BARKER, S. C. 2001. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 21 (2): 244-258.
- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B. A., YUAN, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid beta. **Nature**. 403: 98-103.
- NELSON, D. L., COX, M. M. 2005. **Biosignaling** p.473-474. In: Lehninger: Principles of Biochemistry. 4 ed. New York : W. H. Freeman and Company. 1119 p.
- NEWELL, M. K., HAUGHN, L. J., MAROUN, C. R., JULIUS, M. H. 1990. Death of mature cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. **Nature**. 347: 286-289.
- NGUYEN, T., RUSSELL, J. 2001. The regulation of FasL expression during activation-induced cell death (AICD). **Immunology**. 103: 426-434.

- NIWA, M., HARA, A., KANAMORI, Y., MATSUNO, H., KOZAWA, O., YOSHIMI, N., MORI, H., UEMATSU, T. 1999. Inhibition of tumor necrosis factor- α induced neutrophil apoptosis by cyclic AMP: involvement of caspase cascade. **European Journal of Pharmacology**. 371: 59-67.
- O'GARRA, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T-helper cell subsets. **Immunity**. 8: 275-283.
- OEHM, A. BEHRMANN, I., FALK, W. PAWLITA, M., MAIER, G. LIWEBER, M., RICHARDS, S., DHEIN, J., TRAUTH, B. C., POSTINGL, H., KRAMMER, P. H. 1992. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. **Journal of Biological Chemistry**. 267, 10709-10715.
- OGRA, P. L., KARZON D. T. 1969. Distribution of poliovirus antibody in serum, nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine. **Journal of Immunology**. 102:1423-1430.
- OLIVEIRA-SIQUEIRA, T. C. G., OLIVEIRA, M. C. S., ARAUJO JR., J. P. AMARANTE, A. F. T. 2005. PCR- based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**. 35: 105-111.
- OLIVEIRA, R. C. 1998. Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para o controle de carrapato *R. (B.) microplus* (Canestrini, 1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 72p.
- OPFERMAN, J. T., KORSMEYER, S. J. 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nature Immunology**. 4: 410-415.
- OWEN-SCHAUB, L. B., YONEHARA, S., CRUMP, W. L. R., GRIMM, E. A. 1992. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. **Cell Immunology**. 140: 197-205.

- PAAR, M., LIEBLER, E. M., POHLENZ, J. F. 1992. Uptake of ferritin by follicle-associated epithelium in the colon of calves. **Veterinary Pathology**. 29: 120-128.
- PABST, R., BINNS, R. M. 1986. **Comparison of lymphocyte production and migration in pig lymph nodes, tonsils, spleen, bone marrow and thymus**, *In*: Tumbleson M.E. (Ed.), Swine in Biomedical Research, 3rd ed., Plenum Press, New York, 1986.
- PABST, R., BINNS, R. M. 1989. Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: Several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. **Immunological Reviews**. 108: 83-109.
- PABST, R., BINNS R. M. 1994. The immune system of the respiratory tract in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 43: 151-156.
- PABST, R., BINNS, R. M. 1995. Lymphocytes migrate from the bronchoalveolar space to regional bronchial lymph nodes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 151: 495-499.
- PABST, R., REYNOLDS, J. D. 1987. Peyer's patches export lymphocytes throughout the lymphoid system in sheep. **Journal of Immunology**. 139: 3981-3985.
- PARONE, P., PRIAULT, M., JAMES, D., NOTHWEHR, S. F., MARTINOU, J. C. 2003. **Apoptosis: Bombarding the mitochondria**. *In*: Essays in Biochemistry: Programmed Cell Death. COTTER, T. *et al.* eds. 39, 41-51. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- PARSONS, K. R., BLAND, A. P., HALL, G. A. 1991. Follicle associated epithelium of the gut associated lymphoid tissue of cattle. **Veterinary Pathology**. 28: 22-29.
- PATARROYO, J. H. 1994. Babesiose bovina: controle de vetores com vacinas a base de peptídeos sintéticos. **Revista de Patologia Tropical**. 23: 145-146.

- PATARROYO, J. H., PORTELA, R. W., DE CASTRO, R. O., COUTO PIMENTEL, J., GUZMAN, F., PATARROYO, M. E., VARGAS, M. I., PRATES, A. A., DIAS MENDES, M. A. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary immunology and immunopathology**. 88: 163-172.
- PECONICK, A. P., SOSSAI, S., GIRÃO, F. A., RODRIGUES, M. Q. R., SOUZA E SILVA, C. H., GUZMAN, F., PATARROYO, A. M., VARGAS, M. I., PATARROYO, J. H. 2008. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. **Experimental Parasitology**. 119: 37–43.
- PIMENTEL, J. C. 2002. A vacina sintética SBm7462 no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em animais estabulados e a campo. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 78p.
- PORTELA, R. W. D. 2000. Comparação experimental de três peptídeos sintéticos como imunógeno no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 87p.
- PRICHARD, R., TAIT, A. 2001. The role molecular biology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**. 98: 169-194.
- PROPHET, E. B., MILLS, B., ARRINGTON, J. B., SOBIN, L. H. 1992. **Laboratory Methods in Histotechnology - Armed Forces Institute of Pathology**. Washington. 274p.
- QUADROS, C. A. 2004. **Vacunas: Prevención de Enfermedades Y Protección de la Salud**. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud. 406 p.
- QUIDING-JARBRINK, M., GRANSTROM, G., NORDSTROM, I., HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C. 1995. Induction of compartmentalized B-cell responses in the human tonsils. **Infection and Immunity**. 63:853-857.
- RAFF, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**. 356: 397-400.

- RAUKO, P., NOVOTNY, L., DOVINOVA, I., HUNAKOVA, L., SZEKERES, T., JAYARAM, H. N. 2001. Antitumor activity of benzamide riboside and its combination with Cisplatin and Staurosporine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 12: 387-394.
- REED, J. C. 2000. Warner Lambert/Parke Davis award lecture: mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology**. 157: 1415-1430.
- REY, J., GARIN, N. SPERTINI, F., CORTHESEY, B. 2004. Targeting of Secretory IgA to Peyer's Patch Dendritic and T Cells after Transport by Intestinal M Cells. **The Journal of Immunology**. 172: 3026–3033.
- REYNOLDS, J. D., PABST, R. 1984. The emigration of lymphocytes from Peyer's patches in sheep. **European Journal of Immunology**. 14: 7-13.
- RICH, T., WATSON, C. J., WYLLIE, A. 1999 Apoptosis: The germs of death. **Nature Cell Biology**. 1: 69-71.
- ROBBINS, J. B., SCHNEERSON, R., SZU, S. C. 1995. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. **Journal of Infection Disease**. 171:1387-1398.
- RODRIGUEZ, F., FERNANDEZ, A., OROS, J., RAMIREZ, A. S., LUQUE, R., BALL, H. J., SARRADELL, J. 2001. Changes in lymphocyte subsets in the bronchus-associated lymphoid tissue of goats naturally infected with different *Mycoplasma* species. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health**. 48: 259-266.
- RODRIGUEZ F., SARRADELL J., POVEDA J.B., BALL H.J., FERNANDEZ A. 2000. Immunohistochemical characterization of lung lesions induced experimentally by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in goats. **Journal of Comparative Pathology**. 123: 285-293.
- RODRÍGUEZ, M., RUBIERA, R., PENICHET, M., MONTESINO, R., CREMATA, J., FALCÓN, V., SÁNCHEZ, G., BRINGAS, R., CORDOBÉS, C., VALDÉS, M., LEONART, R., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. 1994.

- High-level expresión of the *Boophilus microplus* BM86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**. 33: 135-146.
- ROTHKÖTTER, H. J., HRIESIK, C., BARMAN, N. N., PABST, R. B. 1999. T lymphocytes migrate via gut lymph to all lymphoid organs and the gut wall, but only IgA+ cells accumulate in the lamina propria of the intestinal mucosa. **European Journal of Immunology**. 29: 327-333.
- RUDIN, A., JOHANSSON, E. L., BERGQUIST, C., HOLMGREN, J. 1998. Differential Kinetics and Distribution of Antibodies in Serum and Nasal and Vaginal Secretions after Nasal and Oral Vaccination of Humans. **Infection and Immunity**. 66(7): 3390-3396.
- RUIZ, M. D. C. R. 1997. Identificación y estudio de moléculas de la superficie de células T con capacidad de inducir apoptosis. **Tese de doutorado**. Granada: Universidade de Granada, 155p.
- RUIZ, P. M. G., PASSOS, L. M. F., RIBEIRO, M. F. B. 2005. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. **Veterinary Parasitology**. 128: 325-331.
- RUSSELL, M. W., MESTECKY, J. 1988. Induction of the mucosal immune response. **Reviews of Infectious Diseases**. 10(2): S440-S446.
- RUSSELL, M. W., MOLDOVEANU, Z., WHITE, P. L., SIBERT, G. J., MESTECKY, J., MICHALEK, S.. 1996. Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit. **Infection and Immunity**. 64:1272-1283.
- RUSSEL, J. H., RUSH, B., WEAVER, C., WANG, R. 1993. Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 90: 4409-4413.
- SAEG. **Sistemas para análises estatísticas**. versão 5.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 1993.

- SALES-JUNIOR, P.; GUZMAN, F.; VARGAS, M.I.; SOSSAI, S.; PATARROYO, A.M.; LOMBANA, C.Z.G.; PATARROYO, J. 2005. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 107: 281-290.
- SALVENSEN, G. S., DIXIT, V. M. 1997. Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. **Cell**. 91: 443-446.
- SANCHEZ, I. X. B. 2004. Estudo "in vitro" da apoptose induzida em linfócitos de camundongos (Balb/c) imunizados com o peptídeo sintético SBm7462. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 79p.
- SANCHIS, R., ABADIE, G., PARDON, P. 1995. *Salmonella abortusovis* experimental infection induced by the conjunctival route: clinical, serological and bacteriological study of the dose effect in female lambs **Veterinary Research**. 26: 73-80.
- SANGSTER, N. C. 2001. Managing parasiticidae resistance. **Veterinary Parasitology**. 98: 89-109.
- SANTOS, T. R. B., GONZALES, J. C., CHIES, J. M., FARIAS, N. A. R. 1998. Transmissão transovariana de *Babesia bigemina*, (SMITH 7 KILBORNE, 1893) por partenóginas de *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 7(1): 7-10.
- SARRADELL, J., ANDRADA, M., RAMIREZ, A. S., FERNANDEZ, A., GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C., JOVER, A., LORENZO, H., HERRAEZ, P., RODRIGUEZ, F. 2003. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Veterinary Pathology**. 40: 395-404.
- SAVILL, J. S., DRANSFIELD, I., HOGG, N., HASLETT, C. 1990. Vitronectin receptormediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Nature**. 343: 170-173.

- SCAFFIDI, C., KIRCHHOFF, S., KRAMMER, P. H., PETER, M. E. 1999. Apoptosis signaling in lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**. 11: 277-285.
- SCHATZMAYR, H. G. 2003. Novas perspectivas em vacinas virais. **História, Ciências, Saúde Manguinhos**. 10 (2): 655-669.
- SCHUH, J. C., BIELEFELDT OHMANN, H., BABIUK, L. A., DOIGE, C. E. 1992. Bovine herpesvirus-1- induced pharyngeal tonsil lesions in neonatal and weanling calves. **Journal of Comparative Pathology**. 106: 243-253.
- SCHUH, J. C., OLIPHANT, L. W. 1992. Development and immunophenotyping of the pharyngeal tonsil (adenoid) in cattle. **Journal of Comparative Pathology**. 106: 229–241.
- SCHUMMER, A., NICKEL, R., EINGEWEIDE. 1978. In: NICKEL R., SCHUMMER A., SEIFERLE E. (Eds.), **Lehrbuch der Anatomie der Haustiere**, vol. 2, 4th ed., Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1978.
- SELLINS, K. S., COHEN, J. J. 1991. Cytotoxic T lymphocytes induce different types of DNA damage in target cells of different origins. **Journal of Immunology**. 147: 795-803.
- SHI, Y., SAHAI, B.M., GREEN, D.R. 1989. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. **Nature** 339: 625-626.
- SHI, Y., GLYNN, J. M., GUILBERT, L. J., COTTER, T. G., BISSONNETTE, R. P., GREEN, D. R.. 1992. Role for c-myc in activationinduced apoptotic cell death in T cell hybridomas. **Science**. 257:212-214.
- SIEGEL, R. M., FREDERIKSEN, J. K., ZACHARIAS, D. A., CHAN, F. K. M., JOHNSON, M., LYNCH, D., TSIEN, R. Y., LENARDO, M. J. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. **Science**. 288: 2354-2362.
- SIZEMORE, D. R., BRANSTOM, A. A., SADOFF, J. C. 1995. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. **Science**. 270: 299–302.

- SMALL, P. A., SMITH, G. L., MOSS, B.. 1985. **Intranasal vaccination with a recombinant vaccinia virus containing influenza hemagglutinin prevents both influenza virus pneumonia and nasal infection: intradermal vaccination prevents only viral pneumonia.** *In* LERNER, R. A., CHANOCK, R. M., BROWN, F. (ed.), *Vaccines '85*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p.175.
- SMINIA, T., KRAAL, G. 1999. **Nasal-associated lymphoid tissue.** *In*: OGRA, P. L., MESTECKY, J., LAMM, M. E., STROBER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J. R. (eds.). *Mucosal immunology*, 2nd ed. Academic Press, New York. p.357–379.
- SMITH, M. L., CHEN, I. T., ZHAN, Q., O'CONNOR, P. M., FORNACE, A. J. 1995. Involvement of the p53 tumor suppressor gene in repair of UV-type DNA damage. ***Oncogene***. 10: 1053-1059.
- SMITH A. D., DATTA S.P., HOWARD S. G., CAMPBELL P.N., BENTLEY R. MCKENZIE H.A. 1997. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press: p. 740.
- SNYDER, R. C., RAY, R., BLUME, S., MILLER, D. M. 1991. Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. ***Biochemistry***. 30: 4290-4297.
- SOSSAI, S., PECONICK, A. P., SALES-JUNIOR, P. A., MARCELINO, F. C., VARGAS, M. I., NEVES, E. S., PATARROYO, J. H. 2005. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. ***Experimental and Applied Acarology***. 37: 199-214.
- SPIT, B. J., HENDRIKSEN, E. G., BRUIJNTJES, J. P., KUPER, C. F. 1989. Nasal lymphoid tissue in the rat. ***Cell Tissue Research***. 255: 193-198.
- SPRENT, J. 1997. Immunological memory. ***Current Opinion in Immunology***. 9: 371-379.
- STANLEY, A. C., HUNTLEY, J. F., JEFFREY, M., BUXTON, D. 2001. Characterization of ovine nasal associated lymphoid tissue and

identification of M cells in the overlying follicle-associated epithelium. **Journal of Comparative Pathology**. 125: 262-270.

STATSOFT. **Statistica fo Windows V.6.0**. Tulsa: Statsoft. 1996.

SUN, J., DIRDEN-KRAMER, B., ITO, K., ERNST, P. B., VAN HOUSTEN, N. 1999. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. **Journal of Immunology**. 162:5868-5975.

SUTHERST, R. W. 2001. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. **International Journal for Parasitology**. 31: 933 -948.

SVENNERHOLM, A. M., JERTBORN, M., GOTHEFORS, L., KARIM, A. M. M. M., SACK, D. A., HOLMGREN, J. 1984. Mucosal antitoxic and antibacterial immunity after cholera disease and after immunization with a combined B subunit whole cell vaccine. **Journal of Infection Disease**. 149:884-893.

SWAIN, S. L., HU, H, HUSTON, G. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. **Science**. 286 (5443):1381-1383.

TAKAHASHI, I., OKAHASHI, N., MATSUSHITA, K., TOKUDA, M., KANAMOTO, T., MUNEKATA, E., RUSSELL, M. W., KOGA, T. 1991. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a Streptococcal surface protein antigen. **Journal of Immunology**. 146: 332-336.

TAMAOKI, T., NAKANO, H. 1990. Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. **Bio Technology**. 8: 732-735.

TAYLOR, M. A. 2001. Recent Developments in Ectoparasitocides. **The Veterinary Journal**. 161: 253-268.

THOMAS, H., PARROT, D. 1974. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. **Immunology**. 27:631-639.

THOME, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., FICKENSCHER, H., MEINL, E., NEIPEL, F., MATTMANN, C., BURNS, K., BODMER, J. L., SCHROTER, M., SCAFFIDI, C., KRAMMER, P. H., PETER, M. E.,

- TSCHOPP, J. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. **Nature**. 386: 517-521.
- THORNBERRY, N. A., LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. **Science**. 281: 1312-1316.
- THULASI, R., HARBOUR, D. V., THOMPSON, E. B. 1993. Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. **Journal of Biological Chemistry**. 268: 18306-18312.
- THURING, C. M., VAN KEULEN, L. J., LANGEVELD, J. P., VROMANS, M. E., VAN ZIJDERVELD, F. G., SWEENEY, T. 2005. Immunohistochemical distinction between preclinical bovine spongiform encephalopathy and scrapie infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**. 132: 59-69.
- TOMASI, T. B. 1962. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. **Immunology Today**. 13: 416-418.
- TOMASI, T. B. JR. 1980. Oral tolerance - a review. **Transplantation**. 29: 353-356.
- TORRES-MEDINA, A. 1981. Morphologic characteristics of the epithelial surface of aggregated lymphoid follicles (Peyer's patches) in the small intestine of newborn gnotobiotic calves and pigs. **American Journal of Veterinary Research**. 42: 232-236.
- TSUCHIDA, T., KATO, T., YAMADA, A.Y., KAWAMOTO, K. 2002. Cycloheximide induces apoptosis of astrocytes. **Pathology International** 52: 181-185.
- TSUJIMOTO, Y., CROCE, C. M. 1986. Analysis of the structure of transcripts and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 83: 5214-5218.
- VARADHACHARY, A. S., PERDOW, S. N., HU, C., RAMANARAYANAN, M., SALGAME, P. 1997. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. **Immunology**. 94: 5778-5783.

- WAJANT, H. *et al.* (2003) Death Receptors. In: *Essays in Biochemistry*. COTTER, T. *et al.* eds. 39: 53-71. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- WAJANT, H. 2002. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. **Science**. 296(5573): 1635-1636.
- WALLACH, D., KOVALENCO, A. V., VARFOLOMEEV, E. E., BOLDIN, M. P. 1998. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. **Current Opinion in Immunology**. 10: 279-288.
- WESSELBORG, S., JANSSEN, O., KABELITZ, D. 1993. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. **Journal of Immunology**. 150: 4338-4345.
- WIEDERRECHT, G., LAM, E., HUNG, S., MARTIN, M., SIGAL, N. 1993. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporine A. **American New York Academic Science**. 696: 9-19.
- WILLADSEN, P., RIDING, G. A., MCKENNA, R. V., KEMP, D. H., TELLAM, R. L., NIELSEN, J. N., LAHNSTEIN, J., COBON, G. S., GOUGH, J. M. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *R. (B.) microplus*. **Journal of immunology**. 143(4): 1346-1351.
- WILLADSEN, P. 2004. Anti-tick vaccines. **Parasitology**. 129: 367-387.
- WILLADSEN, P. 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**. 138: 161-168.
- WILLIAMS, R. C., GIBBONS, R. J. 1972. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. **Science** 177: 697-699.
- WILLIAMSON, P., VAN-DEN EIJNDE, S., SCHLEGEL, R. A. 2000. Phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic cells. **Methods in Cell Biology**. 66: 339-64.
- WINNER, L. S., MACK, J., WELTZIN, R., MEKALANOS, J. J., KRAEHENBUHL, J. P., NEUTRA, M. R. 1991. New model for analysis of

mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholera* infection. **Infection and Immunity**. 59: 977-982.

WOLD, A. E., DAHLGREN, U. I. H., HANSON, L. A., MATTSBY-BALTZER, I., MIDVETDT, T. 1989. Difference between bacterial and food antigens in mucosal immunogenicity. **Infection and Immunity**. 57: 2666-2673.

WU, C. Y., DEMEURE, C., KINIWA, M., GATELY, M., DELESPESE, G. 1993. IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells. **Journal of Immunology**. 151: 1938-1949.

WU, H.Y., NGUYEN, H. H., RUSSELL, M. W. 1997. Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. **Scandinavian Journal of Immunology**. 46: 506-513.

WYLLIE, A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous nuclease activation. **Nature**. 284: 555-556.

YANG, E., ZHA, J., JOCKEL, J., KORSMEYER, S. J. 1995. Bcl-2: a heterodimeric partner of Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell**. 80: 285-291.

YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H. M., HORVITZ, H. R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. **Cell** 75: 641-652.

ZAMBRANO VS, SALAZAR V, RODOLFO M, ORTIZ L. 1996. Inmunologia de la IgA y las mucosas. **Cir & Cir** 64(5): 147-51.

ZHANG, X., BRUNNER, T., CARTER, L., DUTTON, R.W., ROGERS, P., BRADLEY, L., SATO, T., REED, J.C., GREEN, D., SWAIN, S.L. 1997. Unequal death in T helper cell Th1 and Th2 effectors: Th1, but no Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. **Journal of Experimental Medical** 185: 1837-1849.

ZHO, F., NEUTRA M. R. 2002. Antigen delivery to mucosa-associated lymphoid tissues using liposomes as a carrier. **Biosci. Rep.** 22:355-369.

ZINKERNAGEL, R. M. 2000. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. **Seminars in Immunology**. 12: 163-171.

ZOU, H., HENZEL, W. J., LIU, X., LUTSCHG, A., WANG, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome-c dependent activation of caspase-3. **Cell**. 90: 405-413.