

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR ANTÍGENOS
ALIMENTARES: CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO
MODELO DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL
CRÔNICA

CRISTINA RIBEIRO DE BARROS CARDOSO

RIBEIRÃO PRETO
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CRISTINA RIBEIRO DE BARROS CARDOSO

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR ANTÍGENOS
ALIMENTARES: CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO
MODELO DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL
CRÔNICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto
2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PEQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo

Cardoso, Cristina Ribeiro de Barros

Modulação da resposta imune por antígenos alimentares: caracterização de um novo modelo de inflamação intestinal crônica

Ribeirão Preto, 2006.

153 f. :

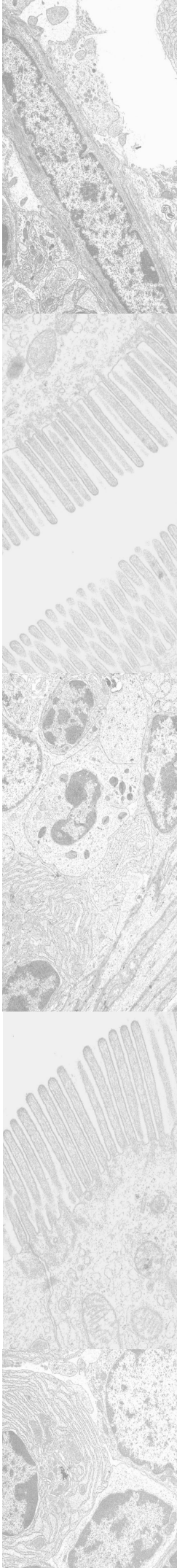
Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP –

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: João Santana da Silva

1. antígenos alimentares. 2. inflamação intestinal. 3. alergia alimentar. 4. imunomodulação. 5. modelo animal

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fapesp (03/03809-3), CNPq (479990/2004-2) e CAPES.



Agradecimientos

À minha família, pelo apoio constante e incondicional durante todos esses anos, por acreditarem e possibilitarem meu crescimento e o desenvolvimento dessa “nova vida”...obrigada sempre!

Ao Alexandre, por estar presente em todos os momentos e, principalmente, por ter sido o verdadeiro “porto seguro”. Obrigada por ter estado sempre e incondicionalmente ao meu lado, e por ter vivenciado comigo todos os difíceis mas também os melhores passos dessa caminhada.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, verdadeiro “mestre” e grande cientista. Obrigada por me aceitar em seu laboratório, acreditar em mim e possibilitar o desenvolvimento deste e de outros projetos. Trabalhar sob sua orientação foi um privilégio e um grande aprendizado de disciplina, de ciência e, principalmente de vida.

*“O maior elogio que ouvi em toda a minha vida de inventor foi:
nunca vai funcionar”.*
Thomas Edison

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e competência na avaliação deste trabalho.

À Dannielle e em especial à Pauline, pela grande dedicação para que este trabalho chegasse ao final. Obrigada pela ajuda durante todo o período experimental, pelas descobertas e desafios que juntas conseguimos superar. O trabalho em equipe foi fundamental em todas as etapas!

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha, pela confiança e idealização deste projeto, e à Prof.^a Dr.^a Gerlinde Teixeira, por nos permitir dar continuidade ao trabalho por ela iniciado, com a elaboração deste novo modelo experimental de doença intestinal.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Rossi, por acreditar neste projeto e por permitir a execução de parte dos trabalhos em seu laboratório. Agradeço pelas proveitosas discussões e pelo auxílio na realização dos experimentos de microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão.

À Prof.^a Dr.^a Beatriz Rossetti Ferreira, por me acolher junto aos seus alunos e pela ajuda sempre irrestrita. Foram inúmeras horas dispendidas em longas discussões científicas, conselhos e boas idéias...muito obrigada! À Dr.^a Isabel K.F. M. Santos, por sempre estar disposta a entender, nos ajudar e explicar a ciência mais “inexplicável”...!

À Dr.^a Lucy Megumi, pela alegria contagiante, pela leitura criteriosa e correções realizadas nesta tese.

À Dr.^a Neide Maria Silva, pelo auxílio na fase final desta caminhada. Sua experiência foi fundamental para a conclusão dos trabalhos.

À Dr.^a Karen A. Cavassani pelo valoroso auxílio nos experimentos de citometria de fluxo. Obrigada pelas horas e horas dispendidas na discussão e execução desses experimentos! Obrigada também à Ana Paula Moreira e Fredy Salazar, pelo grande apoio na fase final de composição desse trabalho.

A todos os outros colegas e amigos de laboratório que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho: Vanessa, Luciana, Daniela, Alessandra, Elen, Sandra, Gustavo Garcia, Antônio, Wanessa, Lucinda, Carlo, Fabrini, Wander, Marcelo, Jaqueline, Gustavo Bronzi, Diego e Walter: obrigada pelo convívio diário, por compartilhar conhecimentos e pela paciência necessária no nosso dia-a-dia...!

Aos colegas que aqui estiveram durante parte dessa caminhada, Dr.^a Ana Paula Campanelli e Dr. Gustavo P. Garlet: agradeço ao proveitoso convívio, aos ensinamentos e exemplo proporcionados. Espero conseguir seguir os mesmos caminhos que vocês brilhantemente trilharam...

Aos colegas e professores da Pós-Graduação: obrigada pela convivência e pelos ensinamentos durante essa jornada

À Ana Cristine... por tudo! Pela dedicação e competência com que trabalha pelo nosso curso, pelo acolhimento que nos proporciona na Pós-Graduação e, principalmente, pela amizade e carinho durante todos esses anos. Obrigada pelo “colo” nos momentos delicados...!

Ao Prof. Dr. Silvio Favoreto, pela amizade sempre disponível, pelas extensas discussões e esclarecimentos sobre RNA's, RNase's, DNase's, etc. Muito obrigada!

Ao Wander C. R. Silva pela grande ajuda na realização das análises histopatológicas. Obrigada por nunca ter desistido ao ver as centenas de “blocos” que lhe esperavam!

À Cristiane M. Milanezi, pelo auxílio fundamental na confecção de *primers*, execução de experimentos, e manutenção do laboratório.

Ao Júlio A. Siqueira, Rubens S. Campos, à Cristiana C. P. Ribas, Ednelson Matozzo e Sávio Miranda pela prontidão e cuidados na criação e fornecimento de camundongos para a realização dos experimentos. Vocês foram também imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Lúcia H. Pacheco pela disposição com que cuida da lavagem e esterilização dos materiais utilizados no laboratório. Obrigada pela contribuição ao trabalho de todos nós.

Aos funcionários Carla M. F. Braz, Inácio de Souza, Alessandra A. G. Ferreira e Lúcia M. L. Silva, por sempre manterem o nosso ambiente de trabalho limpo, essencial para realização de qualquer experimento!

À Maria Elena Riul, Mônica A. Abreu e Lígia B. Santoro, pelo grande auxílio dispensado no Laboratório de Patologia, durante a realização dos experimentos de microscopia óptica e de transmissão. Lena, obrigada pela sua competência e ajuda incondicional em todos os protocolos, em qualquer coloração...! Agradeço também aos funcionários e à Prof.^a Dr.^a Maria Célia Jamur do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos dessa faculdade, pelos ensinamentos referentes à detecção de mastócitos de mucosa intestinal.

Aos novos amigos que encontrei durante essa longa caminhada: Daniela, Sandra, Natália, Kelen, Cláudia, Luciano, Flávia e Lucinha. Vocês souberam gentilmente compartilhar não só os bons momentos, mas também aqueles difíceis... Obrigada pela força, auxílio, incentivo e pelas palavras que muito me ajudaram a seguir em frente. Vocês foram essenciais para a finalização dessa etapa.

“...qualquer dia amigo, eu volto a te encontrar...”

Aos amigos de longa data que, mesmo “do outro lado do rio”, não deixaram de torcer por mim. À Rosângela, por ter me “aguentado” durante esses anos de trabalho, em qualquer situação, a qualquer momento do dia, da noite ou até mesmo da madrugada...!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos auxílios financeiros concedidos que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao povo brasileiro que, pagando impostos, possibilita o desenvolvimento da ciência em nosso país. Que nós, cientistas, consigamos retribuir este investimento à sociedade.

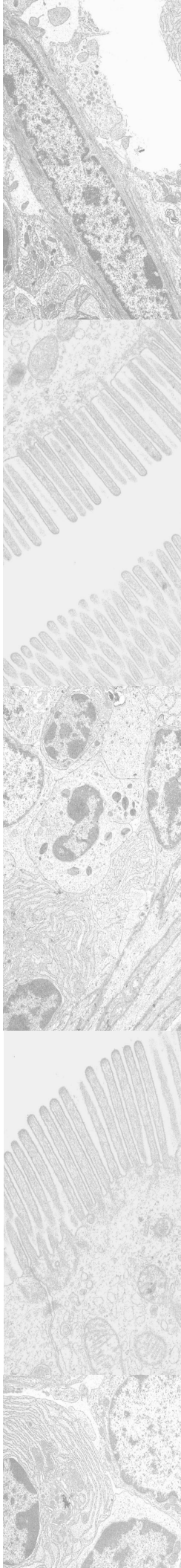
*Ando devagar porque já tive pressa
levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei...*

*Conhecer as manhãs e as manhãs
o sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
compreender a marcha ir tocando em frente
como um velho boiadeiro
levando a boiada eu vou tocando os dias
pela longa estrada eu vou, estrada eu sou*

*Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega em outro vai embora
cada um de nós compõe a sua história
cada ser em si carrega o dom de ser capaz
de ser feliz”*

Almir Sater e Renato Teixeira



Abreviaturas

ANOVA	Análise da variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
D	Animais não imunizados com extrato protéico de amendoim e alimentados com as sementes
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DO	Densidade óptica
DSS	Dextran sulfato de sódio
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPA	Extrato protéico de amendoim
EPM	Erro padrão da média
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Parâmetro de análise celular em citometria de fluxo por tamanho (<i>forward scatter</i>)
GALT	Tecido linfóide associado ao trato gastrintestinal
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
I	Animais imunizados com extrato protéico de amendoim
I + D	Animais imunizados com extrato protéico de amendoim e desafiados com as sementes
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina

IL-	Interleucina
KO	Animal geneticamente deficiente (<i>knock-out</i>)
NI	Animais não imunizados com extrato protéico de amendoim e alimentados exclusivamente com ração
NK	Célula “ <i>natural killer</i> ”
NKT	Células “ <i>natural killer</i> ” T
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Clorofila peridinina
PGE2	Prostaglandina E2
PMSF	Inibidor de proteases <i>phenylmethylsulphonylfluoride</i>
RAG^{-/-}	Camundongos deficientes de Rag (<i>recombinase activating gene</i>)
REAL TIME PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real - quantitativa
RNA^m	Ácido ribonucléico mensageiro
RT	Transcrição reversa
SCID	Camundongos com imunodeficiência severa combinada
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio
SSC	Parâmetro de análise celular em citometria de fluxo por granulosidade (<i>side scatter</i>)
TC	Ciclo limiar (<i>threshold cycle</i>)
TCR	Receptor de células T

TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta
TGI	Trato gastrintestinal
Th	Linfócito T auxiliar
TLR3	Receptor do tipo <i>toll</i> 3
TLR4	Receptor do tipo <i>toll</i> 4
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
TNBS	Ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WT	Camundongos selvagens (<i>wild type</i>)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Animais de experimentação	16
3.2. Obtenção do extrato protéico de amendoim (EPA) e análise das proteínas por eletroforese	17
3.3. Indução da inflamação intestinal	17
3.4. Monitoramento do peso dos animais e do consumo de amendoim	19
3.5. Coleta das amostras de tecido intestinal	19
3.6. Análise histopatológica e morfométrica	20
3.7. Análise ultraestrutural de segmentos intestinais de animais imunizados e desafiados com sementes de amendoim - microscopia eletrônica de transmissão	20
3.8. Quantificação do infiltrado celular por citometria de fluxo	21

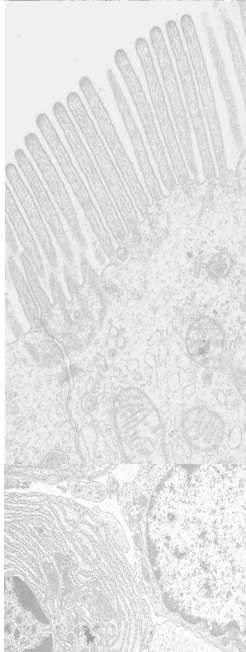
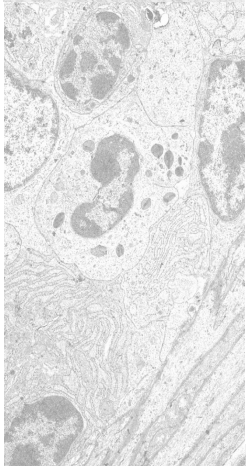
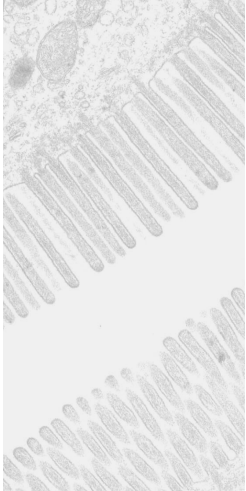
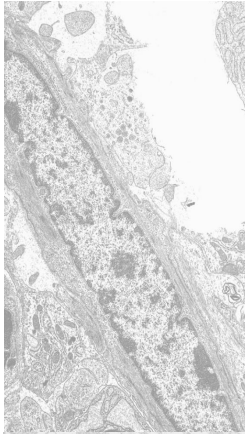
3.9. Obtenção de soro, homogenato de intestino e dosagem de anticorpos específicos a EPA	23
3.10. Quantificação da expressão de mensagens para fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares	24
3.10.1. Extração de RNA e síntese de cDNA	24
3.10.2. Quantificação das mensagens por reações de Real Time PCR	25
3.11. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Indução e caracterização do processo inflamatório intestinal em animais selvagens (WT) C57BL/6	28
4.1.1. Obtenção do extrato protéico de amendoim e eletroforese: estabelecimento do protocolo de imunização	28
4.1.2. Imunização com EPA e desafio com sementes de amendoim induz perda de peso em camundongos C57BL/6	31
4.1.3. Análise histopatológica de segmentos intestinais de animais imunizados e desafiados com sementes de amendoim	33
4.1.4. Análise ultraestrutural de segmentos intestinais de animais	36

imunizados e desafiados com sementes de amendoim	
4.1.5. Quantificação de eosinófilos, mastócitos e células caliciformes nos tecidos inflamados, por análise morfométrica	39
4.1.6. Quantificação do infiltrado celular por citometria de fluxo	41
4.1.7. Produção de imunoglobulinas em resposta ao EPA	44
4.1.8. Determinação do padrão de expressão de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e fatores de transcrição na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares	47
4.2. Papel de linfócitos B na patogênese da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares	52
4.2.1. Variação de peso dos animais B KO	52
4.2.2. Alterações histopatológicas em animais B KO	54
4.2.3. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de células B	57
4.3. Papel da citocina IFN- γ na patogênese da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares	59
4.3.1. Variação de peso dos animais IFN- γ KO	59
4.3.2. Alterações histopatológicas no intestino de camundongos IFN- γ KO	61

4.3.3. Participação de anticorpos na imunomodulação da inflamação intestinal em animais deficientes de IFN- γ	64
4.3.4. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de IFN- γ	66
4.4. Papel da citocina IL-4 na patogênese da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares	68
4.4.1. Variação de peso dos animais IL-4 KO	68
4.4.2. Alterações histopatológicas no intestino de animais IL-4 KO	71
4.4.3. Participação de anticorpos na imunomodulação da inflamação intestinal em animais deficientes de IL-4	74
4.4.4. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de IL-4	76
4.5. Papel de IL-10 na modulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares	78
4.5.1. Variação de peso dos animais IL-10 KO	78
4.5.2. Alterações histopatológicas no intestino de animais IL-10 KO	80
4.5.3. Participação de anticorpos na imunomodulação da inflamação intestinal em animais deficientes de IL-10	83

4.5.4. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de IL-10	86
4.6. Comparação da variação de peso, produção de imunoglobulinas e expressão de RNAm no intestino de camundongos imunizados e desafiados - <i>I</i> + <i>D</i> - selvagens (WT), B KO, IFN- γ KO, IL-4 KO e IL-10 KO	88
5. DISCUSSÃO	91
6. CONCLUSÕES	118
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
8. ANEXOS	141
8.1. Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal	142
8.2. Seqüência dos <i>primers</i> , concentrações utilizadas e propriedades das reações	143
8.3. Análise quantitativa da expressão de RNAm através de Real Time PCR	144
8.4. Exemplo de análise da curva de dissociação para determinação da especificidade da reação de amplificação por Real Time PCR	145
8.5. Colorações utilizadas	146
8.5.1. Coloração azul de Alcian-resorcina para mastócitos de mucosa	146

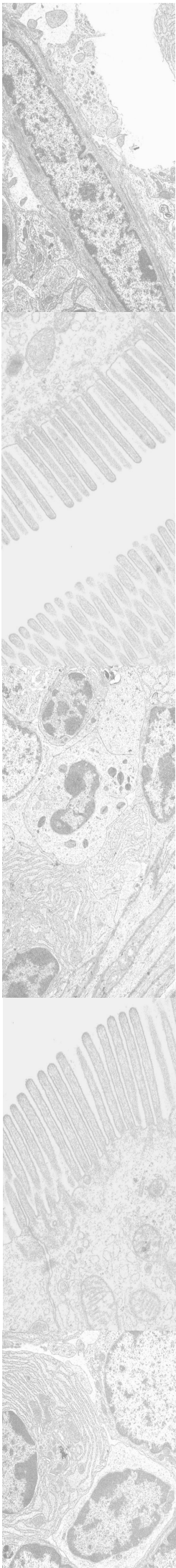
8.5.2. Coloração azul de toluidina para mastócitos de tecido conjuntivo	147
8.5.3. Coloração hematoxilina - eosina	148
8.5.4. Coloração PAS (ácido periódico de Schiff)	150
8.5.5. Coloração vermelho congo para eosinófilos	151
8.6. Soluções para microscopia eletrônica de transmissão	152



Resumo

Resumo

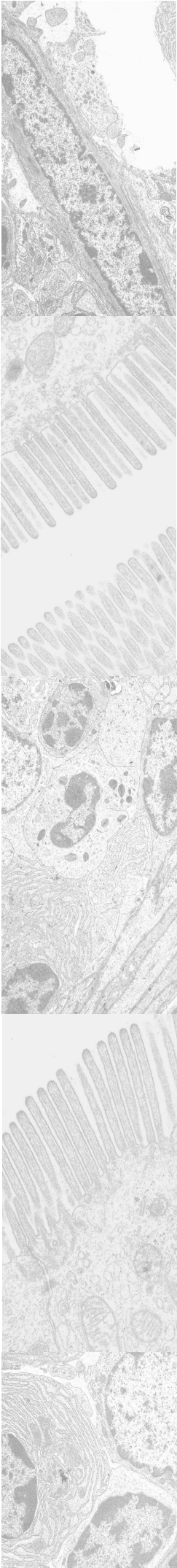
Os processos inflamatórios intestinais envolvem diversas patologias associadas ao trato gastrointestinal (TGI), como a alergia alimentar, a doença de Crohn e colite ulcerativa. A utilização de modelos animais como fonte de estudo dessas doenças inflamatórias de mucosa tem sido relatada há vários anos; no entanto, em tais modelos, tanto as vias de administração, como as substâncias utilizadas para indução da inflamação, não reproduzem de maneira ideal a indução da doença que pode ocorrer no homem após a quebra da homeostasia de mucosa por antígenos alimentares. Deste modo, desenvolvemos um novo modelo de inflamação intestinal induzida por amendoim, alimento comumente presente na alimentação, altamente alergênico e já relatado como provável causa de alergia inflamatória, reproduzindo dessa forma, com mais fidelidade, o quadro patológico que ocorre no homem. Neste modelo, observamos que após as imunizações e ingestão contínua das sementes de amendoim, os camundongos perderam peso e desenvolveram inflamação intestinal crônica evidente, localizada principalmente no intestino delgado. Esta inflamação foi caracterizada por aumento do infiltrado inflamatório de células CD8⁺, células NK, linfócitos B, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos, além de edema, congestão e alterações morfológicas nas vilosidades intestinais. Observou-se, ainda, aumento da produção das imunoglobulinas IgG1 e IgE em detrimento a IgG2a nos animais selvagens imunizados com as proteínas de amendoim, associado a um padrão de resposta imune com produção de RNAm para citocinas tipo Th2. Em contrapartida, camundongos deficientes de IL-4 ganharam peso e demonstraram ausência de inflamação intestinal possivelmente devida à diminuição de produção de anticorpos tipo Th2 juntamente à menor expressão de TNF- α e maior produção de transcritos para citocinas reguladoras e IFN- γ , na suposta tentativa de modulação do perfil de resposta Th2 patológico que é induzido nos animais selvagens. Nesse sentido, observamos também a diminuição do processo inflamatório intestinal nos animais B KO, demonstrando novamente que a inflamação em questão é mediada, em parte pela produção de anticorpos IgG1 e IgE específicos a amendoim. Além disso, houve diminuição de expressão das citocinas IL-4 e TNF- α e aumento de IL-12, IFN- γ e IL-10 nesses animais quando comparados aos WT. Surpreendentemente, camundongos IFN- γ KO ou IL-10 KO também apresentaram lesões intestinais menos evidentes, sugerindo mais uma vez o relevante papel das citocinas TNF- α e IL-4, diminuídas nesses animais em relação camundongos WT imunizados e desafiados. A produção de imunoglobulinas nesses camundongos, principalmente IFN- γ KO, foi similar aos selvagens. Dessa forma, concluímos que a inflamação intestinal observada é mediada por mecanismos alérgicos Th2 altamente dependentes da produção de anticorpos “patogênicos” alérgeno-específicos, como na alergia alimentar, com a participação evidenciada de eosinófilos, mastócitos e linfócitos B, além de plasmócitos. Finalmente, foi estabelecido um novo modelo animal para estudo, entendimento e desenvolvimento de novas terapias para processos inflamatórios intestinais, principalmente aqueles onde há o envolvimento de antígenos alimentares no desequilíbrio da homeostasia do sistema imune de mucosa, como em várias doenças humanas do sistema gastrointestinal.



Abstract

Abstract

Intestinal inflammation is usually associated with the development of gastrointestinal disorders like food allergy, Crohn's disease and ulcerative colitis. Despite the existence of many animal models for studying inflammatory bowel disease, there is no current model that reflects the development of gut inflammation just like it occurs in men, after breakdown of mucosal tolerance by food antigens. Accordingly, in this study we developed and characterized a novel murine model for food-induced intestinal inflammation after sensitization and challenge with peanut seeds, a common allergen able to induce allergic responses in worldwide population. In this model, we observed that after sensitization and challenge with peanut seeds, mice presented weight loss and chronic small gut inflammation. The intestinal segments were found to be infiltrated with CD8⁺ cells, natural killer cells, dendritic cells, eosinophils, mast cells, B lymphocytes and plasma cells, besides the presence of edema, vascular congestion and changes in gut morphology. Moreover, sensitized mice showed high antibody IgG1 and IgE titles in the sera, in contrast to low IgG2a titles, associated with a Th2 profile of cytokines expression. On the other hand, IL-4 KO mice demonstrated weight gain along with absence of intestinal inflammation, possibly due to low Th2 antibody subclasses and TNF- α mRNA detection together with high mRNA expression of regulatory cytokines and IFN- γ , in contrast to the Th2 pathological pattern that was induced in WT mice. Similarly, mice deficient in B cells also had diminished gut inflammation, corroborating with the previous results that highlighted the importance of IgG1 and IgE antibodies in the studied disease. Moreover, these mice showed low mRNA expression of IL-4 and TNF- α together with increased mRNA for IL-12, IFN- γ and IL-10 in the segments from the small gut, when compared to WT mice. Surprisingly, IFN- γ KO and IL-10 KO mice also had diminished intestinal inflammation, suggesting once more a relevant role for the cytokines TNF- α and IL-4 in the disease, which were found to be lowered in these mice when compared to WT sensitized and challenged ones. The antibody titles in these animals, especially in IFN- γ KO ones, were similar to those found in WT mice. Based on the present data, we conclude that gut pathology induced by peanut antigens is mediated by allergic Th2 mechanisms and is highly dependent on allergen-specific antibodies production, like in food allergy. Moreover, intestinal damage probably occurs in the presence of eosinophils, mast cells, B lymphocytes and plasma cells. Finally, we have established a novel murine model for future studies of mucosal immunology and development of novel therapies to gut immunopathologies, specifically in cases where food antigens are the main cause of the breakdown of mucosal immune system homeostasis, just as happens in several human gastrointestinal-diseases.



Introdução

1. Introdução

O ambiente intestinal é um dos maiores e mais complexos componentes do sistema imune. Além de ser exposto a mais antígenos do que qualquer outra parte do organismo, possui a capacidade de diferenciar microorganismos invasivos de antígenos não prejudiciais, como proteínas alimentares e bactérias comensais (MOWAT, 2003). É sabido que a resposta imune de mucosa é também distinta, focada mais na supressão do que na promoção de imunidade (LIU; LEFRANÇOIS, 2004). Por outro lado, respostas imunes exacerbadas contra microorganismos não patogênicos podem ser prejudiciais ao hospedeiro e desencadear reações de hipersensibilidade contra antígenos alimentares ou bactérias comensais, levando assim ao desenvolvimento de desordens inflamatórias como doença celíaca, colite ulcerativa e doença de Crohn (MOWAT, 2003; SHIBA et al., 2003; ISAACS et al., 2005; HANAUER, 2006).

A doença de Crohn e a colite ulcerativa, denominadas “Doenças Inflamatórias Intestinais” (DII), envolvem diversas patologias associadas ao trato gastrointestinal (TGI). A Doença de Crohn afeta camadas mais profundas da parede de qualquer porção do TGI enquanto a colite ulcerativa é caracterizada por inflamação localizada da mucosa do cólon (HANAUER; KIRSNER, 1985; BISCHOFF et al., 2005; ISAACS et al., 2005; HANAUER, 2006).

As DII podem levar a danos prolongados e ocasionalmente irreversíveis da função e estrutura gastrintestinal (BOUMA; STROBER, 2003), sendo caracterizadas por quadro com lesões teciduais, ulceração, secreção, diarreia, alterações da motilidade e fibrose do intestino (PIZZI et al., 2006). Além disso, há infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos, monócitos/macrófagos, plasmócitos, neutrófilos,

eosinófilos e mastócitos (GEBOES, 1994; YANG et al., 2002; RIJNIERSE et al, 2006), com ocorrência de hiperplasia celular nas criptas, edema intersticial e ulcerações na mucosa intestinal (KRIEGLSTEIN et al., 2001). O recrutamento de leucócitos para o intestino é um processo essencial para o desenvolvimento da inflamação intestinal (OSHITANI et al., 2002). Aqueles já presentes no tecido e os recrutados liberam mediadores que modulam o dano tecidual no sítio inflamatório (GEBOES, 1994; RIJNIERSE et al, 2006).

A ativação e migração de leucócitos para o cólon são supostamente fundamentais na patogênese dos danos teciduais desta condição inflamatória (KESHAVARZIAN et al., 1999). Células como neutrófilos migram para o sítio de inflamação e liberam seus produtos tóxicos, como espécies reativas de oxigênio, podendo resultar em vasodilatação, ativação de fatores de transcrição nuclear e a subsequente produção de citocinas inflamatórias, recrutamento e ativação de leucócitos, apoptose e necrose de células parenquimatosas (KRIEGLSTEIN et al., 2001). Quando a homeostase da mucosa normal é rompida, há desequilíbrio no balanço de citocinas, ausência de tolerância oral, alteração da barreira epitelial ou perda de função das células imunorreguladoras, podendo levar à DII. Por outro lado, quando células epiteliais do intestino atuam como células apresentadoras de antígeno, o resultado é a ausência de resposta devido à falta de moléculas co-estimulatórias (MIYAMOTO et al, 2005). No entanto, em pacientes com DII, há estimulação de células T CD4⁺ auxiliares, levando à exacerbação da resposta inflamatória no tecido linfóide associado ao TGI (GALT). Este desequilíbrio entre os mecanismos auxiliares e supressores na mucosa intestinal pode resultar em um processo inflamatório exagerado mantido devido à presença do antígeno no lúmen do intestino.

As células T reguladoras exercem um importante papel supressor no controle dessas respostas imunológicas na mucosa do intestino, e sua ausência também pode levar às DII

(SINGH et al., 2001; ALLEZ et al., 2002; MARTIN et al., 2004; FANTINI et al., 2004; MAUL et al., 2005). Além disso, a transferência de células T CD4⁺CD25⁺ leva à resolução do processo inflamatório e à reconstituição da arquitetura normal do intestino, em camundongos com colite ulcerativa (MOTTET et al., 2003). Normalmente, inflamação termina com reparo tecidual. No entanto, nas DII o reparo não acontece ou é incompleto, as lesões precoces não cicatrizam e levam à inflamação crônica.

A maioria dos modelos experimentais utilizada para estudo de DII converge na deficiência de regulação das respostas de mucosa que deveriam ser respostas normais aos antígenos da mucosa intestinal. A produção desbalanceada de citocinas e mediadores inflamatórios por células CD4⁺ exerce importante papel na patogênese das DII (PAPADAKIS; TARGAN, 2000) e estas células estão envolvidas na regulação dessa patologia, através da secreção de citocinas supressoras como TGF-β e IL-10. Animais deficientes de IL-2 desenvolvem doença similar à colite ulcerativa, com hiperplasia das criptas, ulceração focal e infiltração da lâmina própria por células mononucleares, (SADLACK; MERZ, 1993), enquanto que a ausência de TGF-β leva a um processo inflamatório multifocal, sugerindo a participação dessa citocina no controle da reação inflamatória intestinal. A IL-23, gerada a partir da ligação de IL-12 p40 a p19, participa de processos autoimunes, como DII, exercendo papel similar à IL-12, que converge as respostas na mucosa intestinal para padrão Th1. Células dendríticas isoladas da lâmina própria intestinal de camundongos com DII estimulam, *in vitro* a liberação de IFN-γ por células NKT. Na DII, as células dendríticas se acumulam na lâmina própria do cólon e mostram um fenótipo de superfície de células ativadas, com aumento de IL-12 p40 e p19 estimulando, espontaneamente, células NKT (KRAJINA et al., 2003). Em geral, citocinas

Th1 são encontradas em altos níveis na mucosa inflamada de Doença de Crohn, enquanto citocinas Th2 são comuns na colite ulcerativa. Dessa forma, animais deficientes de IL-10 desenvolvem inflamação intestinal espontaneamente, mediada por resposta Th1, mimetizando doença de Crohn (DAVIDSON et al., 2000), enquanto que colite mediada por oxazalona em camundongos SJL/J ou por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) é caracterizada por resposta predominante Th2 (DOHI et al., 1999). Por outro lado, a colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) caracteriza-se por resposta mista Th1/Th2 (BLUMBERG et al., 1999).

Além do padrão de resposta imunológica direcionada aos perfis Th1 ou Th2, com a liberação de substâncias quimiotáticas e citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1 β , IL-6 e IL-8 (MURAKAMI et al., 2002), as quimiocinas (YANG et al., 2002), constituem outro fator importante no desenvolvimento das inflamações intestinais, com recrutamento e ativação de células na mucosa inflamada.

As quimiocinas produzidas pelas células epiteliais intestinais são fundamentais no desenvolvimento dos infiltrados inflamatórios na colite ulcerativa (McCORMICK et al., 1993; ECKMANN et al., 1993a; McCORMICK et al., 1995), e são produzidas em resposta a produtos bacterianos e citocinas secretadas por diversas células inflamatórias, assim como células endoteliais e epiteliais (McCORMICK et al., 1993; ECKMANN et al., 1993a; ECKMANN et al., 1993b; ECKMANN et al., 1995; INATOMI et al., 2005). Estas proteínas são produzidas sob o estímulo de agonistas inflamatórios, podendo atrair e ativar vários tipos celulares e, portanto, participar dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese das DII (MacDERMOTT et al., 1998). Dependendo da quimiocina produzida, células que expressam receptores apropriados extravasam para o tecido alvo. O

repertório desses receptores está associado aos aspectos funcionais das células, como Th1 (CCR5 e CXCR3) e Th2 (CCR3 e CCR4; LOHMANN et al., 2002).

A capacidade das quimiocinas em induzir quimiotaxia, ativação de leucócitos, exocitose de grânulos, aumento da produção de metaloenzimas e do “burst” respiratório, indica que pode haver uma grande variedade de mecanismos envolvidos na exacerbação da inflamação crônica e na destruição do tecido intestinal (MacDERMOTT et al., 1998). Assim sendo, dependendo do estímulo, haverá a produção de determinadas quimiocinas que, por sua vez, atrairão determinado subtipo celular que poderá atuar inibindo ou induzindo a produção de outras moléculas quimiotáticas. A expressão de CXCL8 (IL-8) está relacionada à severidade da inflamação, com maior quimiotaxia de leucócitos para o cólon inflamado (KESHAVARZIAN et al., 1999). Da mesma forma, há expressão aumentada de CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CCL11 (eotaxina), CXCL10 (IP-10) e alguns receptores de quimiocinas, como CXCR3, em biópsias de cólon de pacientes com DII (GARCIA-ZEPEDA et al., 1996; Z’GRAGGEN et al., 1997; WEDEMEYER et al., 1999; UGUCCIONI et al., 1999). Portanto, a elucidação do papel das quimiocinas na imunopatogênese da DII, induzida em modelo experimental que mimetize as condições de indução e desenvolvimento da doença no homem, como após a ingestão de alimentos imunogênicos ao trato gastrointestinal, como o amendoim, facilitaria o desenvolvimento de agentes farmacológicos, capazes de inibir a síntese destas proteínas ou bloquear a ligação aos seus receptores. Novas terapias anti-quimiocinas poderiam reduzir ou suprimir o infiltrado de células imunes e inflamatórias na mucosa do cólon de pacientes com colite ulcerativa, diminuindo a severidade da inflamação e o quadro clínico da doença.

Todos esses processos inflamatórios e a resposta imune intestinal resultam no rompimento da barreira de mucosa, levando a maior exposição às bactérias entéricas e seus produtos, perpetuando o processo inflamatório (PODOLSKY, 1999).

A etiologia das DII ainda não é totalmente conhecida, mas parece resultar de uma série de interações complexas entre susceptibilidade genética, meio-ambiente e sistema imune (OLSEN et al., 1995; SCHREIBER, 2000; VIETH; TANNAPFEL, 2006). A presença de fatores genéticos já foi estabelecida, assim como fatores ambientais, incluindo a dieta do indivíduo (REIF et al., 1997; VAN DEN BOGAERDE et al., 2002). Indivíduos geneticamente susceptíveis ou com alterações no sistema imune de mucosa relacionadas a antígenos luminais são propensos a desenvolver colite ulcerativa (MURAKAMI et al., 2002). É provável também que mecanismos autoimunes com produção de autoanticorpos, induzam danos teciduais através de citotoxicidade mediada por anticorpos (SHEVACH, 1999). Estudos de DII em modelos animais e humanos sugerem haver uma hiperresponsividade aos constituintes normais do intestino como uma das várias causas da doença (SHEVACH, 1999). Ainda, é possível que exista uma desordem na permeabilidade intestinal que seja responsável pela inflamação, e esse mecanismo patológico pode ser desencadeado por vários agentes ambientais, incluindo agentes infecciosos e alimentos (SHANAHAN, 2001; SCHINKE et al., 2004; KORZENIK, 2005). Ainda não se sabe, porém, se a alteração na permeabilidade intestinal é um fenômeno primário (geneticamente determinado) ou secundário à inflamação local. No entanto, em ambos os casos, a alteração na função da barreira intestinal promove inflamação por permitir a penetração de antígenos luminais e ativar resposta imune.

Sendo assim, além de bactérias, hábitos alimentares, como o elevado consumo de sacarose ou gordura também podem estar associados a um maior risco de desenvolvimento

de DII (REIF et al., 1997). Outra fonte importante de estímulo antigênico potencial para o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) pode vir, ainda, de proteínas alimentares. Assim, conclui-se que existe uma associação entre o tipo de dieta e o subsequente desenvolvimento de colite ulcerativa ou doença de Crohn. Estes fatores podem exercer efeito primário em indivíduos predispostos ou modular o efeito de outros fatores ambientais ainda não identificados. A quebra do delicado balanço existente entre ativação crônica do sistema imune de mucosa e controle de autorreatividade pode desencadear imunidade ativa e levar a doenças como inflamação intestinal ou alergia alimentar (MAYER, 2003). Assim sendo, é estabelecido que componentes alimentares protéicos podem exercer um fator causal direto na doença celíaca e na alergia alimentar, além de contribuir para a perpetuação do processo inflamatório crônico de mucosa na DII (SEIBOLD, 2005).

Alergias são usualmente descritas como a capacidade de algumas proteínas em induzir respostas imunes mediadas particularmente por anticorpos IgE, sendo esta a principal característica das reações alérgicas alimentares (BETTS et al., 2004; XIE; HE, 2005). A alergia alimentar envolve diferentes sistemas orgânicos como o TGI, o cérebro, a pele, o trato respiratório e o sistema cardiovascular. Enquanto as manifestações dermatológicas e respiratórias são bem evidentes, as reações que se manifestam primeiramente no TGI são de difícil reconhecimento, diagnóstico e tratamento (BISCHOFF et al., 2005). As reações adversas a alimentos podem, ainda, desencadear conseqüências fatais como hipotensão e finalmente anafilaxia (METCALFE, 1991; FISCHER et al., 2005; SICHERER; LEUNG, 2005).

A alergia alimentar se constitui em uma das grandes causas de reações de hipersensibilidade fatais e, assim como outras formas de doenças atópicas, tem sua incidência e prevalência aumentadas nos últimos anos (SAMPSON, 2002; SAMPSON,

2004; STRID, 2004). Os sintomas típicos da alergia alimentar são náusea, vômito, dor abdominal e diarreia (AL-MUHSEN et al., 2003; BISCHOFF et al., 2005).

Vários fatores interferem no desenvolvimento e nas conseqüências da inflamação alérgica como bactérias, vírus e nutrientes; sendo que, dentre estes, o amendoim se destaca como o mais potencialmente fatal (SIMONS et al, 2005). Esta semente, assim como leite e ovos contribuem, em conjunto, com aproximadamente 80% das reações adversas a alimentos em pacientes com dermatite atópica (SAMPSON, 1983; BURKS et al., 1989). As reações alérgicas a amendoim tendem a persistir por toda a vida, ao contrário das reações a outros alimentos como leite, ovos e soja (DE JONG et al., 1998).

É sabido que a alergia alimentar, principalmente ao amendoim, é a maior causa de morte por choque anafilático nos países industrializados (YUNGINGER et al., 1989; BISCHOFF et al., 2005; PONS et al., 2005), sendo considerada reação alérgica estritamente mediada por IgE nos indivíduos susceptíveis. Nestas reações, os anticorpos IgE específicos ao amendoim se ligam aos seus receptores nos mastócitos e nos basófilos. A desgranulação dos mastócitos induz liberação de mediadores alérgicos que ativam as células do sistema imune a produzirem citocinas e quimiocinas que, por sua vez, ativam outras células inflamatórias que contribuem para resposta alérgica mediada por IgE (AL-MUHSEN et al., 2003).

Entretanto, as seqüências de eventos, as manifestações gastrintestinais das reações alimentares adversas assim como seu suposto papel na predisposição às DII, ainda não são totalmente esclarecidos, tornando-se necessária a confirmação experimental destes eventos em modelo de estudo que reproduza mais fielmente as condições de indução e desenvolvimento da inflamação intestinal que ocorre no homem.

A utilização de modelos animais como fonte de estudo para doenças inflamatórias de mucosa, especialmente as doenças inflamatórias intestinais, tem sido relatada há quase 50 anos (STROBER et al., 2002). Estes modelos oferecem a possibilidade de uma melhor compreensão dos mecanismos pró e anti-inflamatórios envolvidos nesta patologia, além de fornecer informações de como este processo poderia estar ocorrendo e ser resolvido em humanos. Modelos atuais de inflamação de mucosa intestinal refletem grande variedade de fatores causais (STROBER et al., 2002; ELSON et al., 2005). Normalmente, a inflamação resultante que se desenvolve é quase sempre a consequência de alterações genéticas, camundongos transgênicos ou administração de substâncias químicas irritantes nos animais em experimentação (STROBER et al., 2002; ELSON et al., 2005). Dentre os principais modelos atualmente utilizados para indução de DII, podem ser destacados aqueles nos quais a doença se desenvolve a partir da injeção intra-retal de TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) ou oxazalona, e utilização de animais deficientes para o receptor de células T (TCR) ou camundongos SCID (STROBER et al., 2002).

No entanto, os modelos experimentais de estudo das DII atualmente utilizados não mimetizam as formas de indução da doença como muitas vezes ocorre em pacientes. Nestes modelos, tanto as vias de administração, como as substâncias utilizadas para indução da inflamação e o uso de animais transgênicos ou deficientes de alguns genes, não reproduzem de maneira fiel a indução do processo inflamatório intestinal como ocorre em seres humanos. Nestes, o quadro clínico de indução e manutenção da doença pode ocorrer em condições naturais de agressão ao trato gastrointestinal, como após a ingestão de determinados alimentos. Ainda, nos modelos utilizados não é possível modular nem controlar a severidade da doença pela administração de alimentos, como ocorre após a quebra da tolerância de mucosa a antígenos alimentares na alergia alimentar humana

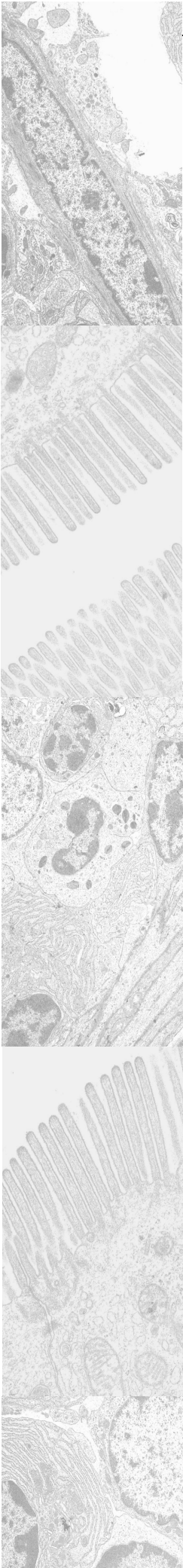
(BOUMA; STROBER, 2003). Além disso, modelos nos quais é utilizada a sensibilização e desafio dos animais com antígenos alimentares por via intraperitoneal não são satisfatórios e não refletem a alergia alimentar em humanos, que é causada por exposição da própria mucosa aos alérgenos. Dessa forma, nenhum dos modelos de indução de inflamação intestinal até então utilizados refletem os fatores causadores da doença que ocorre no homem, com o processo inflamatório desencadeado a partir da ingestão de determinados alimentos.

Um importante avanço nos estudos de inflamação intestinal associada à quebra da tolerância de mucosa por antígenos alimentares seria a descoberta e subsequente análise de novos modelos de inflamação intestinal que melhor mimetizassem a DII em humanos, com fator causal supostamente conhecido, após exposição a determinados antígenos alimentares.

Deste modo, tornou-se evidente a necessidade de desenvolvimento de um novo modelo para o estudo de DII, no qual se conhecesse o agente desencadeante, que este não fosse tóxico, que fizesse parte da alimentação dos animais e que reproduzisse com fidelidade o quadro patológico que ocorre no homem.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar um novo modelo murino de inflamação intestinal induzida por alimentos, fisiologicamente relevante, associado à intolerância a certos antígenos alimentares, como aqueles presentes nas sementes de amendoim, já sabidamente alergênicas. Com esse intuito foi desenvolvido um modelo de DII induzida por amendoim, alimento comumente presente na alimentação, altamente alergênico (TURCANU et al., 2003; SIMONS et al., 2005) e já relatado como provável causa de colite ulcerativa no homem (KEEFFE; GIRARD, 1985). O desenvolvimento desse modelo foi descrito recentemente por TEIXEIRA, 2003, sem, no entanto, aprofundar nos mecanismos envolvidos na indução das lesões. Na inflamação

induzida por amendoim, o animal entra em contato direto com o imunógeno e é desafiado posteriormente pela ingestão das sementes. Desta forma, considerando-se que o amendoim é o alimento e o antígeno, e a porta de entrada o trato gastrointestinal, esse modelo reproduz as condições que mais se aproximam do processo inflamatório intestinal que ocorre no homem após quebra da tolerância alimentar.



Objetivos

2. Objetivos

Com base nos dados de literatura e nas informações relatadas acima, é proposto como objetivo geral deste trabalho caracterizar e investigar a modulação da resposta imune em novo modelo de inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares. Para atender esse objetivo geral, pretendemos:

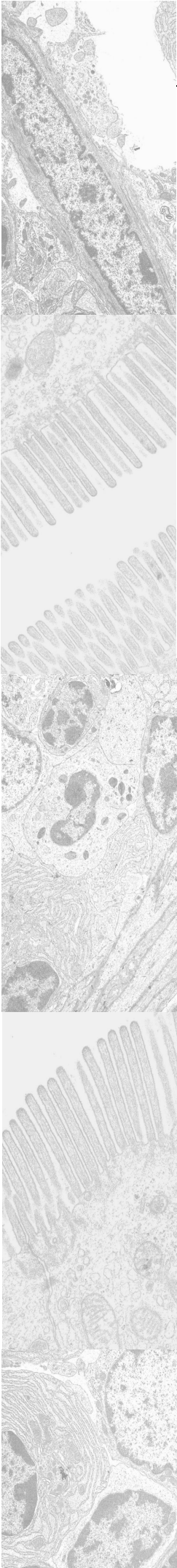
2.1. Caracterizar novo modelo de inflamação intestinal experimental, após imunização e exposição dos animais a proteínas de amendoim.

2.2 - Identificar e estudar a participação de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas, macrófagos, células *natural killer*, linfócitos B e T, durante o desenvolvimento do processo inflamatório intestinal.

2.3. Determinar o papel de imunoglobulinas na indução e modulação da inflamação por proteínas de amendoim.

2.4 - Estabelecer o padrão de expressão de fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas em segmentos de intestino dos animais submetidos à indução da doença por antígenos alimentares.

2.5 - Determinar o papel das células, imunoglobulinas e citocinas acima identificadas, na resistência ou susceptibilidade à doença através da indução da inflamação intestinal em animais geneticamente deficientes de células B, IFN- γ , IL-4 e IL-10.



Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens, B KO, IFN- γ KO, IL-4 KO e IL-10 KO, machos, com idade aproximada de 6 a 8 semanas, criados e mantidos no biotério da Área de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Os animais foram divididos em 4 grupos: *Não Imunizados (NI)*, composto por animais que receberam inóculo apenas de PBS e adjuvante Al(OH)₃, submetidos à dieta exclusiva com ração; *Dieta (D)*, animais que também receberam inóculo apenas de PBS e Al(OH)₃, porém submetidos à dieta composta por amendoim após o período experimental de imunizações; *Imunizados (I)*, animais imunizados com as proteínas extraídas das sementes de amendoim e Al(OH)₃, mas submetidos à dieta com ração e *Imunizados e Desafiados (I + D)*, animais submetidos ao protocolo de indução da doença, ou seja, imunizados com as proteínas na presença de adjuvante e posteriormente desafiados com alimentação composta exclusivamente por amendoim. Os camundongos foram mantidos com água *ad libitum* durante todo o experimento. Foram utilizados 3-5 animais por grupo. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela *Comissão de Ética em Experimentação Animal* da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, aprovação número 017/2004 (anexo 1).

3.2. Obtenção do extrato protéico de amendoim (EPA) e análise das proteínas por eletroforese

A extração das proteínas das sementes de amendoim foi realizada como descrita a seguir: as sementes foram moídas, peneiradas e misturadas a tampão borato de sódio 0,0125 M, pH 10, contendo 1% de SDS e 2% de 2-mercaptoetanol, na proporção de uma parte do material para dez de tampão (TEIXEIRA, 2003). Este material foi agitado delicadamente, por inversão, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 1000 x g, 4° C, por 30 minutos. O sobrenadante foi recolhido, a concentração protéica determinada e as proteínas submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (LAEMMLI, 1970) para análise do perfil protéico do extrato total das sementes. Para isso foi utilizado o sistema Bio Rad Mini Protean II System (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 80V por 2 h, na presença de tampão Tris-HCl 0,025 M contendo 0,192M de glicina e 0,1% de SDS. O padrão de peso molecular (Benchmark, Invitrogen) foi também submetido simultaneamente à eletroforese e as proteínas foram visualizadas após coloração do gel com o corante Coomassie Blue (CBB; Sigma, St Louis, MO, USA).

3.3. Indução da inflamação intestinal

No protocolo padrão de indução da inflamação intestinal (Figura 1), os animais selvagens, assim como aqueles geneticamente deficientes, receberam duas imunizações com o extrato protéico de amendoim (EPA), a primária com 1mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃], e a secundária, sem adjuvante. O intervalo entre as duas imunizações foi de 21 dias e ambas foram realizadas por via subcutânea, com 100 µg de EPA em volume final de

0,2 mL por animal. Decorridos 7 dias após a segunda imunização, os animais foram expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos, na ausência de outra fonte de alimentação. Após este período foram sacrificado e segmentos intestinais e sangue coletados para análises posteriores.

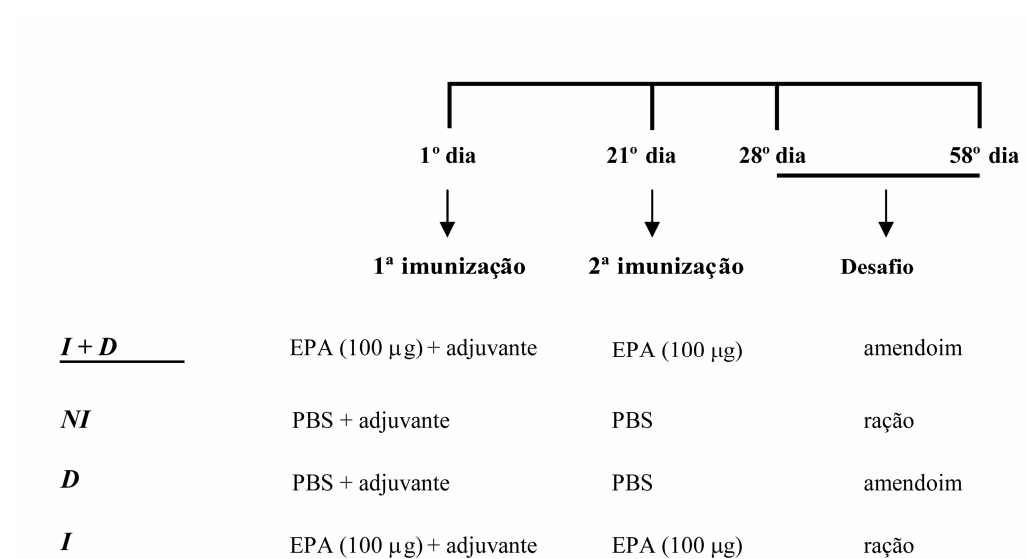


Figura 1. Protocolo de imunização e desafio para indução de inflamação intestinal por antígenos alimentares. *NI*, animais não imunizados com EPA e não submetidos à dieta com amendoim; *D*, não imunizados mas expostos às sementes; *I*, animais imunizados porém não desafiados com as sementes de amendoim; *I + D*, animais imunizados e desafiados com sementes de amendoim.

3.4. Monitoramento do peso dos animais e do consumo de amendoim

Para verificar se o processo inflamatório intestinal induzido levava à perda ou ganho de peso, os animais *I + D* foram pesados e acompanhados semanalmente, desde o 1º dia do experimento (1ª imunização) até o último dia de exposição à dieta, com o auxílio de uma balança eletrônica (Filizola, Brasil). A variação de peso ao final deste período foi também comparada ao peso dos animais no 1º dia de introdução da dieta com amendoim e expressa como porcentagem de aumento ou diminuição de peso em relação ao 1º dia de desafio com sementes de amendoim. Da mesma forma, o consumo das sementes foi monitorado semanalmente, nos grupos submetidos a esta dieta, *D*.

3.5. Coleta das amostras de tecido intestinal

As amostras foram coletadas realizando-se secções do intestino representativas do duodeno, jejuno, íleo e cólon, com o intuito de se determinar qual porção intestinal era afetada pelo processo inflamatório induzido por amendoim. Os segmentos removidos foram fixados em formaldeído a 10% em PBS ou excepcionalmente fixador de Carnoy (para coloração por azul de Alcian) e posteriormente processados para análise histopatológica. Segmentos de jejuno foram também coletados e imersos em meio de conservação de RNA (Trizol - Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) para posterior extração de RNA ou foram imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior trituração do órgão e dosagem de anticorpos por ELISA.

3.6. Análise histopatológica e morfométrica

Para avaliação e localização do processo inflamatório induzido por amendoim, os tecidos removidos e fixados foram incluídos em parafina e corados por hematoxilina-eosina (HE). Para quantificação de células caliciformes foram realizadas colorações com ácido periódico de Schiff (PAS); para eosinófilos, vermelho congo; para visualização de mastócitos de mucosa, azul de Alcian e para mastócitos de tecido conjuntivo, azul de toluidina. Foram avaliadas 20 bases/vilosidades dos segmentos de jejuno por animal, para quantificação das células, nos grupos controles e experimentais submetidos ao protocolo de indução da inflamação intestinal por antígenos alimentares.

3.7. Análise ultraestrutural de segmentos intestinais de animais imunizados e desafiados com sementes de amendoim - microscopia eletrônica de transmissão

Para realização dos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão, segmentos de jejuno dos animais dos grupos experimentais e controles foram coletados e imediatamente fixados em glutaraldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, a 4°C por 24 horas. Os segmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 2 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram desidratados através da passagem em concentrações crescentes de acetona e incluídos em resina Araldite[®] 502 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA). Cortes de 0,75 µm foram obtidos com navalha de vidro, corados com azul de toluidina e examinados em microscópio óptico para seleção das áreas posteriormente submetidas a cortes ultrafinos. Cortes de 20 a 40 nm obtidos com navalha de diamante em ultramicrotomo Sorvall MT-5000 (DuPont Company, Newtown, CT, EUA) foram colocados em grades de

cobre de 200 *mesh* (Polysciences Inc.), duplamente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, observados e fotografados em microscópio eletrônico Zeiss EM109 (Carl Zeiss) a 80 kV.

3.8. Quantificação do infiltrado celular por citometria de fluxo

Para quantificação e caracterização dos leucócitos presentes na inflamação intestinal induzida por amendoim, as células foram obtidas de acordo com o protocolo de BELKAID et al. (1996), com modificações. Brevemente, todo o intestino delgado dos animais dos grupos experimentais e controles foi cortado em pequenos fragmentos e imerso em meio de cultura RPMI incompleto (Gibco Life technologies, Grand Island, NY, USA) contendo 5 µg/mL do complexo enzimático Blendzyme CI (Roche-F. Hoffmann-La Roche Ltda, Basel, Switzerland). Após incubação por 1 hora a 37°C, os segmentos foram processados no homogeneizador de tecidos Medmachine (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) na presença de meio de cultura RPMI completo contendo 20% soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0.05% de DNase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Este material foi processado por 4 minutos, filtrado e a viabilidade celular determinada por azul de Tripán. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, lavadas em PBS gelado e incubadas por 30 min a 4° C com 0,5 µg (para 10⁶ células) de anticorpo monoclonal anti-CD16/CD32 (Fc block, Clone 2.4G2-Pharmlingen, San Jose, CA, USA), para bloqueio das ligações inespecíficas. Em seguida, foi realizada incubação com os anticorpos específicos (0,5 µg/ 10⁶ células) a 4° C e ao abrigo da luz. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD11b e anti-PanNK marcados com FITC (BD Biosciences Pharmlingen; San Jose, CA, USA), anti-CD19, anti-

GR-1 (BD Biosciences Pharmingen; San Jose, CA, USA), anti-CD11c e anti-CD8 conjugados a PE (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA), anti-CCR3 biotinizado (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) e estreptoavidina-PE (Gibco Life technologies, Grand Island, NY, USA), além de anticorpos anti-CD4 PerCP (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA). Após a marcação, as células foram fixadas em formaldeído a 1% em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACScan™ e programa CELLQuest™; BD Biosciences PharMingen San Jose, CA, USA). As células foram adquiridas (2×10^4 eventos/tubo) de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e depois selecionadas em 3 diferentes regiões: *gate 1* (R1) para análise de linfócitos, *gate 2* (R2) para monócitos e granulócitos e *gate 3* (R1 + R2) para detecção de células Pan NK⁺ e CD8⁺. Marcações simples ou duplas foram utilizadas para identificação de células T CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, linfócitos B (CD19⁺), células CD8⁺, macrófagos (CD11b⁺), células dendríticas (CD11c⁺CD11b⁺), neutrófilos (Gr1⁺), eosinófilos ativados (em R2, CCR3⁺CD4⁺) e células *natural killer* (Pan NK⁺). Os isotipos controles utilizados foram IgG2a de rato-PerCP, IgG2b de rato-FITC e IgG1 de rato-PE (BD Biosciences PharMingen). Os resultados foram mostrados como média \pm EPM do número total de células obtidas do intestino delgado de 5 animais diferentes por grupo, e a porcentagem de cada subpopulação especificamente marcada dentro de cada *gate* selecionada.

3.9. Obtenção de soro, homogenato de intestino e dosagem de anticorpos específicos a EPA

Para verificar se os animais imunizados com EPA respondiam e como era a resposta de anticorpos frente aos antígenos inoculados, foram realizadas dosagens de anticorpos específicos às proteínas de amendoim no soro e no homogenato de intestino dos animais em experimentação. Para tal, os soros foram obtidos após coleta de sangue e centrifugação a 1300 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente e utilizados para quantificação dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2a e IgE específicos a EPA por ELISA. As concentrações de IgA foram determinadas também através de ensaios imunoenzimáticos em homogenados de intestino delgado dos camundongos experimentais e controles, após trituração dos tecidos em PBS contendo 2 mM do inibidor de proteases PMSF.

Placas de ELISA de baixa afinidade foram sensibilizadas com EPA (20 µg/poço) e incubadas *overnight* a 4° C. Após este período, foram lavadas sucessivamente com PBS/Tween 0,05% e incubadas com PBS/gelatina 1% por 1 hora a temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Após este período, as placas foram lavadas, incubadas com os soros dos animais diluídos 1:100 em PBS/gelatina 1% ou com 50 µL da solução do homogenato (para dosagem de IgA) e deixadas a 37°C por 2 horas. Em seguida, foram novamente lavadas e foram adicionados os anticorpos específicos na diluição 1: 2000. Para detecção de IgA, IgG1, IgG2a e IgE, as placas foram incubadas com anticorpos de coelho (anti-IgA, anti-IgG1 e anti-IgG2a, Zymed, California, USA) ou rato (anti-IgE, eBioscience, San Diego, CA, USA) biotinizados por 1 hora a 37° C, seguida por incubação com anticorpos anti-coelho (Pierce, Rockford, USA) ou anti-rato (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) conjugados a peroxidase, diluídos em

PBS/gelatina 1% (1:2000). Após 1 hora de incubação a 37° C, as placas foram lavadas e foi adicionada a solução substrato-cromógeno contendo 3, 3',5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB; KPL, Gaithersburg, MD, USA) para revelação das reações. Após alguns minutos, a revelação foi interrompida com H₂SO₄ 2N, e a leitura das placas foi realizada a 450 nm em leitor de ELISA (Microplate ELISA Reader, SoftMax program, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.10. Quantificação da expressão de mensagens para fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares

3.10.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) e kit para extração de RNA (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, para cada amostra, em um tubo tipo *ependorf*, foi adicionado o reagente Trizol (1 ml/mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Sigma, St Louis, MO, USA) e os tubos centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescentado etanol 70% em proporções iguais à amostra (v:v). A solução amostra/etanol foi agitada delicadamente e transferida para uma coluna de afinidade para RNA. Foram adicionados tampões específicos, intercalados por rápidas centrifugações por 15 segundos a 8000 x g cada. Finalmente, após várias lavagens com estes diferentes tampões, as amostras de RNA foram eluídas da coluna com 30 µl de água deionizada e

livre de RNase, sendo armazenadas a -70°C , até a confecção do DNA complementar. Uma alíquota de $5\mu\text{l}$ foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA/ μl nas amostras, determinada utilizando-se o aparelho Biomate 3 spectrophotometer Thermospectronic (Rochester, NY, USA).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de transcriptase reversa (Superscript II, Gibco Life Tech.) e $1\mu\text{g}$ de RNA, de acordo com as especificações do fabricante.

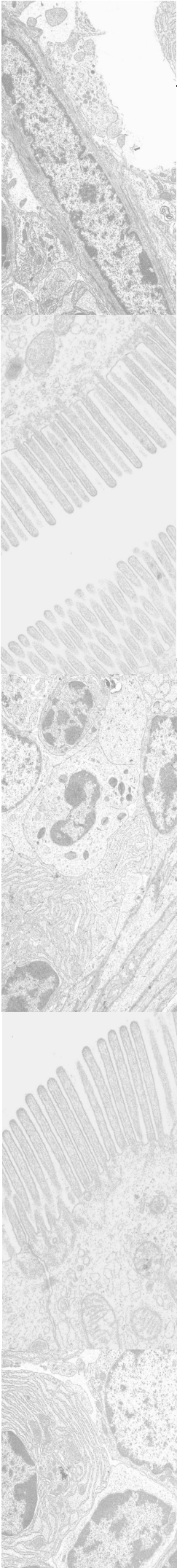
3.10.2. Quantificação das mensagens por reações de Real Time PCR

A expressão quantitativa de genes de fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas foi analisada através de reações de Real Time PCR, utilizando-se o sistema SYBR Green e o aparelho ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Esse sistema (ABI Prism Software) realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação as amostras através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo a expressão normalizada com base em controles endógenos. *Primers* adequados para tais reações foram criados a partir do programa Primer Express (Applied Biosystems, Warrington, UK), específico para esta tarefa (Tabela 1, anexo). O DNA complementar ($2,5\text{ ng/reação}$) sintetizado a partir do RNA mensageiro e *primers* específicos ($1-2\ \mu\text{g/reação}$) foram utilizados juntamente com reagentes SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK), como determinado pelo fabricante. As reações compreenderam 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C , e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 56°C . Um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos

produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. As condições de PCR para cada *primer* utilizado foram padronizadas de acordo com a concentração do *primer*, ausência de formação de dímeros e eficiência de amplificação dos genes alvos e controle interno (gene constitutivo). A positividade das reações foi determinada baseada em controles negativos, ou seja, animais que não sofreram nenhuma intervenção experimental, nem mesmo inóculos de PBS e adjuvante. Os resultados foram analisados com base no valor de TC (ciclo limiar) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar, que permitiu a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Os cálculos para determinação da expressão relativa dos genes alvo foram realizados de acordo com instruções contidas no “User’s Bulletin” (P/N 4303859, Applied Biosystems), normalizando os dados em relação à expressão constitutiva de β -actina em cada amostra.

3.11. Análise estatística

Para avaliar as diferenças dos processos de inflamação intestinal entre os grupos experimentais e controles, foram utilizados a Análise da Variância ANOVA, e o Teste de Tukey como pós-teste. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (*).



Resultados

4. Resultados

Com a finalidade de desenvolver um modelo que melhor reproduzisse condições fisiológicas de indução do quadro inflamatório que ocorre em doenças intestinais no homem, estudamos a inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares como as proteínas de amendoim, alimento comumente presente na alimentação e já relatado como provável causa de colite ulcerativa no homem. Na inflamação induzida dessa forma, os animais entraram em contato direto com o imunógeno e foram posteriormente desafiados pela ingestão das sementes.

4.1. Indução e caracterização do processo inflamatório intestinal em animais selvagens (WT) C57BL/6

4.1.1. Obtenção do extrato protéico de amendoim e eletroforese: estabelecimento do protocolo de imunização

Com o objetivo de caracterizar o novo modelo de inflamação intestinal foram estabelecidos, primeiramente, os antígenos alimentares que poderiam ser utilizados para este fim. Dessa forma, as sementes de amendoim e suas proteínas foram eleitas, devido a seu grande consumo pela população mundial e suas propriedades altamente alergênicas já amplamente descritas. Além disso, as sementes de amendoim se constituem numa fonte natural de alimentação para roedores como camundongos.

Após obtenção do EPA em tampão borato de sódio, o perfil eletroforético das proteínas foi visualizado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%), corado por Coomassie Blue. Foram observadas diversas proteínas, com peso molecular aparente

variando de 10 a 65 kDa (Figura 2). Dentre estas proteínas, três possuem possivelmente o mesmo perfil eletroforético de alguns alérgenos de amendoim já descritos, Ara h 1 (63 kDa), Ara h 2 (17-20 kDa) e Ara h 3 (14-45 kDa, KOPPELMAN et al, 2004) (Figura 2). Assim sendo, este extrato protéico (EPA) foi utilizado em todos os protocolos experimentais (Figura 1), como fonte antigênica para imunização dos camundongos e indução da inflamação intestinal, após desafio com as sementes de amendoim.

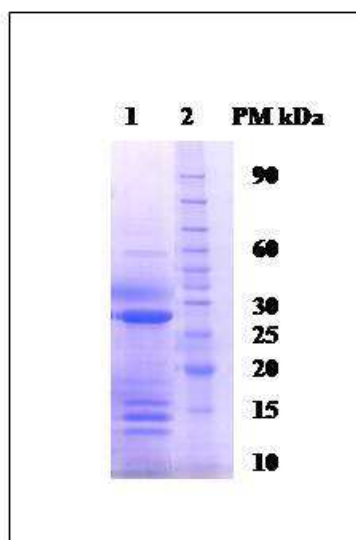


Figura 2. Perfil eletroforético do extrato protéico de amendoim (EPA). As sementes foram moídas e as proteínas extraídas em tampão borato de sódio 0,0125M. O extrato total foi desnaturado a 95° C por 5 minutos em tampão de amostra e as proteínas foram visualizadas em SDS-PAGE 12,5% após fixação e coloração por Coomassie Blue. Na pista (1) extrato protéico de amendoim e em (2) padrão de peso molecular (PM, 10-90 kDa).

4.1.2. Imunização com EPA e desafio com sementes de amendoim induz perda de peso em camundongos C57BL/6

Durante o desenvolvimento de processos inflamatórios intestinais, parâmetros clínicos como perda de peso e outros se constituem em pontos críticos a serem avaliados como uma das formas de se estabelecer o diagnóstico e, principalmente, o prognóstico destas patologias. Dessa forma, assim como caracterizado em outros modelos experimentais de DII, avaliamos se a imunização dos camundongos com EPA seguida por desafio com as sementes de amendoim poderia levar ao desenvolvimento de inflamação intestinal. Para tal, os animais foram pesados semanalmente e observados quanto à presença de diarreia, sangramento intestinal ou prolapso retal.

Foi observado que animais do grupo experimental *I + D*, assim como aqueles do grupo controle *D*, ambos submetidos à dieta com amendoim, apresentaram grande perda de peso durante o período experimental, especialmente 30 dias após a introdução das sementes de amendoim na sua alimentação (Figuras 3A e 3C). Esta perda foi estatisticamente significativa, principalmente quando comparada ao controle *I*, no 30º dia de dieta (*D vs I*; *I + D vs I*, $p < 0,05$). Além disso, a perda de peso nestes animais foi acompanhada por redução no consumo das sementes de amendoim por ambos os grupos *D* e *I + D*, como verificado durante a fase de desafio do período experimental (Figura 3B). Não foram detectados sinais de diarreia, sangramento intestinal ou prolapso retal nos animais avaliados, durante o protocolo experimental.

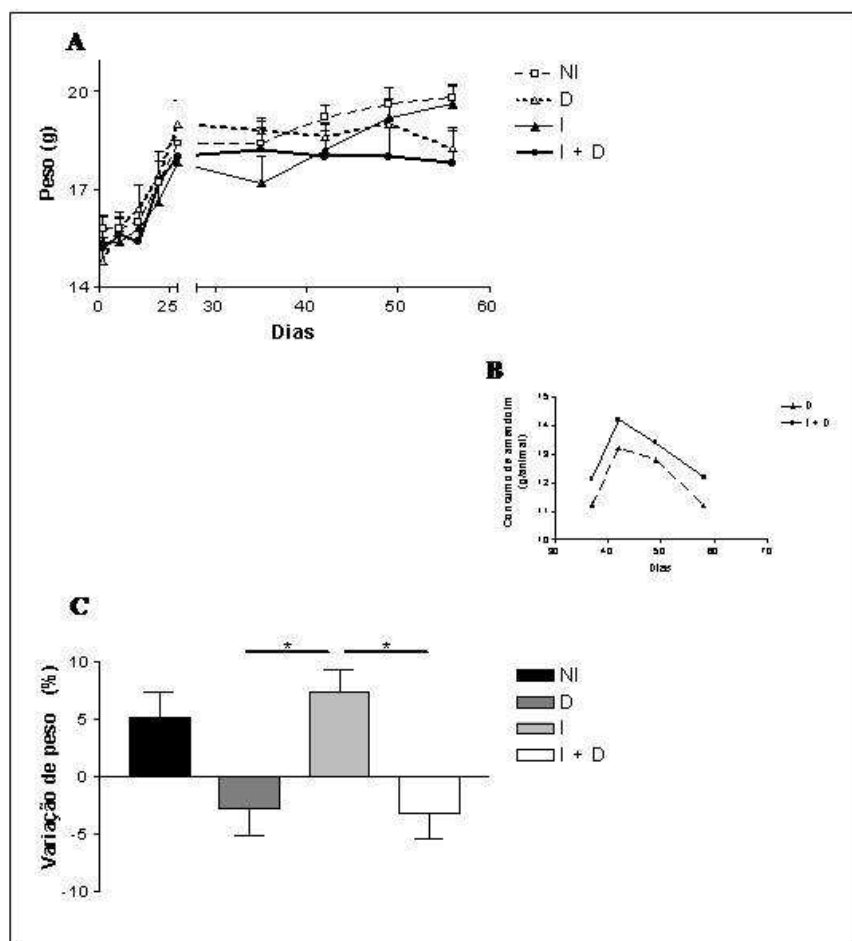


Figura 3. Variação de peso durante o período de imunização com EPA e após desafio com as sementes de amendoim. Camundongos CS7BL/6 foram imunizados e expostos à dieta exclusiva com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Os gráficos representam a média \pm EFM do aumento ou perda de peso (A), que foi monitorado semanalmente e, após 30 dias de dieta, comparado ao 1º dia de exposição às sementes de amendoim (C) nos grupos controles NI, D e I e experimental I + D. Em (B), consumo das sementes por animais expostos ao amendoim na alimentação. Os dados são representativos de 5 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

4.1.3. Análise histopatológica de segmentos intestinais de animais imunizados e desafiados com sementes de amendoim

Para determinarmos se a perda de peso nos animais submetidos à dieta com amendoim poderia estar relacionada a danos teciduais causados pelo consumo das sementes, na presença ou ausência de imunização prévia, segmentos de intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e grosso (cólon) foram coletados, fixados e processados para análise histopatológica. Como demonstrado na Figura 4, apenas os animais imunizados e desafiados com sementes de amendoim (*I + D*) desenvolveram inflamação intestinal, caracterizada por infiltrado leucocitário, edema exuberante e deformidade das vilosidades em todos os segmentos do intestino delgado, em especial no jejuno. Ainda, foi observado discreto aumento do infiltrado inflamatório e da espessura dos segmentos de cólon dos animais do grupo experimental *I + D*. Por outro lado, não foram observadas alterações histopatológicas significativas nos camundongos dos grupos controles *NI*, *D* e *I*. Estes animais apresentaram manutenção da arquitetura e da morfologia intestinal, com vilosidades intestinais altas e afiladas, integridade da camada epitelial e poucas células inflamatórias na mucosa intestinal, com discreta presença de edema nos segmentos de duodeno dos animais dos grupos controles *D* e *I*, ao final do período experimental (Figura 4).

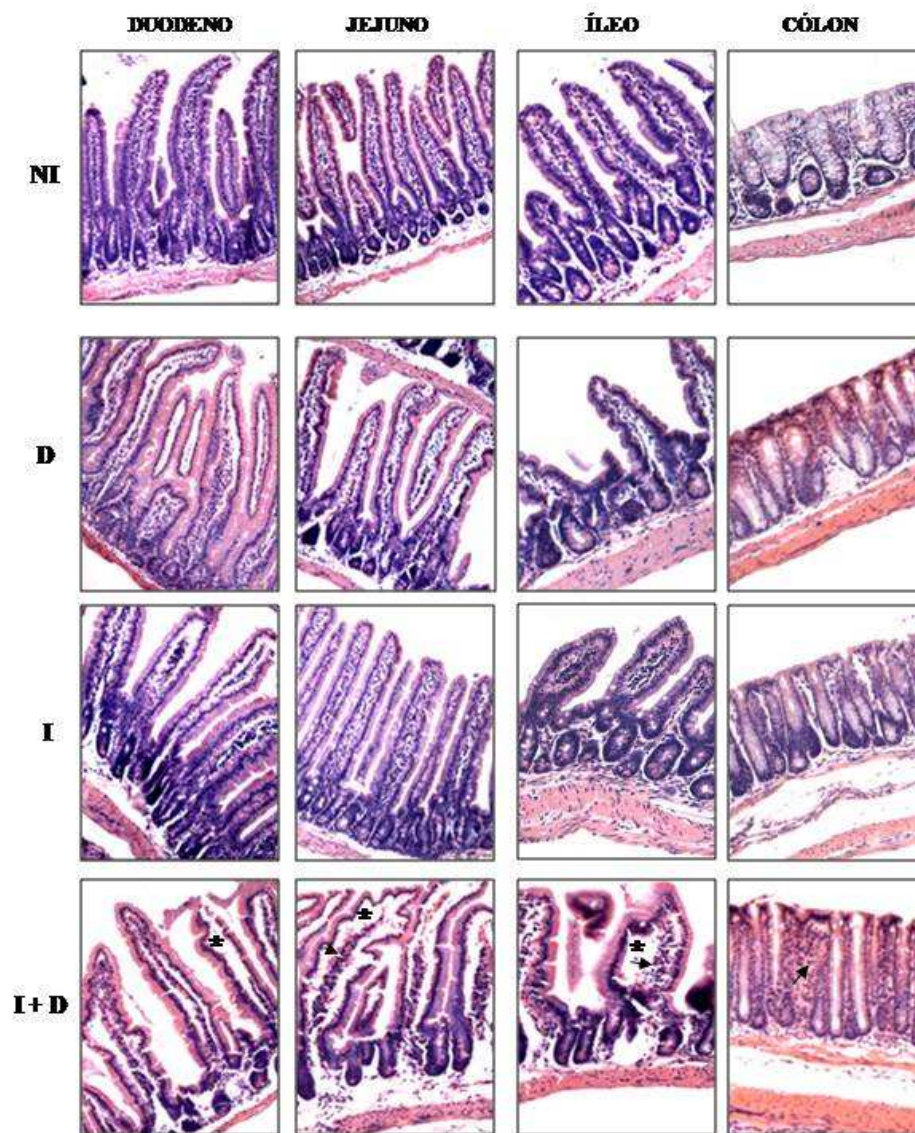
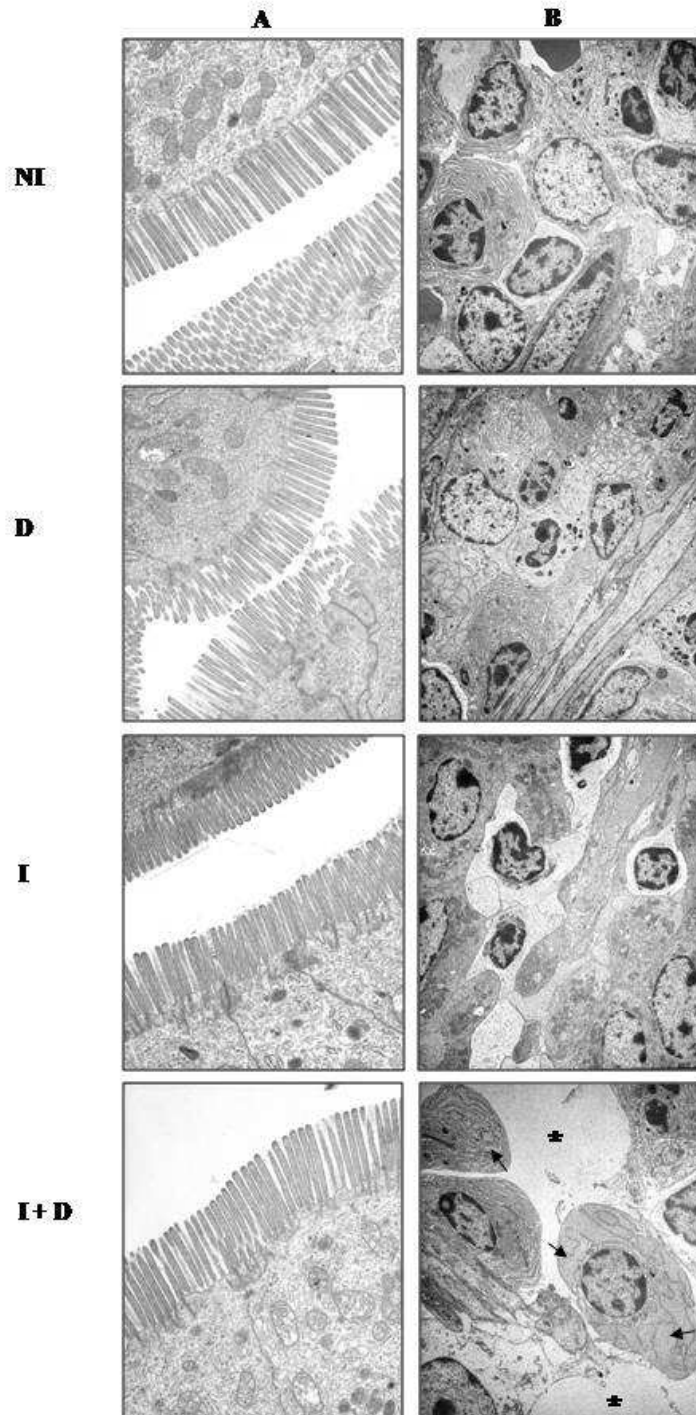


Figura 4. Inflamação intestinal é induzida no grupo experimental imunizado e desafiado com as sementes de amendoim. O processo inflamatório foi induzido nos animais selvagens C57BL/6 após imunização e exposição às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos (*I + D*). Os grupos controles (*NI*, *D* e *I*) foram submetidos a diferentes protocolos, na presença ou ausência de imunização ou dieta com amendoim. Segmentos intestinais correspondentes ao duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletados, fixados em formaldeído a 10% em PBS, incluídos em parafina e os cortes corados por hematoxilina-eosina. Nota-se presença de infiltrado inflamatório (seta), edema exuberante e deformidade das vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e íleo em *I + D* (*). Discreto aumento de leucócitos teciduais e da espessura do cólon são também observados nos animais do grupo experimental *I + D*. Nos controles, observam-se vilosidades intestinais altas e afiladas, integridade da camada epitelial, poucas células inflamatórias e ausência de edema. Aumento original: duodeno, jejuno e íleo, 20X; cólon, 10X.

4.1.4. Análise ultraestrutural de segmentos intestinais de animais imunizados e desafiados com sementes de amendoim

Com o objetivo de realizarmos um estudo mais detalhado das alterações morfológicas e estruturais das vilosidades intestinais inflamadas, amostras representativas de jejuno de animais dos grupos controles *NI*, *D* e *I* do grupo experimental *I + D* foram coletadas e processadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão.

Como notado na Figura 5A, não foram detectadas alterações estruturais visíveis na superfície de microvilos dos enterócitos das vilosidades intestinais, em nenhum dos grupos controles ou experimental. Por outro lado, ao avaliar-se o núcleo das vilosidades, foi claramente observado aumento do infiltrado plasmocitário, evidenciando-se retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas (Figura 5B, *I + D*), além da presença marcante de edema no interior das vilosidades dos animais imunizados e desafiados com as sementes de amendoim (Figura 5B, *I + D*), quando comparados aos demais grupos. Estes dados sugerem um possível papel para estas células ou seus produtos na patogênese da inflamação intestinal induzida pelos antígenos alimentares em questão.



38

Figura 5. Análise ultraestrutural dos enterócitos e vilosidades intestinais após indução da inflamação intestinal. Camundongos C57BL/6 foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias. Após este período foram sacrificados e fragmentos intestinais coletados e processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Foram avaliados segmentos de jejuno dos grupos controles *NI*, *D* e *I* e do grupo experimental *I + D*. Em (A) microvilos na superfície dos enterócitos. Observa-se ausência de alterações significativas entre os grupos controles e o grupo experimental. Em (B) núcleo das vilosidades. Nota-se a presença diferencial de edema (*) e infiltrado de plasmócitos evidenciando-se retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas no grupo experimental *I + D* (seta). Aumento original: (A) 12000X, (B) 3000X.

4.1.5. Quantificação de eosinófilos, mastócitos e células caliciformes nos tecidos inflamados, por análise morfométrica

Com o objetivo de se identificar e caracterizar o infiltrado celular presente na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares supostamente alergênicos, os tecidos coletados dos animais submetidos à indução do processo inflamatório por proteínas de amendoim foram coletados e processados para quantificação das células presentes. Foram realizadas colorações específicas para mastócitos de submucosa - tecido conjuntivo (azul de toluidina), mastócitos de mucosa (azul de Alcian) e eosinófilos (vermelho congo).

Como mostrado na Figura 6A, verificou-se aumento estatisticamente significativo de mastócitos de tecido conjuntivo nos segmentos de jejuno dos animais inflamados (*I + D*) quando comparados aos grupos controles *NI*, *D* e *I* ($p < 0,05$). Por outro lado, ao serem quantificados mastócitos de mucosa intestinal, observamos aumento estatisticamente significativo destas células nos animais do grupo *D*, não imunizados com as proteínas, porém submetidos à dieta exclusiva com amendoim, por 30 dias, quando comparados ao controle *I* (Figura 6B, $p < 0,05$). Os animais imunizados com EPA e desafiados com as sementes de amendoim na alimentação também apresentaram aumento significativo de eosinófilos nos segmentos de jejuno, quando comparados aos controles *NI* e *D* (Figura 6C, $p < 0,05$). Foram também observadas diferenças estatisticamente significativas no aumento do número de eosinófilos nos animais imunizados (*I*) quando comparados aos grupos *D* e *NI*, assim como maior detecção dessas células em *D*, ao compararmos com *NI* (Figura 6C, $p < 0,05$).

Não foram observadas alterações significativas no número de células caliciformes presentes nos segmentos intestinais inflamados dos animais imunizados e desafiados, quando comparados aos controles (Figura 6D).

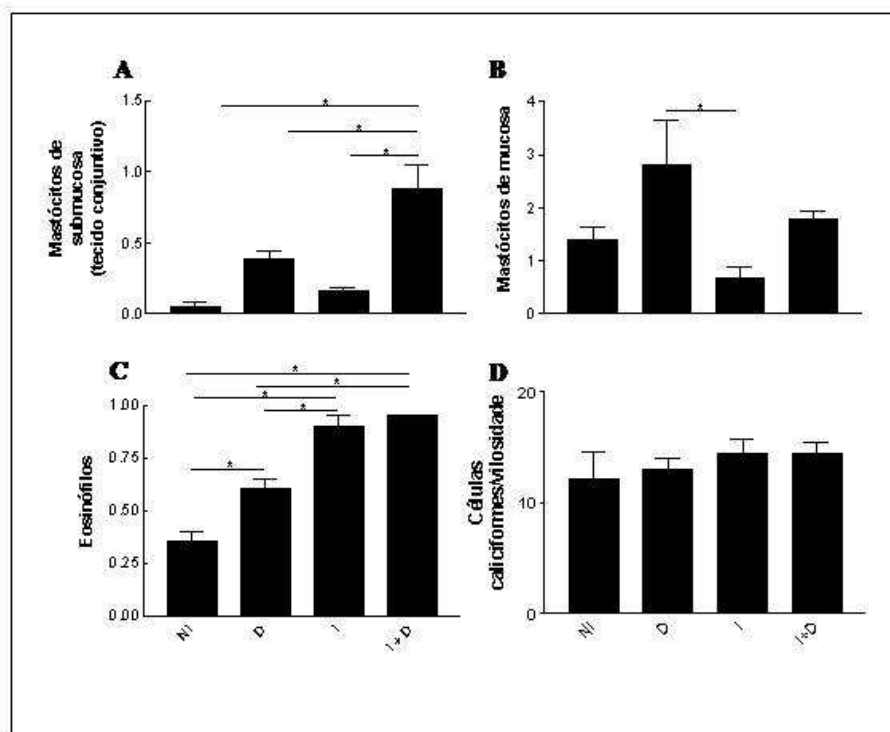


Figura 6. Morfometria das vilosidades intestinais. Camundongos C57BL/6 foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias. Após este período foram sacrificados e os fragmentos intestinais coletados e processados para análise histopatológica. Os gráficos representam a média \pm EPM da contagem diferencial (20 bases/vilosidades) de mastócitos de tecido conjuntivo (A, azul de toluidina), de mucosa (B, azul de Alcian), eosinófilos (C, vermelho congou) e células calcifórmes (D, FAS) nos segmentos de jejuno dos grupos controles NI, D e I e do grupo experimental I+D. Os dados são representativos de 5 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.1.6. Quantificação do infiltrado celular por citometria de fluxo

Após quantificarmos eosinófilos, mastócitos e células produtoras de muco por morfometria, o processo inflamatório foi induzido em camundongos C57BL/6 e todo o intestino delgado foi coletado para análise dos outros tipos celulares (leucócitos) presentes no intestino, por citometria de fluxo. Os segmentos intestinais passaram por um processo de digestão enzimática para extração das células dos tecidos, contagem em câmara de Neubauer e marcação com anticorpos específicos ligados aos fluorocromos FITC, PerCP e PE. As aquisições foram feitas em citômetro de fluxo e as análises realizadas com a utilização do programa “CELLQuest”.

Como demonstrado na Figura 7A, camundongos imunizados e expostos às sementes de amendoim apresentaram aumento evidente no número total de células obtidas após digestão enzimática dos tecidos, quando comparados aos controles *NI*, *D* e *I* (Figura 7A, $p < 0,05$). Para se determinar qual população celular era predominante nesses tecidos inflamados, as células foram especificamente marcadas com anticorpos monoclonais e analisadas por citometria de fluxo (Figuras 7B-H).

Os animais imunizados e desafiados *I + D* apresentaram baixa porcentagem de linfócitos T, quando comparados aos controles *D* e *I* (Figura 7C, *D* vs *I + D*, $p < 0,05$). O grupo controle *D* apresentou aumento de linfócitos T CD3⁺, estatisticamente significativo quando comparado ao grupo de animais *NI* (Figura 7C, $p < 0,05$). Foi observado também aumento na porcentagem de células CD8⁺ em R1 + R2, estatisticamente significativo quando comparado aos controles *NI* e *D* (Figura 7D, $p < 0,05$). Além disso, foi observada maior população de linfócitos B CD19⁺ (Figura 7E, *I + D* vs *NI*, $p < 0,05$) e células dendríticas (Figura 7F, *I + D* vs *NI* e *I + D* vs *D*, $p < 0,05$) no intestino delgado dos animais *I + D*. Ainda, foi notado aumento na porcentagem da população de células *natural killer* no

grupo experimental *I + D* e no controle *I*, quando comparados aos outros controles (Figura 7G, *I + D* vs *NI*, *I* vs *NI* e *I* vs *D*, $p < 0,05$). Foi também verificado aumento no número de eosinófilos ativados ($CCR3^+CD4^+$ em R2) nos segmentos intestinais de ambos os grupos imunizados *I + D* e *I* (Figura 7H). Embora estatisticamente não significativos, estes dados corroboram com os resultados obtidos anteriormente na análise morfométrica de eosinófilos (Figura 6C). Houve também nos tecidos inflamados aumento na população de macrófagos $CD11b^+$ e não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de células $GR-1^+$ (neutrófilos) ou $CD4^+$ entre os animais experimentais e controles (dados não mostrados).

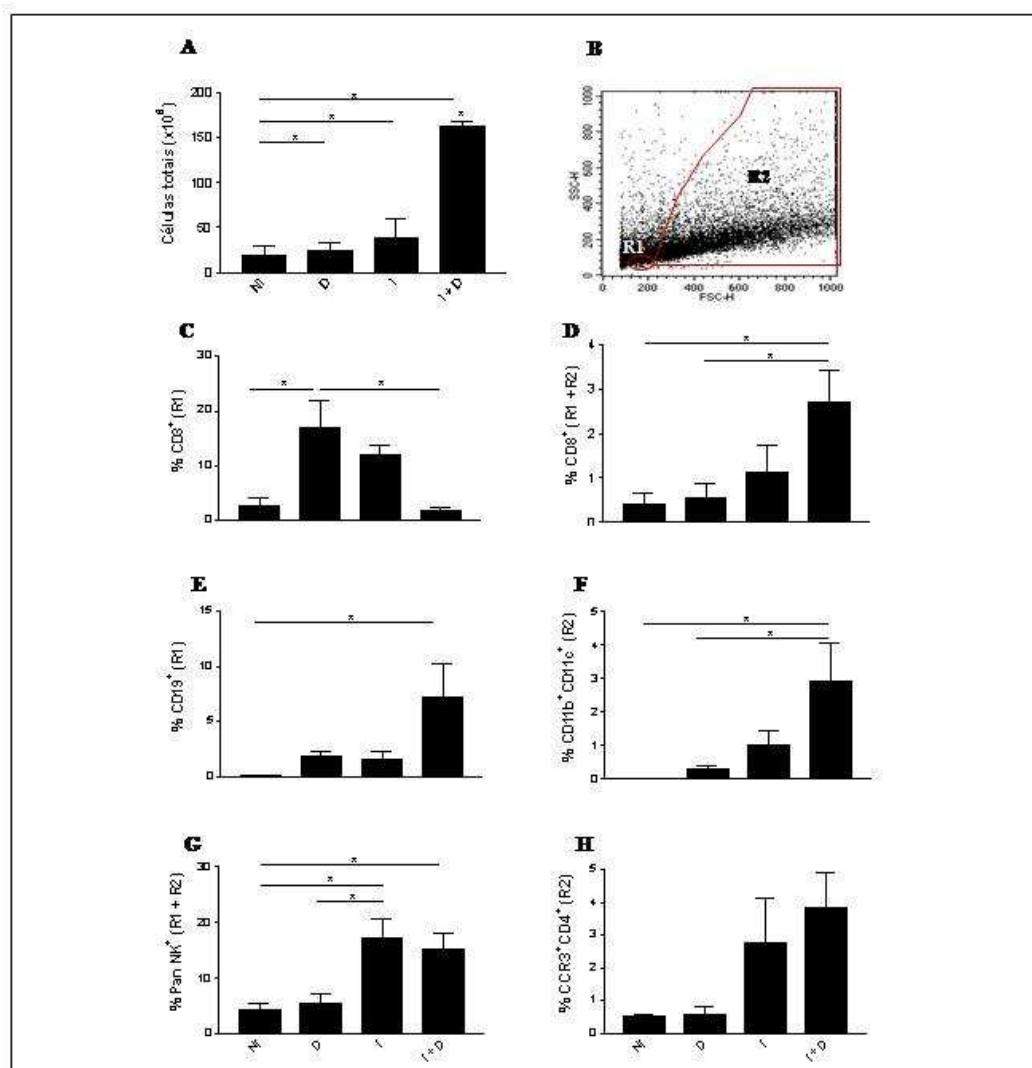


Figura 7. Quantificação do infiltrado celular na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares. O processo inflamatório foi induzido em camundongos C57BL/6 após imunização e exposição às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, o intestino delgado dos animais dos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I + D) foi coletado e processado para análise por citometria de fluxo. Os gráficos representam a média \pm EPM da quantificação das células totais obtidas dos segmentos intestinais (A), nas quais foram realizadas marcações específicas para detecção das células CD3⁺ (C), CD8⁺ (D), CD19⁺ (E), CD11b⁺CD11c⁺ (F), Pan NK⁺ (G) e CCR3⁺CD4⁺ em R2 (H). Em (B), análise do infiltrado celular de acordo com os parâmetros tamanho e granulosidade, e localização das regiões R1 e R2, onde foram quantificados os leucócitos acima descritos. * p < 0,05.

4.1.7. Produção de imunoglobulinas em resposta ao EPA

A presença de células precursoras ou produtoras de imunoglobulinas no infiltrado inflamatório do intestino delgado dos animais imunizados e desafiados nos levou à hipótese de que poderia haver participação de anticorpos na patogênese da inflamação intestinal induzida por EPA e sementes de amendoim. Logo, com o objetivo de investigar se havia produção de imunoglobulinas específicos a EPA durante o desenvolvimento do processo inflamatório intestinal, foram dosados anticorpos anti-EPA no soro e no homogenato de intestino dos grupos experimentais e controles.

Os resultados demonstraram que em ambos os grupos imunizados *I* e *I + D* houve alta produção de anticorpos IgG anti-EPA no soro, quando comparados aos controles *NI* e *D*. (Figure 8A, *I + D* vs *NI*; *I + D* vs *D*; *I* vs *NI* e *I* vs *D*, $p < 0,05$). Visto que as proteínas de amendoim são descritas como alguns dos antígenos mais frequentemente associados a respostas inflamatórias alérgicas em indivíduos susceptíveis, questionamos então se a inflamação intestinal observada poderia estar relacionada a respostas Th2 ou alérgicas montadas frente ao EPA. Como demonstrado na Figura 8B, não houve diferença na detecção de anticorpos IgG2a no soro dos grupos analisados. Por outro lado, observou-se elevada produção dos anticorpos de padrão Th2 IgG1 no soro de camundongos imunizados (*I*) e imunizados e desafiados (*I + D*), estatisticamente significativa quando comparada à produção nos controles *NI* e *D* (Figure 8C, *I + D* vs *NI*; *I + D* vs *D*; *I* vs *NI* e *I* vs *D*, $p < 0,05$). Ainda, animais do grupo experimental *I + D* apresentaram altos níveis de IgE sérica específica a EPA, resultados também estatisticamente significativos em relação aos controles *NI* e *D* (Figura 8D $p < 0,05$). Embora tenha havido tendência ao aumento de IgE no grupo *I*, as diferenças não foram significativas (Figura 8D). Foram realizadas dosagens

de IgA específica a EPA no homogenato do intestino delgado dos animais em experimentação e, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente relevantes, os resultados demonstraram tendência à diminuição da produção desta imunoglobulina no intestino dos animais expostos às sementes de amendoim, *D* e *I + D* (Figura 8E).

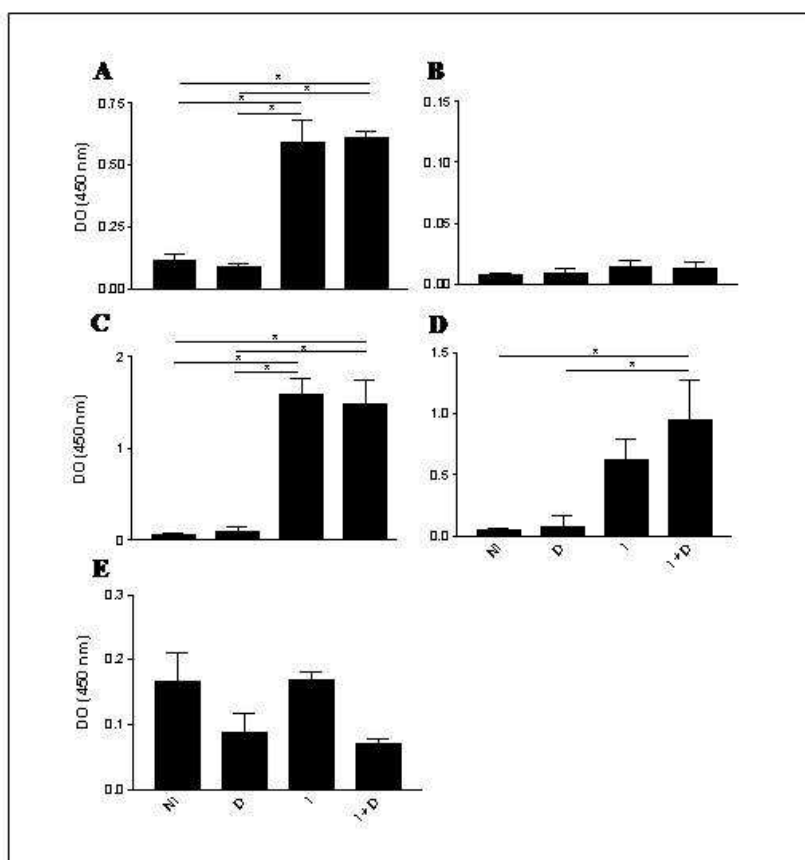


Figura 8. Detecção de anticorpos específicos ao EPA em animais expostos e não expostos ao amendoim. Camundongos C57BL/6 foram imunizados e submetidos à dieta com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, foram sacrificados e o sangue coletado para obtenção de soro e quantificação de imunoglobulinas. Os gráficos representam a média \pm EPM das dosagens de IgG (A), IgG2a (B), IgG1 (C) e IgE (D) específicas ao extrato protéico de amendoim, nos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I + D). Em (E), detecção de IgA específica a EPA em homogenato do intestino delgado dos camundongos controles e experimentais. Os dados são representativos de 5 experimentos independentes. DO: densidade óptica. * $p < 0,05$.

4.1.8. Determinação do padrão de expressão de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e fatores de transcrição na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares

Para melhor compreensão da modulação da resposta imune na patogênese da inflamação intestinal, foi investigado o envolvimento de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e fatores de transcrição no desenvolvimento da resposta inflamatória induzida por antígenos alimentares. Para tal, após coleta de segmentos de jejuno, extração de RNA e confecção de cDNA, as amostras dos grupos experimentais e controles foram submetidas a reações de Real Time PCR, através da utilização de *primers* específicos e o sistema SYBR Green.

Não foram observadas diferenças na expressão de RNAm para o fator de transcrição T-Bet entre os grupos experimentais e controles (Figura 9A). Por outro lado, camundongos imunizados com EPA e desafiado com as sementes exibiram alta expressão de mensagens para o fator de transcrição Gata-3, importante para a transcrição de genes de citocinas de padrão T helper 2 (Th2). Estas diferenças foram estatisticamente significativas quando comparadas aos controles *NI*, *D* e *I* (Figura 9B, $P < 0,05$). Ainda, foram detectados altos níveis de expressão de IL-4 nos animais *I + D*, também estatisticamente significativa quando comparada aos controles *NI*, *D* e *I* (Figura 9C, $p < 0,05$). Corroborando com estes resultados, observou-se aumento de expressão de RNAm para a citocina IL-13 nos animais experimentais *I + D*, estatisticamente significativo quando comparado à expressão no jejuno de camundongos controles *NI* (Figura 9E, $p < 0,05$). Não houve diferença de expressão do gene da citocina IL-5 entre os grupos analisados (Figura 9D). Ao avaliarmos a expressão gênica de TNF- α , observamos também alta detecção de mensagens nos grupos *D*

e $I + D$, embora estatisticamente significativo apenas quando comparados $I + D$ vs NI e $I + D$ vs I (Figura 9F, $p < 0,05$). Em contraste, foi demonstrado que camundongos do grupo experimental $I + D$ apresentaram baixa expressão dos genes das citocinas IL-12 p40 (Figura 9G, $I + D$ vs I , $p < 0,05$) e IFN- γ (Figure 9I, $I + D$ vs D ; D vs. NI e D vs I , $p < 0,05$). Embora tenha sido detectada baixa expressão de IL-23 p19 nos animais $I + D$, esta diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos controles (Figura 9H). Da mesma forma, houve baixa detecção de RNAm para as citocinas reguladoras TGF- β , IL-10 e para o fator de transcrição Foxp3, característico da presença células T reguladoras e do controle da resposta imune, no grupo experimental em relação aos controles. Estas diferenças não foram estatisticamente significativas (Figuras 9J, 9K e 9L, respectivamente).

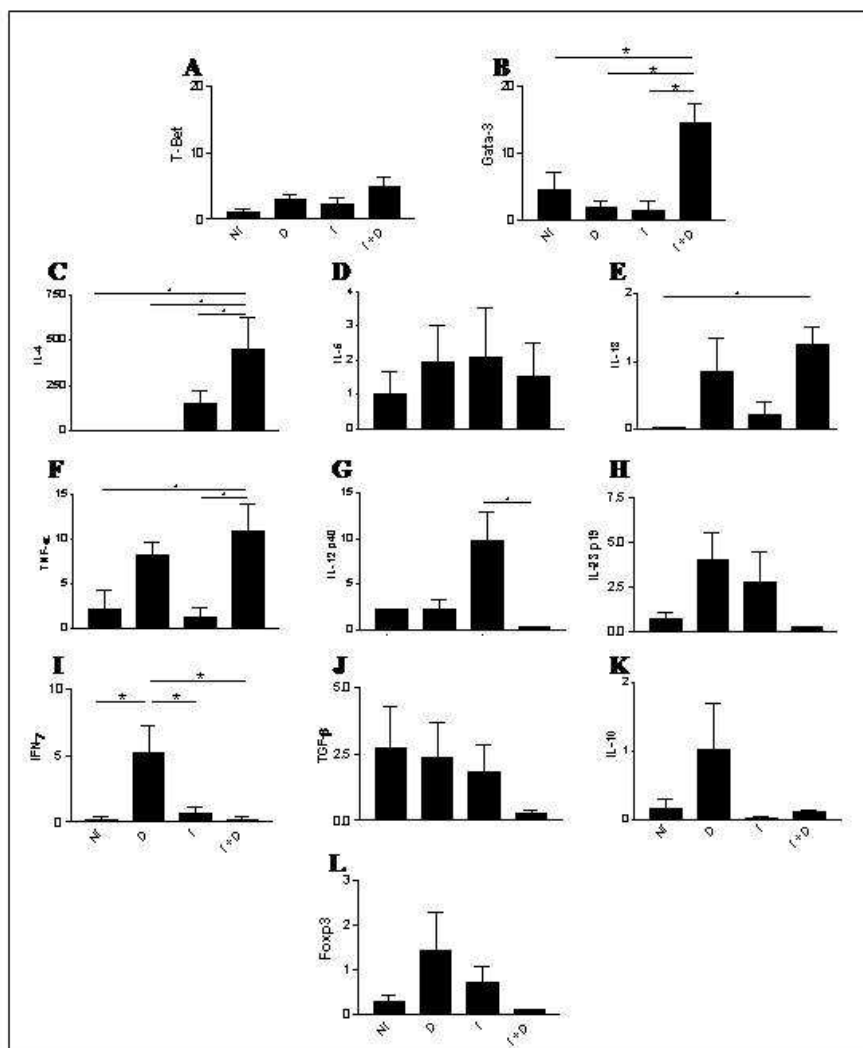


Figura 9. Expressão de mRNA de fatores de transcrição e citocinas na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares. Camundongos C57BL/6 foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, segmentos de jejuno foram coletados dos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I + D) e embaldos em meio de conservação para RNA. As amostras foram processadas e, após extração do RNA e confecção de cDNA, foram realizadas reações de Real Time PCR utilizando-se *primers* específicos para detecção de mensageiros para T-Bet (A), Gata-3 (B), IL-4 (C), IL-5 (D), IL-13 (E), TNF- α (F), IL-12 p40 (G), IL-23 p19 (H), IFN- γ (I), TGF- β (J), IL-10 (K) e Foxp3 (L). Os resultados apresentados indicam os valores da média \pm EPM da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão do gene constitutivo β -actina. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

Com o intuito de se verificar quais quimiocinas e receptores de quimiocinas estavam envolvidos na migração de células para a mucosa na DII, foram realizadas reações de Real Time PCR com a utilização de *primers* específicos para detecção de mensagens para as quimiocinas e receptores de quimiocinas no tecido intestinal.

Foram observadas diferenças significativas na expressão de CXCL1 (KC) entre os animais controles e experimentais, com aumento de expressão desta quimiocina no grupo controle *I* (Figura 10A, *I* vs *I + D* e *I* vs *NI*, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controles e experimental na detecção de mensagens para CCL3 (MIP-1 α), embora tenha sido observada tendência à diminuição desta quimiocina nos tecidos dos animais expostos ao amendoim na alimentação – *D* e *I + D* (Figura 10B). De forma interessante, por outro lado, nossos resultados demonstraram elevado aumento na expressão da quimiocina CXCL9 (Mig), importante para a migração de células Th1 ativadas e NK para tecidos inflamados, no intestino dos animais do grupo experimental *I + D*. Estes resultados foram estatisticamente significativos quando comparados aos controles *NI*, *D* e *I* (Figura 10C, $p < 0,05$). Em contraste, embora a expressão de CXCL9 tenha sido elevada, a detecção de mensagens para seu receptor CXCR3 apresentou-se diminuída nos tecidos inflamados dos camundongos *I + D*, com elevada expressão de RNAm nos animais controles *D* (Figura 10E, não significativo). Ao analisar-se a expressão de mRNA para CCL11 (eotaxina), observou-se baixa detecção desta quimiocina no grupo experimental *I + D*, sendo a maior expressão verificada em *D*, estatisticamente relevante em relação aos grupos *NI*, *I* e *I + D* (Figura 10D, $p < 0,05$).

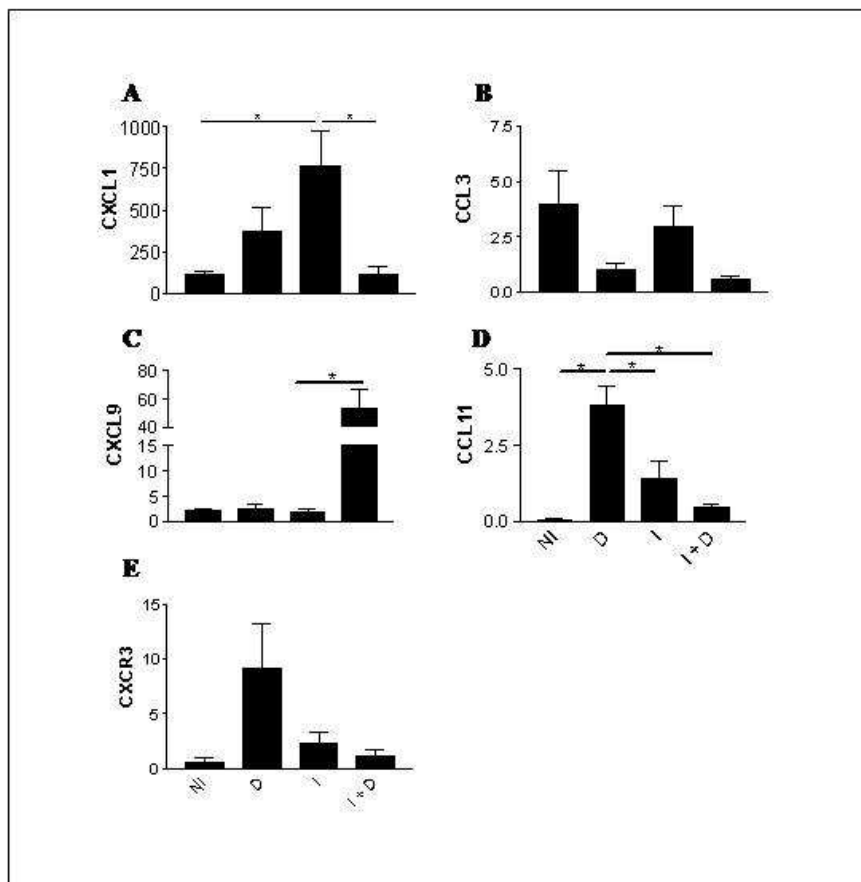


Figura 10. Expressão de mRNA de quimiocinas e receptores de quimiocinas na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares. Camundongos C57BL/6 foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, segmentos de jejuno foram coletados dos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I+D) e embaldados em meio de conservação para RNA. As amostras foram processadas e, após extração do RNA e confecção de cDNA, foram realizadas reações de Real Time PCR utilizando-se *primers* específicos para detecção de mensagens para CXCL1 (A), CCL3 (B), CXCL9 (C), CCL11 (D) e CXCR3 (E). Os resultados apresentados indicam os valores da média \pm EPM da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão do gene constitutivo β -actina. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.2. Papel de linfócitos B na patogênese da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares

Tendo em vista a provável participação de células B produtoras de anticorpos na patogênese da doença intestinal estudada, nosso próximo passo foi estabelecer o real papel dessas células e das imunoglobulinas neste modelo através da indução da doença em animais deficientes de células B (B KO).

4.2.1. Variação de peso dos animais B KO

Durante o período experimental em que animais B KO foram imunizados e desafiados, seu peso foi monitorado semanalmente. Foram observadas variações no ganho e perda de peso em todos os grupos (Figura 11A) sendo que, ao final de 30 dias de dieta exclusiva com amendoim, os resultados demonstraram tendência à perda maior de peso em relação ao 1º dia de dieta nos animais controles *D*, seguidos pelo grupo *I + D* (Figura 11C).

Esta perda de peso nos animais B KO do grupo *D*, não imunizado porém alimentado por 30 dias com as sementes, foi acompanhada por um consumo variável das sementes de amendoim, durante todo o período experimental (Figura 11B), diferentemente dos animais *I + D*, que apresentaram consumo crescente na primeira semana de desafio, seguido por estabilização na quantidade de sementes ingeridas até o final do experimento (Figura 11B). Estes resultados contrastam com aqueles obtidos com camundongos selvagens imunizados e desafiados, cujo consumo de amendoim decresceu a partir da segunda semana de desafio até o 30º dia de dieta com amendoim (Figura 3B).

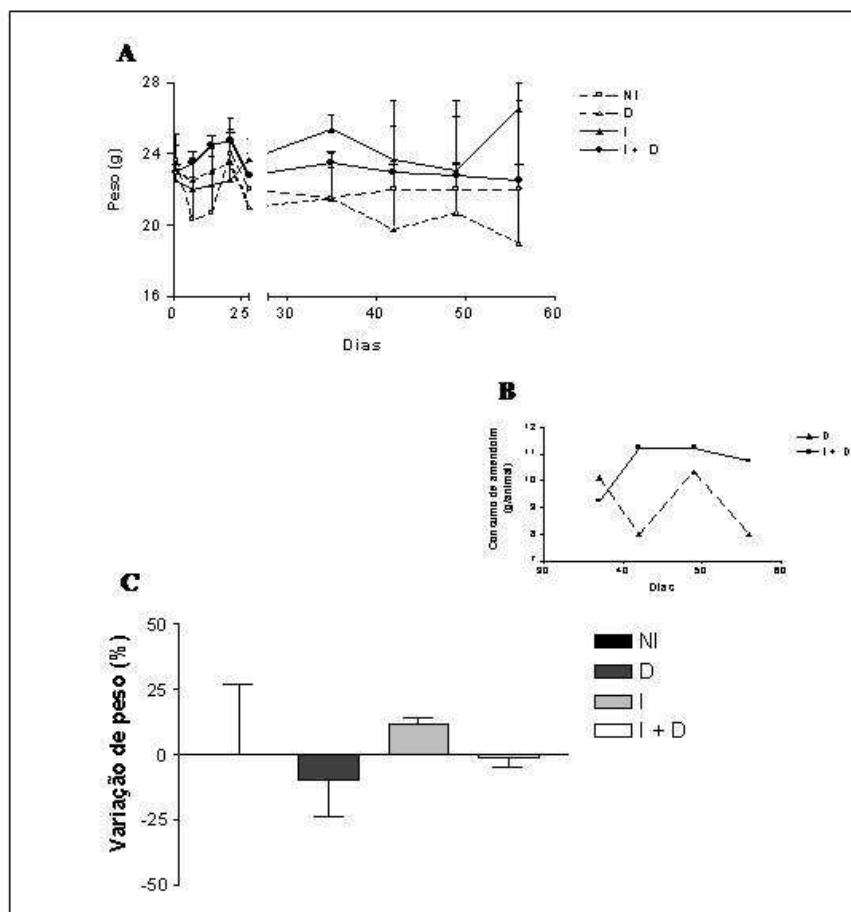


Figura 11. Variação de peso durante o período de imunização com EPA e após desafio com as sementes de amendoim. Camundongos C57BL/6 B KO foram imunizados e expostos à dieta exclusiva com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Os gráficos representam a média \pm EFM do aumento ou perda de peso (A), que foi monitorado semanalmente e, após 30 dias de dieta, comparado ao 1º dia de exposição às sementes de amendoim (C) nos grupos controles NI, D e I e experimental I + D. Em (B), consumo das sementes por animais expostos ao amendoim na alimentação. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

4.2.2. Alterações histopatológicas em animais B KO

Para determinarmos se as alterações observadas na variação de peso dos animais B KO durante o protocolo experimental poderia estar relacionada a alguma alteração histopatológica ou até mesmo ausência de danos teciduais no intestino dos animais analisados, segmentos de intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e grosso (cólon) foram coletados, fixados e processados para análise histopatológica.

Foi verificada presença de infiltrado inflamatório e discreto alargamento com diminuição da altura das vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e íleo nos animais do grupo experimental imunizado e desafiados por 30 dias com as sementes de amendoim (Figura 12). Ao observamos os segmentos intestinais dos animais controles *NI*, *D* e *I*, notamos a presença de vilosidades intestinais altas e afiladas com integridade da camada epitelial. Além disso, a análise histopatológica revelou a presença de congestão nas vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e íleo dos grupos controles e experimentais e cólon em *I + D* (Figura 12).

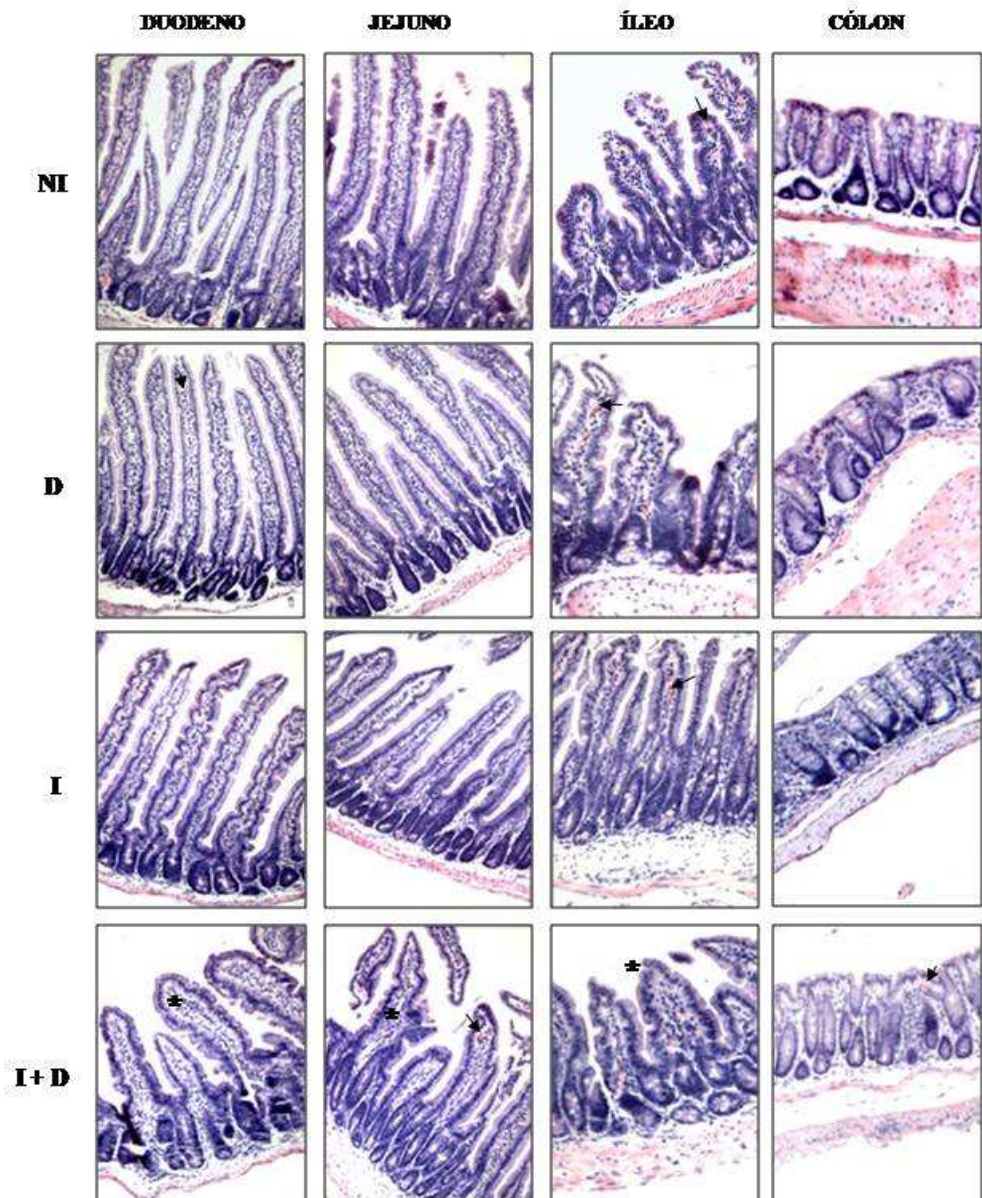


Figura 12. Discretas alterações na morfologia intestinal são induzidas no grupo experimental B KO imunizado e desafiado com as sementes de amendoim. Animais C57BL/6 B KO foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos (*I + D*). Os grupos controles (*NI*, *D* e *I*) foram submetidos a diferentes protocolos, na presença ou ausência de imunização ou dieta com amendoim. Segmentos intestinais correspondentes ao duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletados, fixados em formaldeído a 10% em PBS, incluídos em parafina e os cortes corados por hematoxilina-eosina. Nota-se presença de discreto infiltrado inflamatório com alargamento e diminuição da altura das vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e íleo em *I + D* (*). Nos controles, observam-se vilosidades intestinais altas e afiladas com integridade da camada epitelial. Nota-se também presença de congestão nas vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e íleo dos grupos controles e experimentais e cólon em *I + D* (seta). Aumento original: duodeno, jejuno e íleo, 20X; cólon, 10X.

4.2.3. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de células B

Para melhor entendimento do envolvimento de linfócitos B na patogênese da doença intestinal induzida por amendoim, animais C57BL/6 B KO foram submetidos ao protocolo de imunização e, após 30 dias de desafio, segmentos de jejuno foram coletados e embebidos em meio de conservação de RNA. Após extração de RNA e confecção de cDNA, as amostras dos grupos experimentais e controles foram submetidas a reações de Real Time PCR, através da utilização de *primers* específicos e o sistema SYBR Green.

Assim como nos animais selvagens, os resultados demonstraram aumento da expressão do gene da citocina IL-4 nos animais *I + D*, mesmo na ausência de células B, embora estes dados não sejam estatisticamente significativos (Figura 13A). Observamos, também, elevada produção de mensagens para IL-5 nos animais expostos à dieta com amendoim *D* e *I + D*, sendo essas diferenças estatisticamente significativas quando comparamos *D* vs *NI* e *D* vs *I* (Figura 13B, $p < 0,05$). Embora não tenhamos detectado diferenças estatisticamente relevantes na quantificação das demais citocinas, podemos notar tendência ao aumento de mensagens para IL-12 p40, IFN- γ e TGF- β nos animais submetidos à dieta *D*, em relação aos demais (Figuras 13C, 13D e 13G, respectivamente), e crescente expressão de IL-10 nos segmentos de jejuno dos animais controles *NI*, seguidos por *D*, *I* e *I + D* (Figura 13F). A expressão de RNAm para TNF- α foi similar em todos os grupos analisados (Figura 13E).

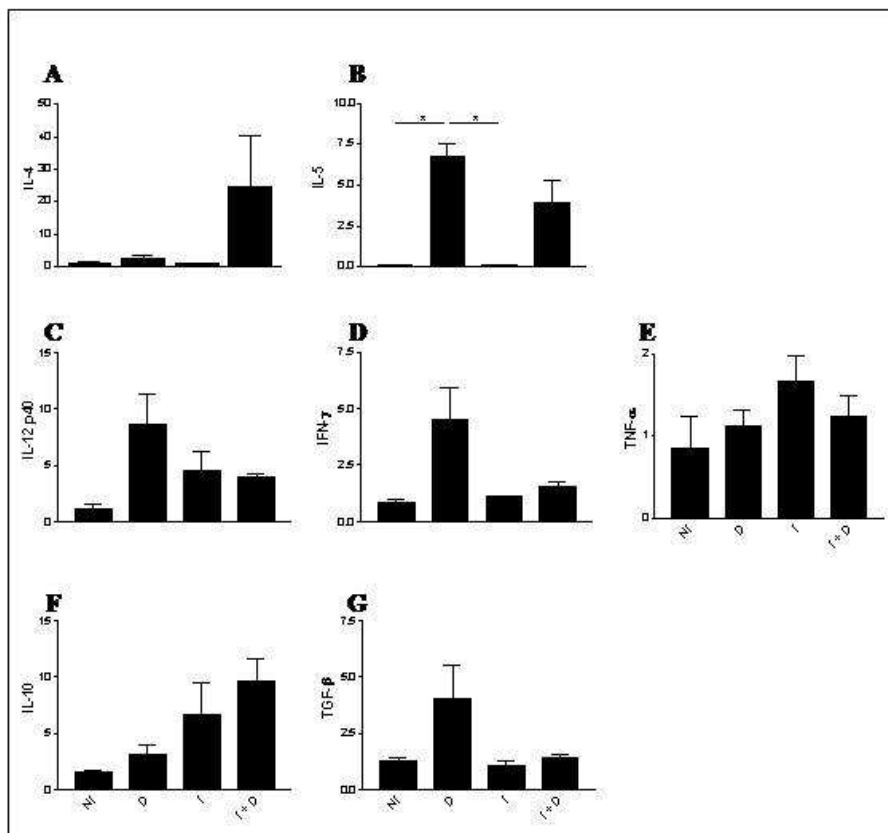


Figura 13. Expressão de mRNA de citocinas no intestino de animais B KO imunizados e desafiados com as sementes de amendoim. Camundongos C57BL/6 B KO foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, segmentos de jejuno foram coletados dos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I + D) e embalados em meio de conservação para RNA. As amostras foram processadas e, após extração do RNA e confecção de cDNA, foram realizadas reações de Real Time PCR utilizando-se *primers* específicos para detecção de mensagens para IL-4 (A), IL-5 (B), IL-12 p40 (C), IFN- γ (D), TNF- α (E), IL-10 (F) e TGF- β (G). Os resultados apresentados indicam os valores da média \pm EFM da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão do gene constitutivo β -actina. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.3. Papel de IFN- γ na patogênese da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares

Após a elucidação da participação de células B e anticorpos na inflamação intestinal induzida por amendoim, a próxima etapa foi estabelecer o papel da citocina IFN- γ na modulação da resposta imune em camundongos com inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares. Para esta finalidade, foram utilizados camundongos IFN- γ KO, submetidos ao protocolo experimental já descrito anteriormente.

4.3.1. Variação de peso dos animais IFN- γ KO

Assim como nos experimentos anteriores, os animais IFN- γ KO dos grupos experimentais e controles foram pesados semanalmente, durante todo o período experimental. Os resultados mostraram que os animais do grupo experimental *I + D* apresentaram marcante perda de peso após o desafio com sementes de amendoim (Figura 14A), tendo perdido aproximadamente 10% do seu peso após 30 dias de dieta, em relação ao 1º dia de desafio. Por outro lado, os animais selvagens *I + D* apresentaram perda de cerca de 3-5% de seu peso no 30º dia de exposição, em relação ao 1º dia de dieta com as sementes de amendoim (Figura 3C). Animais do grupo controle *D* também demonstraram dificuldade de ganho de peso após introdução das sementes de amendoim na sua dieta (Figuras 14A e 14B). Estes resultados demonstraram maior tendência dos animais C57BL/6 IFN- γ KO perderem peso após o desafio, em relação aos animais selvagens.

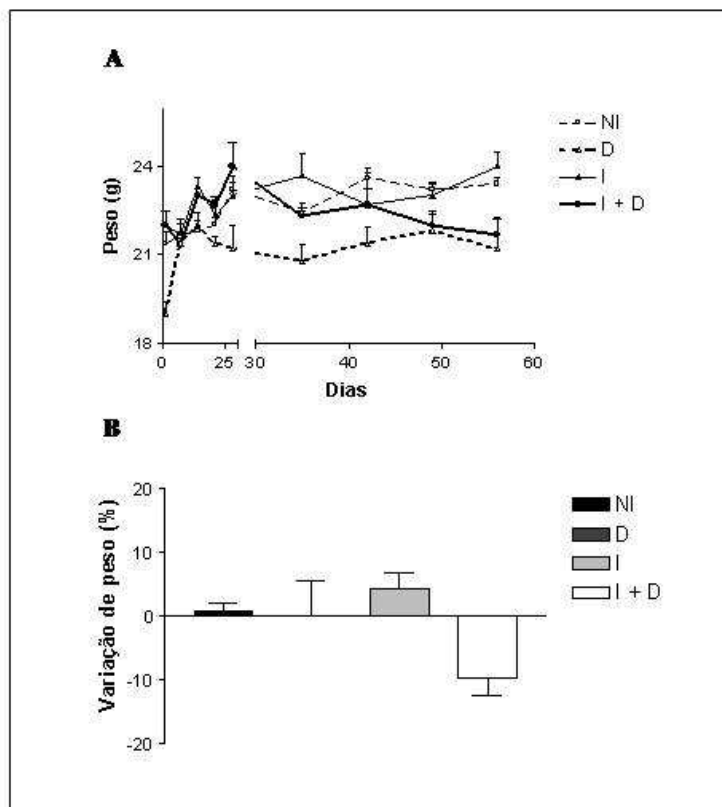


Figura 14. Variação de peso durante o período de imunização com EPA e após desafio com as sementes de amendoim. Camundongos C57BL/6 IFN- γ KO foram imunizados e expostos à dieta exclusiva com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Os gráficos representam a média \pm EFM do aumento ou perda de peso (A), que foi monitorado semanalmente e, após 30 dias de dieta, comparado ao 1º dia de exposição às sementes de amendoim (B) nos grupos controles NI, D e I e experimental I + D. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

4.3.2. Alterações histopatológicas no intestino de camundongos IFN- γ KO

As modificações na arquitetura intestinal dos animais deficientes de IFN- γ foram analisadas após coleta e processamento de amostras de segmentos de duodeno, jejuno, íleo e cólon de camundongos dos grupos *NI*, *D*, *I* e *I + D*, ao final de 30 dias de desafio.

Os resultados demonstraram presença de infiltrado inflamatório e deformidade das vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e, principalmente íleo em *I + D*. Surpreendentemente, as alterações observadas principalmente nos segmentos de jejuno foram menos significativas do que aquelas encontradas nos animais selvagens imunizados e desafiados com os antígenos alimentares, embora os animais IFN- γ KO tenham apresentado maior propensão à perda de peso quando desafiados. Nos controles, observaram-se vilosidades intestinais altas e afiladas, integridade da camada epitelial e poucas células inflamatórias (Figura 15).

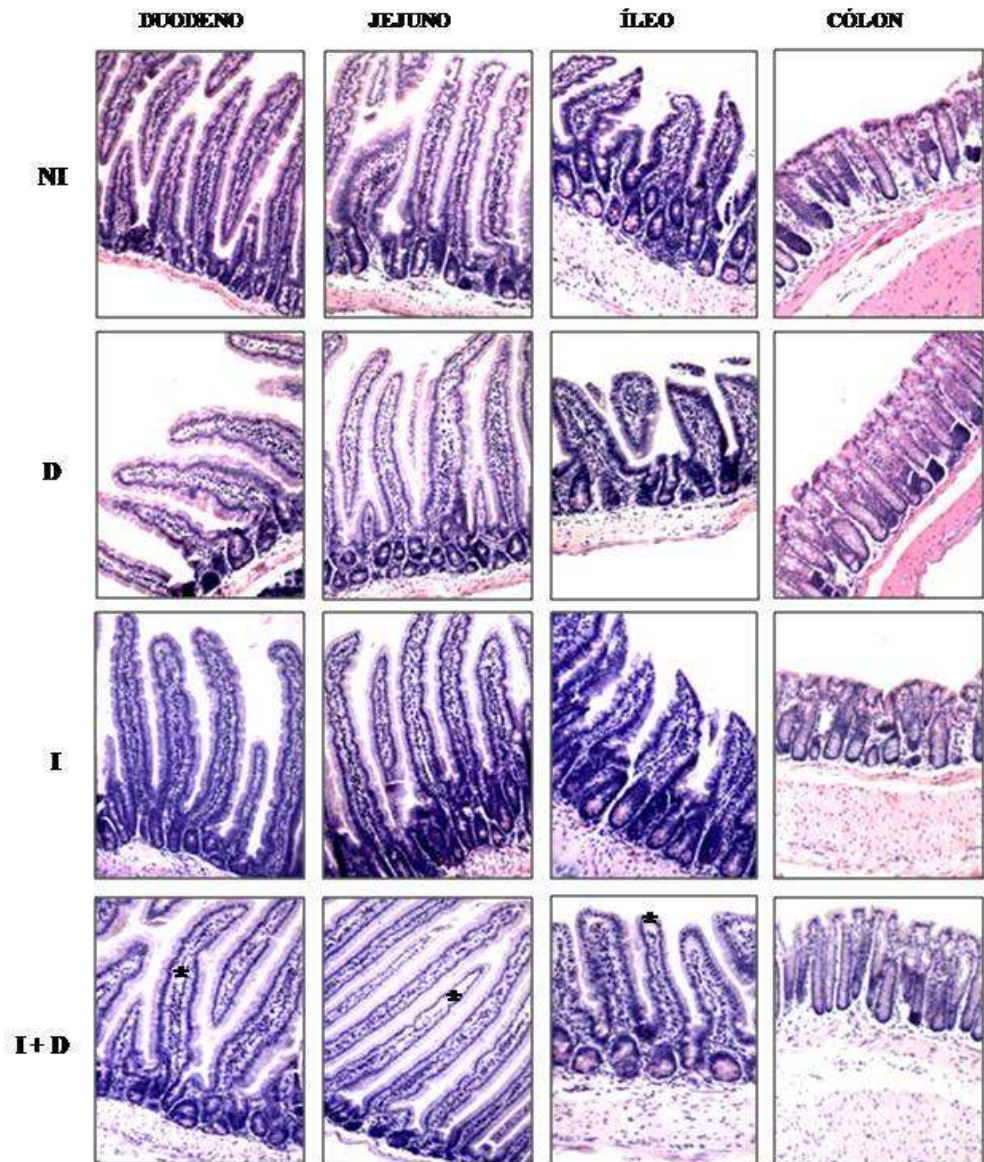


Figura 15. Inflamação intestinal é induzida no grupo experimental deficiente de IFN- γ imunizado e desafiado com as sementes de amendoim. O processo inflamatório foi induzido nos animais C57BL/6 IFN- γ KO após imunização e exposição às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos (*I + D*). Os grupos controles (*NI*, *D* e *I*) foram submetidos a diferentes protocolos, na presença ou ausência de imunização ou dieta com amendoim. Segmentos intestinais correspondentes ao duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletados, fixados em formaldeído a 10% em PBS, incluídos em parafina e os cortes corados por hematoxilina-eosina. Nota-se presença de infiltrado inflamatório e deformidade das vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e íleo em *I + D* (seta). Nos controles, observam-se vilosidades intestinais altas e afiladas, integridade da camada epitelial e poucas células inflamatórias. Aumento original: duodeno, jejuno e íleo, 20X; cólon, 10X.

4.3.3. Participação de anticorpos na imunomodulação da inflamação intestinal em animais deficientes de IFN- γ

Em face à importante participação de imunoglobulinas na inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais selvagens, nosso próximo passo foi avaliar o papel dos anticorpos na patogênese da doença em camundongos IFN- γ KO.

Assim como em animais selvagens, os dados demonstraram elevada produção de IgG, IgG1 e IgE específicas a EPA no soro de camundongos IFN- γ KO imunizados (*I*) e imunizados e desafiados (*I + D*) em relação aos controles *NI* e *D* (Figura 16A, *I + D* vs *NI*, *I + D* vs *D*, *I* vs *NI*, *I* vs *D*, $p < 0,05$; Figura 16C, *I + D* vs *NI*, *I + D* vs *D*, *I* vs *NI*, *I* vs *D*, $p < 0,05$; Figura 16D, *I + D* vs *NI*, *I + D* vs *D*, *I* vs *NI*, *I* vs *D*, $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças relevantes na produção de IgG2a no soro dos animais dos grupos experimentais e controles (Figura 16B).

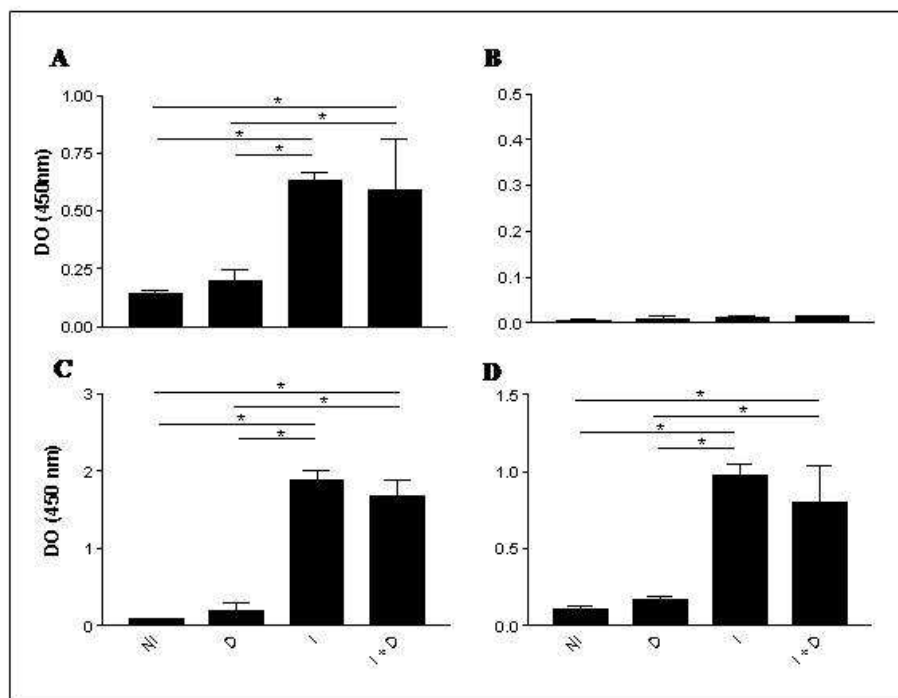


Figura 16. Detecção de anticorpos específicos ao EPA em animais deficientes de IFN- γ expostos e não expostos ao amendoim. Camundongos C57BL/6 IFN- γ KO foram imunizados e submetidos à dieta com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, foram sacrificados e o sangue coletado para obtenção de soro e quantificação de imunoglobulinas. Os gráficos representam a média \pm EPM das dosagens de IgG (A), IgG2a (B), IgG1 (C) e IgE (D) específicas ao extrato protéico de amendoim, nos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I + D). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. DO: densidade óptica. * p < 0,05.

4.3.4. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de IFN- γ

Com a finalidade de se determinar o papel de IFN- γ na modulação da resposta imune intestinal frente aos antígenos alimentares, animais C57BL/6 IFN- γ KO foram submetidos ao protocolo de imunização e, após 30 dias de desafio, segmentos de jejuno foram coletados e embebidos em meio de conservação de RNA. Após extração de RNA e confecção de cDNA, as amostras dos grupos experimentais e controles foram submetidas a reações de Real Time PCR, através da utilização de *primers* específicos e o sistema SYBR Green.

Os dados obtidos demonstraram elevada produção de RNAm para a citocina TNF- α no jejuno de camundongos imunizados *I* e *I + D* em relação aos controles *NI* e *D*, embora estas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas (Figura 17A). Notamos expressão significativa de IL-4 nos animais do grupo experimental *I + D* em relação aos grupos controles *NI*, *D* e *I* (Figura 17C, $p < 0,05$), acompanhada do aumento de mensagens para IL-5 nos animais dos grupos *D* e *I + D*, estatisticamente relevante ao comparar-se *D* e *I* (Figura 17D, $p < 0,05$). Foi observado também crescente aumento de expressão das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β nos segmentos intestinais dos camundongos *NI*, seguidos por *D*, *I* e *I + D*, embora não relevante estatisticamente (Figuras 17E e 17F, respectivamente). Não houve diferença de expressão de RNAm para IL-12 p40 entre os quatro grupos avaliados (Figura 17B).

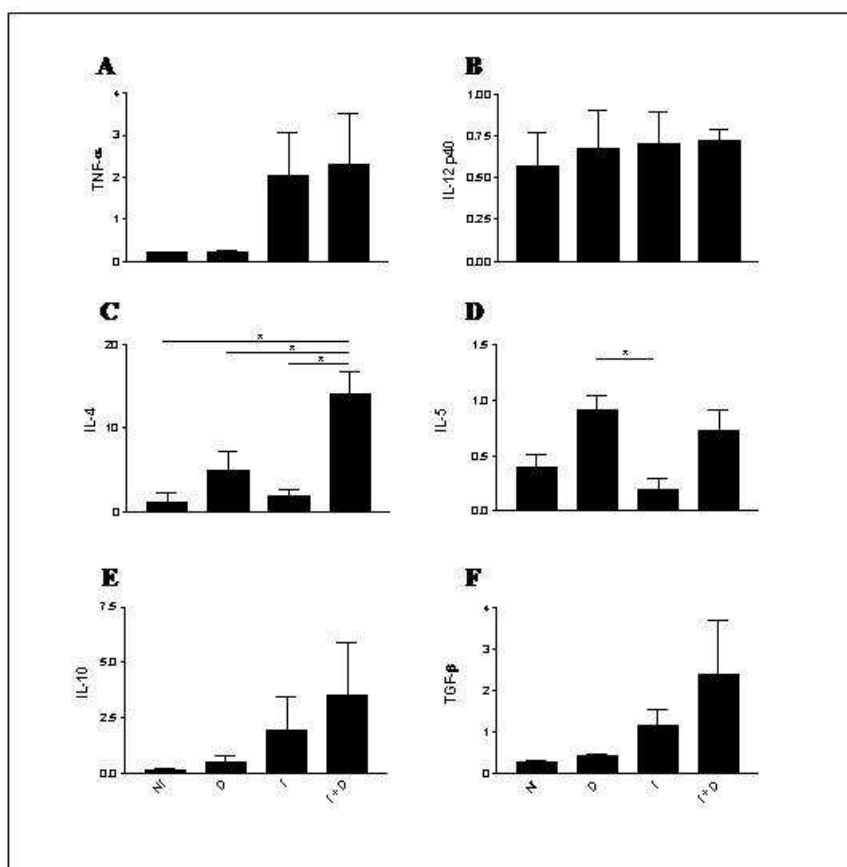


Figura 17. Expressão de mRNA de citocinas na inflamação intestinal induzida por amendoim em animais deficientes de IFN- γ . Camundongos C57BL/6 IFN- γ KO foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, segmentos de jejuno foram coletados dos grupos controles (N, D e I) e experimental (I + D) e embaldados em meio de conservação para RNA. As amostras foram processadas e, após extração do RNA e confecção de cDNA, foram realizadas reações de Real Time PCR utilizando-se *primers* específicos para detecção de mensagens para TNF- α (A), IL-12 p40 (B), IL-4 (C), IL-5 (D), IL-10 (E) e TGF- β (F). Os resultados apresentados indicam os valores da média \pm EPM da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão do gene constitutivo β -actina. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.4. Papel de IL-4 na patogênese da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares

Tendo em vista a alta detecção de mensagens para fatores de transcrição e citocinas de padrão Th2, a alta produção de IgE e IgG1 específicas ao EPA e o papel de IFN- γ na modulação da inflamação intestinal induzida por amendoim, nosso próximo passo foi esclarecer se a citocina IL-4 exercia algum papel patogênico no processo inflamatório induzido pelos antígenos alimentares alergênicos. Para isso, camundongos IL-4 KO foram imunizados, desafiados e analisados quanto ao desenvolvimento de inflamação intestinal.

4.4.1. Variação de peso dos animais IL-4 KO

Em contraste à perda de peso observada nos camundongos *I + D* em todos os experimentos anteriores, camundongos IL-4 KO submetidos ao protocolo de indução da doença intestinal e aqueles submetidos à dieta com amendoim (*D*) ganharam peso no decorrer do período experimental, embora de forma menos evidente porém similar aos animais controles *NI* e *I* (Figura 18A). Os animais não expostos ao amendoim na imunização tampouco na dieta (*NI*) apresentaram o maior ganho de peso após 30 dias de desafio entre todos os grupos analisados, em relação ao peso no 1º dia de substituição da alimentação por sementes de amendoim nos grupos expostos (*D* e *I + D*). Estas diferenças foram estatisticamente significativas quando comparadas aos controles *D* e *I* e ao experimental *I + D* (Figura 18C, $p < 0,05$).

Além da ausência de perda de peso nos animais IL-4 KO submetidos ao protocolo experimental, os resultados demonstraram aumento inicial seguido por queda e, principalmente, estabilização na quantidade de sementes consumidas pelos animais *I + D*

na última semana experimental (Figura 18B), ao contrário do consumo observado nos experimentos realizados com animais selvagens (Figuras 3B). Por outro lado, animais do grupo *D* apresentaram consumo inicial constante, seguido por pequena queda na terceira semana desafio, e estabilização da quantidade de sementes consumidas na última semana de exposição ao amendoim (Figura 18B).

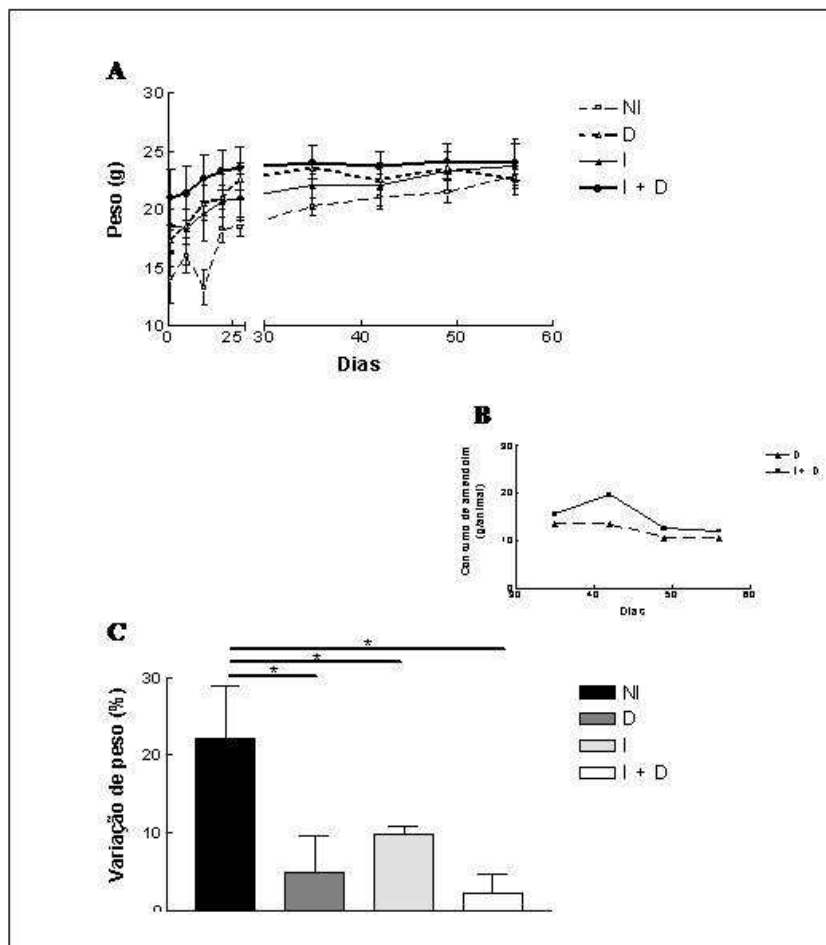


Figura 18. Variação de peso durante o período de imunização com EPA e após desafio com as sementes de amendoim. Camundongos C57BL/6 IL-4 KO foram imunizados e expostos à dieta exclusiva com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Os gráficos representam a média \pm EPM do aumento ou perda de peso (A), que foi monitorado semanalmente e, após 30 dias de dieta, comparado ao 1º dia de exposição às sementes de amendoim (C) nos grupos controles NI, D e I e experimental I + D. Em (B), consumo das sementes por animais expostos ao amendoim na alimentação. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

* $p < 0.05$.

4.4.2. Alterações histopatológicas no intestino de animais IL-4 KO

Visto que, diferentemente dos resultados obtidos até então com animais selvagens, B KO e IFN- γ KO, camundongos IL-4 KO ganharam peso simultaneamente à estabilização do consumo de amendoim após 30 dias de desafio, segmentos intestinais destes animais foram então coletados para realização de análise histopatológica.

Como esperado, inflamação intestinal não é induzida no grupo experimental deficiente de IL-4 imunizado e desafiado com amendoim. Nestes animais observamos ausência de infiltrado inflamatório, edema ou deformidade das vilosidades do duodeno, jejuno e íleo em *I + D*. Da mesma forma, os controles apresentaram-se com vilosidades intestinais altas e afiladas, integridade da camada epitelial, poucas células inflamatórias e ausência de edema (Figura 19).

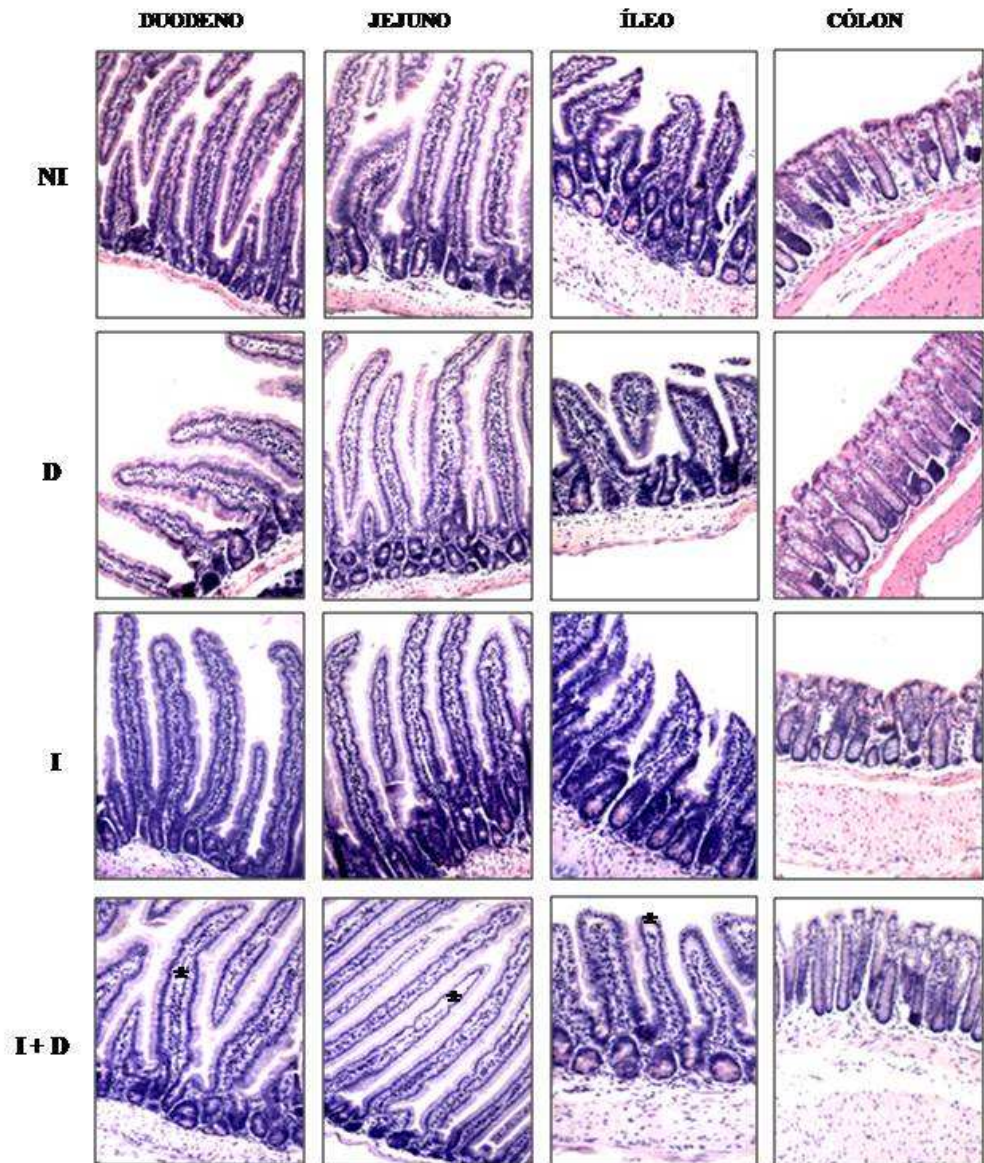


Figura 19. Inflamação intestinal não é induzida no grupo experimental deficiente de IL-4 imunizado e desafiado com amendoim. Camundongos C57BL/6 IL-4 KO foram imunizados e desafiados com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos (*I + D*). Os grupos controles (*NI*, *D* e *I*) foram submetidos a diferentes protocolos, na presença ou ausência de imunização ou dieta com amendoim. Segmentos intestinais correspondentes ao duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletados, fixados em formaldeído a 10% em PBS, incluídos em parafina e os cortes corados por hematoxilina-eosina. Nota-se ausência de infiltrado inflamatório, edema ou deformidade das vilosidades intestinais do duodeno, jejuno e íleo em *I + D* (*). Da mesma forma, observam-se nos controles vilosidades intestinais altas e afiladas, integridade da camada epitelial, poucas células inflamatórias e ausência de edema. Aumento original: duodeno, jejuno e íleo, 20X; cólon, 10X.

4.4.3. Participação de anticorpos na imunomodulação da inflamação intestinal em animais deficientes de IL-4

A presença de anticorpos de padrão Th2 no soro de animais selvagens imunizados e desafiados (*I + D*) levou-nos à hipótese da participação dessas imunoglobulinas na patogenia da inflamação intestinal estudada. Sendo assim, avaliamos o padrão de anticorpos produzidos durante a modulação do processo inflamatório em camundongos IL-4 KO, frente às imunizações com EPA e desafio com as sementes de amendoim.

Os dados obtidos demonstraram maior produção de IgG anti-EPA nos animais imunizados sistemicamente e desafiados (*I + D*) em relação aos demais *NI*, *D* e *I*, embora estes dados não tenham sido estatisticamente relevantes (Figura 20A). Ao contrário dos experimentos anteriores, nos quais a produção da imunoglobulina IgG2a era quase ausente, houve nitidamente elevada produção desses anticorpos no soro dos camundongos IL-4 KO imunizados *I* e *I + D*, em comparação aos demais, embora não tenha havido relevância estatística nesses resultados (Figura 20B). A produção de IgG1 específica a EPA foi aumentada apenas nos animais imunizados e desafiados *I + D* (Figura 20C), mesmo assim em níveis claramente inferiores àqueles obtidos de camundongos selvagens (Figura 8C) ou IFN- γ KO (Figura 16C) submetidos ao mesmo protocolo experimental. De maneira similar, houve maior detecção de IgE específica a EPA no soro dos animais do grupo experimental *I + D* em relação aos controles (Figura 20D, *I + D* vs *NI* e *I + D* vs *D*, $p < 0,05$). No entanto, é importante ressaltar que, embora tenha havido maior produção de IgE nestes camundongos quando comparada aos demais IL-4 KO, a detecção dessa imunoglobulina, assim como IgG1 foi visivelmente inferior àquela detectada nos animais selvagens (Figura 8D) e IFN- γ KO (Figura 16D) imunizados e desafiados com os antígenos alimentares.

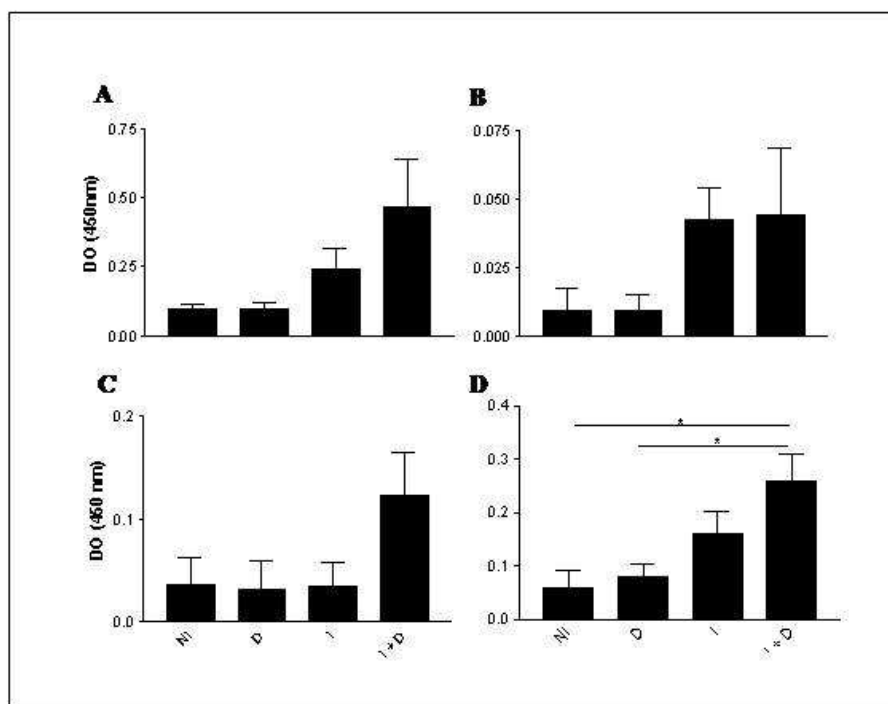


Figura 20. Detecção de anticorpos específicos ao EPA em animais deficientes de IL-4 expostos e não expostos ao amendoim. Camundongos C57BL/6 IL-4 KO foram imunizados e submetidos à dieta com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, foram sacrificados e o sangue coletado para obtenção de soro e quantificação de imunoglobulinas. Os gráficos representam a média \pm EPM das dosagens de IgG (A), IgG2a (B), IgG1 (C) e IgE (D) específicas ao extrato proteico de amendoim, nos grupos controles (NI, D e J) e experimental (I + D). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. DO: densidade óptica. * $p < 0,05$.

4.4.4. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de IL-4

Para se estabelecer o papel da citocina IL-4 na patogenia do processo inflamatório intestinal, e a modulação da inflamação por outras citocinas frente aos antígenos alimentares, animais C57BL/6 IL-4 KO foram submetidos ao protocolo de imunização e, após 30 dias de desafio, segmentos de jejuno foram coletados e embebidos em meio de conservação de RNA. Após extração de RNA e confecção de cDNA, as amostras dos grupos experimentais e controles foram submetidas a reações de Real Time PCR para quantificação de mensagens para citocinas, através da utilização de *primers* específicos e o sistema SYBR Green.

Não foram detectadas diferenças relevantes de expressão de RNAm para as citocinas TNF- α (Figura 21A), IL-5 (Figura 21B) e IL-12 p40 (Figura 21C) entre os grupos analisados. Os resultados demonstraram tendência ao aumento de mensagens para as citocinas IFN- γ e IL-10 nos tecidos dos animais expostos ao amendoim na alimentação, *D* e *I + D* (Figura 21D e 21E). Ainda, de forma semelhante, observamos aumento de expressão do gene da citocina TGF- β nos camundongos submetidos à dieta com amendoim por 30 dias consecutivos, estatisticamente significativo quando comparamos os grupos *I + D* vs *NI* e *I + D* vs *I* (Figura 21F, $p < 0,05$).

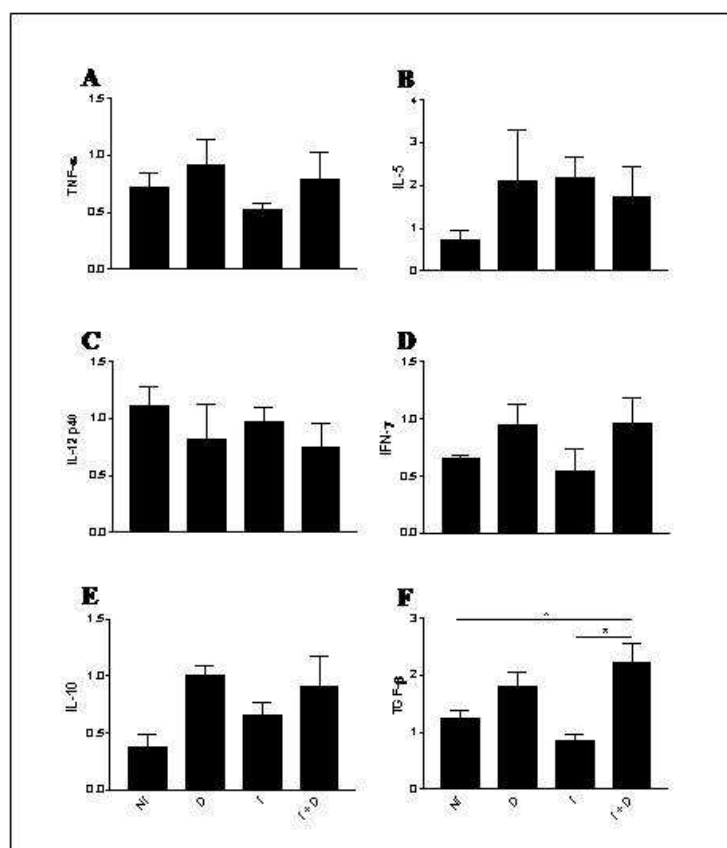


Figura 21. Expressão de mRNA de citocinas no intestino de animais IL-4 KO imunizados e desafiados com as sementes de amendoim. Camundongos C57BL/6 IL-4 KO foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, segmentos de jejuno foram coletados dos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I + D) e embalados em meio de conservação para RNA. As amostras foram processadas e, após extração do RNA e confecção de cDNA, foram realizadas reações de Real Time PCR utilizando-se *primers* específicos para detecção de mensagens para TNF- α (A), IL-5 (B), IL-12 p40 (C), IFN- γ (D), IL-10 (E) e TGF- β (F). Os resultados apresentados indicam os valores da média \pm EFM da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão do gene constitutivo β -actina. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.5. Papel de IL-10 na modulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares

Após caracterização do novo modelo de inflamação intestinal e definição do papel exercido por células B e pelas citocinas IFN- γ e IL-4 na patogenia e modulação deste processo inflamatório, finalmente analisamos a imunorregulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares através da utilização de camundongos IL-10 KO submetidos ao protocolo experimental já descrito.

4.5.1. Variação de peso dos animais IL-10 KO

Ao contrário da evidente perda de peso observada nos camundongos selvagens *I + D*, camundongos IL-10 KO submetidos ao protocolo de indução da doença e os controles expostos à dieta com amendoim (*D*) apresentaram, surpreendentemente, ganho de peso no decorrer do período experimental, embora este ganho tenha sido menor que aquele dos animais controles *NI* e *I* (Figura 22A). Os animais imunizados com EPA (*I*) ganharam significativamente mais peso que aqueles imunizados e desafiados *I + D*, no 30º dia de desafio, em relação ao 1º dia de introdução da dieta com amendoim (Figura 22C, $p < 0,05$).

De forma similar ao consumo de amendoim dos animais IL-4 KO, os camundongos deficientes de IL-10 apresentaram aumento inicial da ingestão das sementes, seguido por queda e estabilização na quantidade consumida na 4ª semana de desafio (Figura 22B). Estes dados foram semelhantes para ambos os grupos submetidos à dieta, *D* e *I + D*.

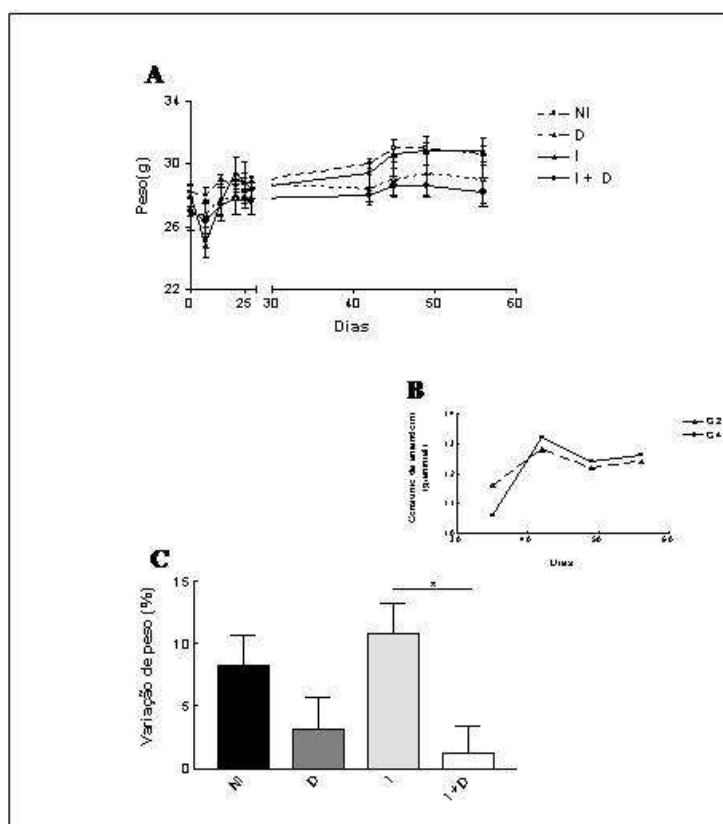


Figura 22. Variação de peso durante o período de imunização com EPA e após desafio com as sementes de amendoim. Camundongos C57BL/6 foram imunizados e expostos à dieta exclusiva com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Os gráficos representam a média \pm EFM do aumento ou perda de peso (A), que foi monitorado semanalmente e, após 30 dias de dieta, comparado ao 1º dia de exposição às sementes de amendoim (C) nos grupos controles NI, D e I e experimental I + D. Em (B), consumo das sementes por animais expostos ao amendoim na alimentação. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0.05$.

4.5.2. Alterações histopatológicas no intestino de animais IL-10 KO

Para avaliação da presença ou ausência de alterações morfológicas na arquitetura intestinal de camundongos IL-10 KO submetidos ao protocolo de indução de doença intestinal, segmentos correspondentes ao duodeno, jejuno, íleo e cólon dos animais experimentais e controles foram coletados e processados para análise histopatológica.

Foi observada presença de infiltrado inflamatório, edema e deformidade das vilosidades intestinais, em especial do jejuno e íleo dos camundongos imunizados e desafiados *I + D* (Figura 23). Além disso, os resultados mostraram também congestão no interior das vilosidades do jejuno do grupo controle *D* e em porções de jejuno e íleo do grupo experimental *I + D* (Figura 23).

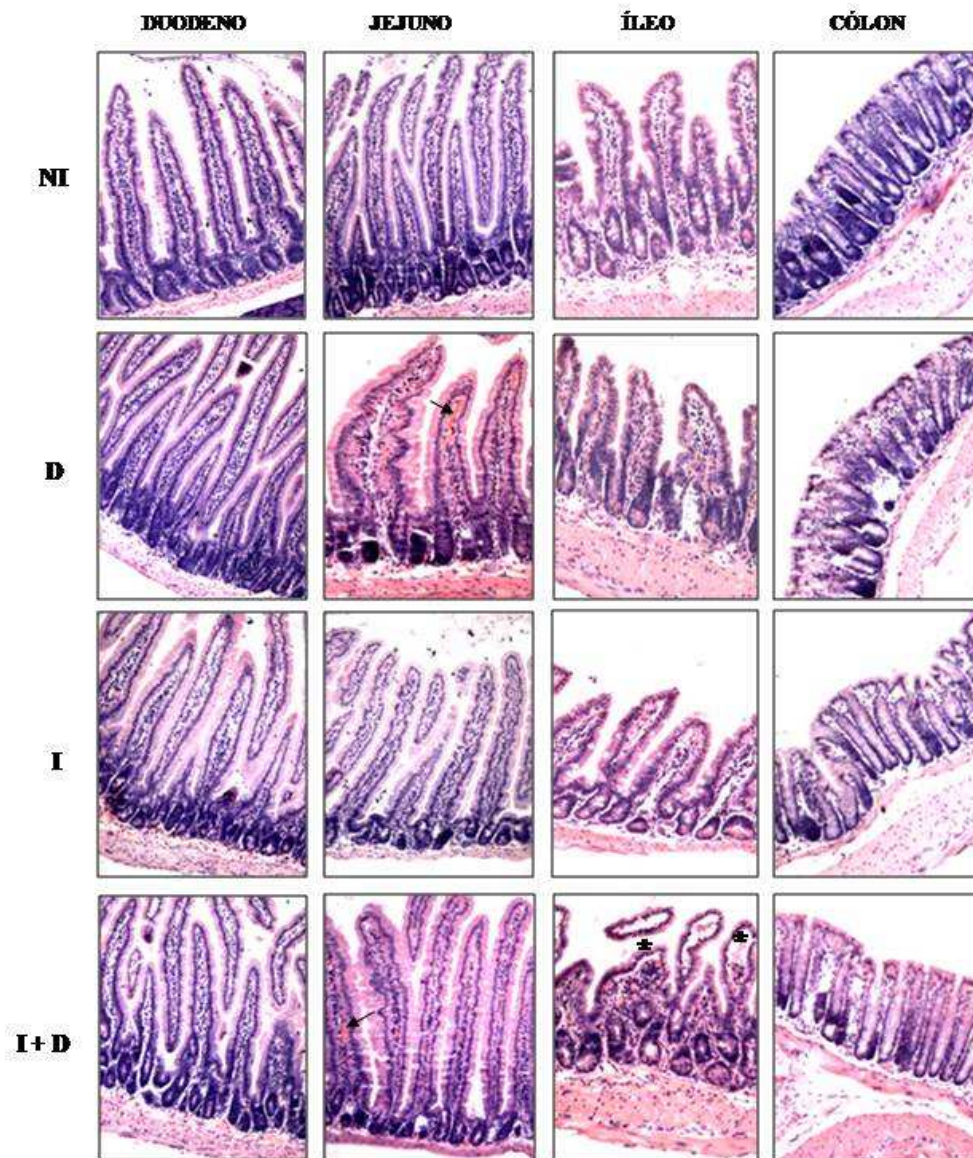


Figura 23. Inflamação intestinal moderada é induzida no grupo experimental deficiente de IL-10 imunizado e desafiado com as sementes de amendoim. O processo inflamatório foi induzido nos animais C57BL/6 IL-10 KO após imunização e exposição às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos (*I + D*). Os grupos controles (*NI*, *D* e *I*) foram submetidos a diferentes protocolos, na presença ou ausência de imunização ou dieta com amendoim. Segmentos intestinais correspondentes ao duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletados, fixados em formaldeído a 10% em PBS, incluídos em parafina e os cortes corados por hematoxilina-eosina. Observa-se presença de infiltrado inflamatório, edema e deformidade das vilosidades intestinais em *I + D* (*). Nota-se também congestão no interior das vilosidades do jejuno do grupo controle *D* e em porções de jejuno e íleo do grupo experimental *I + D* (seta). Aumento original: duodeno, jejuno e íleo, 20X; cólon, 10X.

4.5.3. Participação de anticorpos na imunomodulação da inflamação intestinal em animais deficientes de IL-10

Foram demonstrados os papéis patogênicos e/ou supostamente protetores das imunoglobulinas produzidas em resposta às imunizações com EPA, nos diferentes animais experimentais estudados até este momento. Em vista disso, decidimos investigar a provável participação dos anticorpos na patogenia ou modulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares na ausência de IL-10. Para tal, camundongos IL-10 KO foram submetidos ao protocolo experimental de indução da doença e o soro coletado para dosagem dos anticorpos.

Como visualizado na Figura 24A, camundongos *I* e *I + D* IL-10 KO respondem às imunizações com EPA produzindo anticorpos IgG, na presença ou ausência de desafio. Esta produção é estatisticamente significativa quando comparada aos grupos de animais não imunizados, *NI* e *D* (Figura 24A, *I* vs *NI*, *I* vs *D*, *I + D* vs *NI*, *I + D* vs *D*, $p < 0,05$). Além disso, resultados demonstraram que a produção de IgG anti-EPA foi nitidamente mais elevada nos animais *I* e *I + D* IL-10 KO do que nos camundongos *I* e *I + D* selvagens (Figura 8A).

Dentre as subclasses de IgG produzidas, observamos baixa detecção de IgG2a em *I + D* (Figura 24B, resultado não significativo quando comparado aos controles IL-10 KO) e alta produção de IgG1 nos animais imunizados *I* e *I + D* (Figura 24C, *I* vs *NI*, *I* vs *D*, *I + D* vs *NI*, *I + D* vs *D*, $p < 0,05$). A produção de IgG1 anti-EPA foi também visivelmente mais elevada nos animais *I* e *I + D* IL-10 KO do que nos camundongos *I* e *I + D* selvagens (Figuras 8D e 26).

A detecção de IgE em resposta às imunizações com EPA foi também significativamente aumentada nos grupos imunizados, na presença ou ausência de desafio

(Figura 24D, *I vs NI, I vs D, I + D vs NI, I + D vs D*, $p < 0,05$). Mais uma vez, a produção dessa imunoglobulina, assim como as outras, excedeu a produção nos animais selvagens (Figuras 8D e 26).

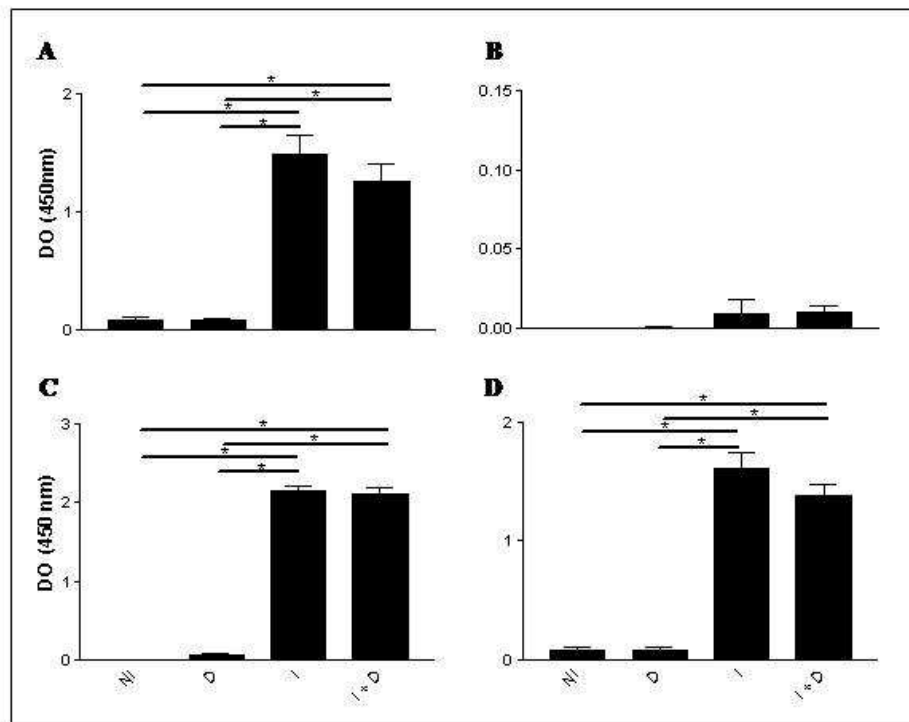


Figura 24. Detecção de anticorpos específicos ao EFA em animais deficientes de IL-10 expostos e não expostos ao amendoim. Camundongos C57BL/6 IL-10 KO foram imunizados e submetidos à dieta com sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, foram sacrificados e o sangue coletado para obtenção de soro e quantificação de imunoglobulinas. Os gráficos representam a média \pm EPM das dosagens de IgG (A), IgG2a (B), IgG1 (C) e IgE (D) específicas ao extrato protéico de amendoim, nos grupos controles (NI, D e J) e experimental (I + D). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. DO: densidade óptica. * $p < 0,05$.

4.5.4. Papel de citocinas na imunomodulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares em animais deficientes de IL-10

Com o intuito de se estabelecer o papel de citocinas na patogenia e imunomodulação do processo inflamatório intestinal na ausência de IL-10, animais C57BL/6 IL-10 KO foram submetidos ao protocolo de imunização e, após 30 dias de desafio, segmentos de jejuno foram coletados e embebidos em meio de conservação de RNA. Após extração de RNA e confecção de cDNA, as amostras foram submetidas a reações de Real Time PCR para quantificação de mensagens para citocinas, através da utilização de *primers* específicos e o sistema SYBR Green.

Os resultados demonstraram expressão aumentada de IL-4 no jejuno dos animais IL-10 KO do grupo experimental *I + D*, estatisticamente significativa quando comparada ao controle *D* (Figura 25A, $p < 0,05$). Observou-se também aumento significativo na detecção de mensagens para IL-5 nos animais *I + D* quando comparados aos controles *NI* e *D* (Figura 25B, $p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças de expressão de RNAm para as citocinas IFN- γ (Figura 25C) e IL-12 p40 (Figura 25D) entre os grupos experimentais e controles IL-10 KO. Além disso, foi demonstrada maior expressão do gene da citocina TNF- α no intestino dos animais controles *NI*, estatisticamente relevante em relação aos camundongos imunizados *I* e imunizados e desafiados *I + D*, onde houve diminuição da expressão de RNAm para essa citocina (Figura 25E, *NI* vs *I* e *NI* vs *I + D*, $p < 0,05$). Os dados relativos à produção de mensagens para TGF- β mostraram que, embora não tenha sido estatisticamente relevante, houve tendência ao aumento da expressão dessa citocina nos animais deficientes de IL-10 submetidos ao amendoim na dieta *D* e *I + D* (Figura 25F).

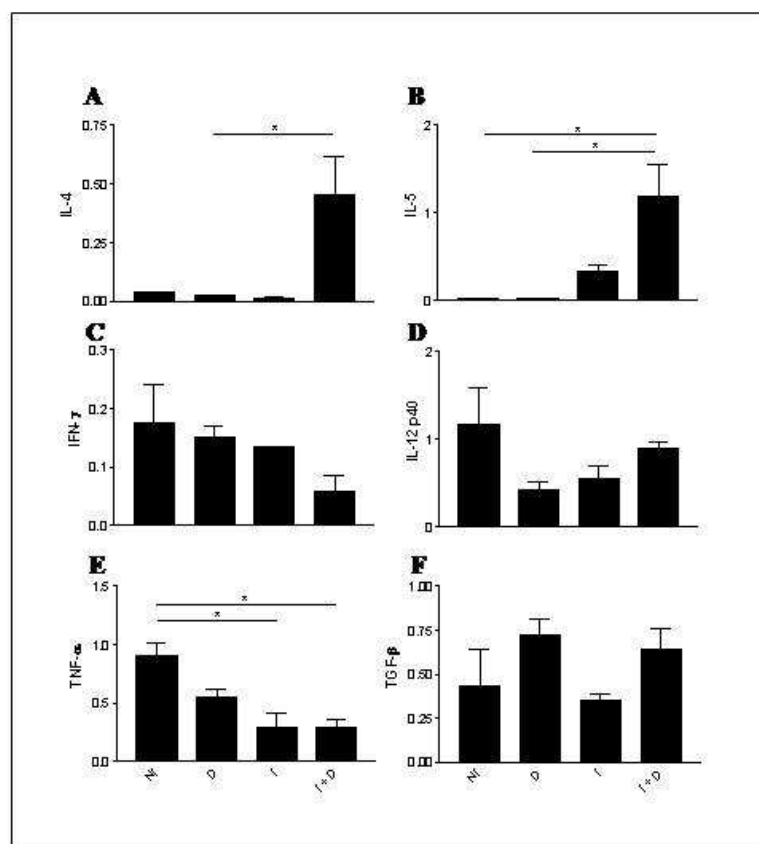


Figura 25. Expressão de mRNA de citocinas no intestino de animais IL-10 KO imunizados e desafiados com as sementes de amendoim. Camundongos C57BL/6 IL-10 KO foram imunizados e expostos às sementes de amendoim por 30 dias consecutivos. Após este período, segmentos de jejuno foram coletados dos grupos controles (NI, D e I) e experimental (I + D) e embalados em meio de conservação para RNA. As amostras foram processadas e, após extração do RNA e confecção de cDNA, foram realizadas reações de Real Time PCR utilizando-se *primers* específicos para detecção de mensageiros para IL-4 (A), IL-5 (B), IFN- γ (C), IL-12 p40 (D), TNF- α (E) e TGF- β (F). Os resultados apresentados indicam os valores da média \pm EPM da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão do gene constitutivo β -actina. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$.

4.6. Comparação da variação de peso, produção de imunoglobulinas e expressão de RNAm no intestino de camundongos imunizados e desafiados *I + D* - selvagens (WT), B KO, IFN- γ KO, IL-4 KO e IL-10 KO

Para melhor visualização dos resultados obtidos neste trabalho e com intuito de realizarmos comparações entre os diferentes grupos de camundongos avaliados, alguns dos resultados mais relevantes para entendimento da imunopatologia da doença foram selecionados e analisados em conjunto frente à indução do processo inflamatório intestinal.

Como observado na Figura 26A, houve perda de peso na maioria dos camundongos imunizados e submetidos à alimentação com amendoim. Porém, esta perda foi mais marcante nos animais IFN- γ KO *I + D* em contraste ao visível ganho de peso nos camundongos deficientes de IL-4 e IL-10.

Ao avaliarmos a produção de imunoglobulinas frente à imunização com EPA e desafio com amendoim, notamos nítida diminuição de IgE antígeno-específica no soro dos animais IL-4 KO quando comparados aos selvagens WT e deficientes de IFN- γ ou IL-10 (Figura 26B, $p < 0,05$). Observamos ainda aumento estatisticamente significativo desses anticorpos nos animais IL-10 KO em relação ao grupo deficiente de IFN- γ (Figura 26B, $p < 0,05$). A produção de IgG1 também foi significativamente mais baixa nos animais deficientes de IL-4 em relação aos demais (Figura 26C, $p < 0,05$), além de aumento significativo no soro dos camundongos IL-10 KO quando comparados aos WT (Figura 26C, $p < 0,05$). Embora tenha havido tendência ao aumento de produção de IgG2a nos soros dos animais IL-4 KO *I + D*, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 26D).

Ao avaliarmos a expressão de IL-5 nos tecidos dos diferentes animais *I + D*, observamos tendência ao aumento de transcritos nos animais deficientes de células B sem, no entanto, ter havido diferença estatística nessa avaliação (Figura 26E). Por outro lado, a expressão de RNAm para IL-4 foi nitidamente mais elevada nos segmentos de jejuno dos camundongos WT *I + D*, estatisticamente significativa quando comparada aos demais B KO, IFN- γ KO e IL-10 KO (Figura 26F, $p < 0,05$). A detecção de mensagens para IL-12 p40 foi também significativamente mais elevada nos tecidos dos animais B KO em relação aos demais (Figura 26G, $p < 0,05$). Da mesma forma, houve maior produção de transcritos para IFN- γ em B KO quando comparados aos animais WT e IL-10 KO (Figura 26H, $p < 0,05$), seguida por tendência ao aumento de expressão dessa citocina nos segmentos intestinais de camundongos IL-4 KO imunizados e desafiados com amendoim. (Figura 26H). A expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α foi visivelmente mais elevada nos animais selvagens WT *I + D* em relação aos demais, corroborando com os dados histopatológicos já apresentados (Figura 26I, $p < 0,05$). Por outro lado, ocorreu a baixa detecção de RNAm para IL-10 em WT *I + D*, em contraste ao aumento das mensagens nos tecidos dos animais deficientes de células B, estatisticamente significativo quando comparado aos WT e IL-4 KO (Figura 26J, $p < 0,05$). Além disso, detectamos pequena tendência ao aumento dessa citocina nos camundongos IL-4 KO e IFN- γ KO em relação aos selvagens, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 26J). Finalmente, embora a detecção de mensagens para TGF- β tenha sido visivelmente menor nos grupos de animais WT e IL-10 KO, essas diferenças não foram estatisticamente significativas quando comparadas aos demais (Figura 26K).

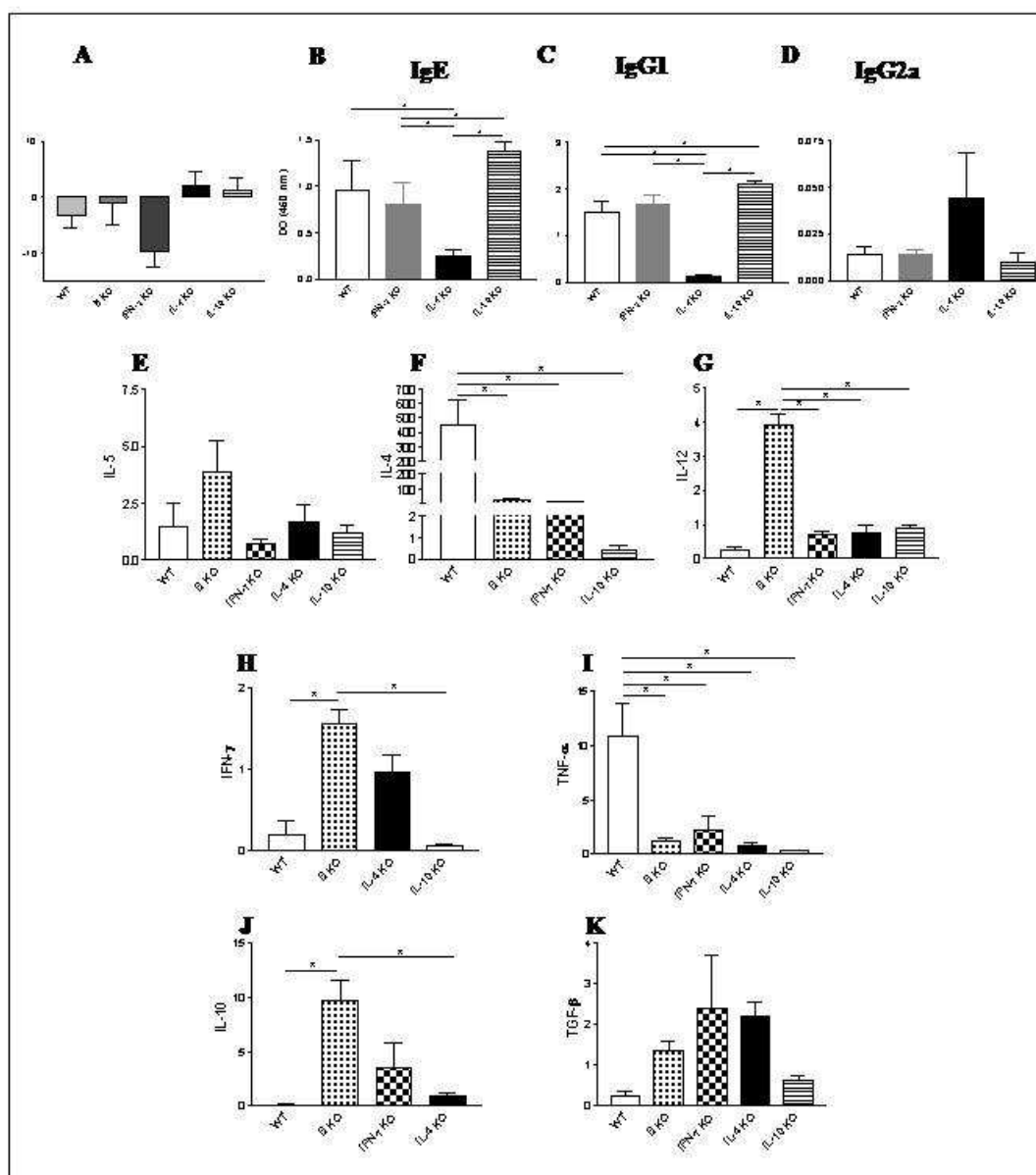
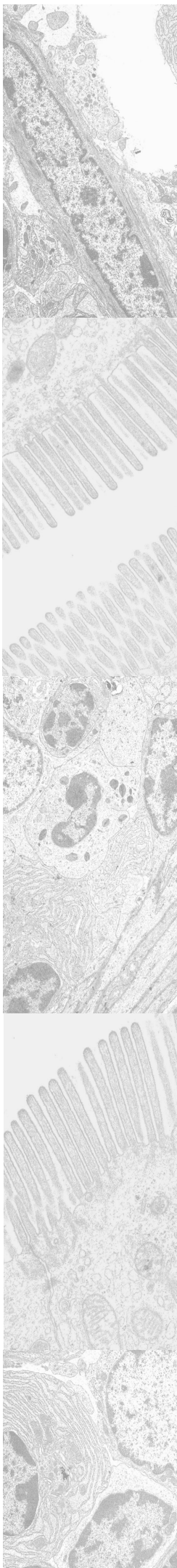


Figura 26: Comparação da variação de peso, produção de imunoglobulinas no soro e expressão de RNAm para citocinas no intestino de camundongos imunizados e desafiados -I + D - selvagens (WT), B KO, IFN- γ KO, IL-4 KO e IL-10 KO após 30 dias de dieta com amendoim. Os gráficos indicam os valores da média \pm EPM da porcentagem de aumento ou diminuição de peso no 30^o dia de desafio em relação ao 1^o dia de exposição às sementes (A); produção de IgE específica ao EPA (B); IgG1 (C); IgG2a (D); expressão de mensageiros para IL-5 (E); IL-4 (F); IL-12p40 (G); IFN- γ (H); TNF- α (I); IL-10 (J) e TGF- β (K). * $p < 0,05$.



Discussão

5. Discussão

A extensa superfície do epitélio intestinal permite processos de secreção, absorção e digestão efetivos que representam funções vitais para o organismo. No intestino, uma resposta imune agressiva contra microorganismos comensais ou peptídeos não próprios como antígenos alimentares pode ser potencialmente prejudicial e desencadear desordens imuno-inflamatórias destrutivas.

Uma barreira mucosa intacta, uma resposta imune inata efetiva e um sistema imune adaptativo tolerante poderiam contribuir para a prevenção de respostas imunes adversas a antígenos alimentares. Estes mecanismos, acompanhados da flora bacteriana intestinal representam um complexo sistema de homeostasia da mucosa. Quando estes mecanismos falham, os componentes alimentares exercem um papel causal direto ou podem contribuir para a perpetuação do processo inflamatório crônico de mucosa em algumas doenças como alergia alimentar, doença celíaca e DII (SEIBOLD, 2005). Apesar do grande progresso no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvendo estas patologias, os eventos iniciais que levam aos distúrbios imunes com conseqüente doença gastrointestinal ainda permanecem obscuros.

Uma grande barreira para o avanço no entendimento da homeostasia de mucosa e das respostas imunes patogênicas no intestino é a ausência de modelos de estudo animais que reproduzem, com fidelidade, o desenvolvimento fisiológico do processo inflamatório intestinal. Neste trabalho, desenvolvemos e caracterizamos um novo modelo murino de inflamação intestinal no qual a quebra da tolerância de mucosa é induzida por proteínas alimentares alergênicas das sementes de amendoim.

A alergia alimentar, em especial alergia a amendoim, é um distúrbio imuno-inflamatório comumente reconhecido como uma reação aguda mediada por IgE após a

ingestão ou inalação de proteínas de amendoim (STRID, 2005). Entretanto, a primeira via de sensibilização ainda não é bem estabelecida, podendo ser por outras vias diferentes do trato gastrointestinal (STRID, 2005). Além disso, sabe-se também que as DII são processos inflamatórios crônicos de longa duração, que acometem a mucosa intestinal. Por estes motivos, os animais utilizados na caracterização desse modelo foram desafiados com a ingestão ininterrupta de sementes de amendoim, por 30 dias consecutivos, *ad libitum*. Dessa forma, foi induzido o processo inflamatório crônico após primeiro encontro com os antígenos por imunizações subcutâneas com extrato protéico de amendoim (EPA).

A alergia a componentes alimentares é relativamente freqüente e pode ser perigosa devido à possibilidade de ocorrência de reações anafiláticas. O amendoim (*Arachis hypogaea*) pertence à família *Leguminosae* (FRIES, 1982). As proteínas Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 3 são consideradas os maiores alérgenos dessas sementes (BURKS et al., 1991; BURKS et al., 1992; BURKS, 1998), seguidos por pelo menos dezesseis outras proteínas, quatro delas oficialmente denominadas Ara h 4, Ara h 5, Ara h 6 e Ara h 7 (KLEBER-JANKE, 1999). Em nosso modelo, as proteínas utilizadas foram, primeiramente, extraídas das sementes de amendoim e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para permitir a análise do perfil eletroforético das mesmas previamente às imunizações. Foram detectadas proteínas com peso molecular aparente similar àquelas já descritas como os alérgenos do amendoim Ara h 1, Ara h 2 e Ara h 3 (KOPPELMANN et al., 2004). Estas proteínas são normalmente reconhecidas pela maioria dos pacientes alérgicos a essas sementes, e são possivelmente responsáveis pela indução dos principais sintomas observados em pacientes com reações de hipersensibilidade (KOPPELMAN et al., 2001; KOPPELMAN et al., 2004).

Uma das barreiras para indução de processos inflamatórios intestinais em modelos animais é a ineficiência da administração oral de antígenos protéicos solúveis para a indução de respostas de hipersensibilidade, já que a administração oral de antígenos normalmente resulta na tolerância imunológica (MILLER et al., 1992). Em vista disso, os camundongos foram imunizados por via subcutânea com EPA e depois desafiados através da exposição crônica às sementes, com o intuito de desenvolvermos um modelo murino fisiologicamente relevante de inflamação intestinal crônica induzida por antígenos alimentares. A imunização destes animais induziu, supostamente, o reconhecimento dos antígenos pelo sistema imune e a quebra do estado de tolerância às sementes após desafio com ingestão repetitiva das mesmas. Estes antígenos, quando introduzidos por via oral, e não mais tolerogênicos, podem ter gerado resposta imune exacerbada do hospedeiro contra as proteínas de amendoim, visualizada claramente e caracterizada pelo desenvolvimento da inflamação intestinal nestes animais.

O primeiro sinal clínico de inflamação intestinal observado foi emagrecimento dos camundongos alimentados com amendoim. Esta perda de peso pode ter sido consequência da má absorção de nutrientes naqueles animais nos quais houve o desenvolvimento da doença ou até mesmo resultado de intolerância ou alergia alimentar ao amendoim, já que este é um alimento altamente alergênico (KOPPELMAN et al., 2004) e foi a única fonte de alimentação dos animais durante a fase experimental de desafio. É importante destacar também que esses camundongos (selvagens) passaram a rejeitar as sementes após a segunda semana de desafio, o que também poderia ser um fator causal para a perda de peso observada, aliada à possível ausência de alimentação nutricionalmente equilibrada, quando alimentados exclusivamente com amendoim. Este último fato justificaria a perda de peso dos animais não imunizados porém alimentados por 30 dias com amendoim.

Os anticorpos IgG1 e IgE foram detectados nos animais imunizados com o extrato protéico, quando comparados àqueles imunizados apenas com PBS e adjuvante, em contraste à baixa detecção de IgG2a. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por KOPPELMAN et al. (2004), onde foram detectados altos índices de IgE em pacientes expostos ao amendoim. Adicionalmente, a presença de anticorpos protetores em resposta a EPA também demonstrou ser importante na regulação da resposta imune de mucosa, visto que a tendência de diminuição de IgA no macerado de intestino dos camundongos alimentados com amendoim (*D* e *I + D*) poderia estar relacionada à facilitação da indução da doença, já que é sabido que anticorpos IgA antígeno-específicos são diminuídos no intestino de camundongos em outro modelo de alergia alimentar já descrito (FROSSARD et al., 2004). Sendo assim, é possível então que a diminuída detecção de IgA nos camundongos *I + D* possa ter facilitado a entrada dos antígenos de amendoim na lâmina própria e, conjuntamente a outros fatores, levado à resposta exacerbada do sistema imune. Estes dados sugerem que a inflamação intestinal induzida por amendoim pode ser compatível com um quadro de alergia alimentar induzida após quebra de tolerância a essas sementes.

Apesar da perda de peso observada em ambos os grupos *D* e *I + D*, apenas os animais previamente imunizados com EPA e desafiados apresentaram características histopatológicas compatíveis com quadro de inflamação intestinal. As alterações foram observadas principalmente no intestino delgado, região essencial para absorção de nutrientes, como proteínas. Em modelo similar HSIEH et al. (2003), mostraram que exposição prolongada a ovalbumina seguida por desafio oral resultou também em alterações histopatológicas no intestino e pulmões dos camundongos em experimentação, assim como elevados níveis de histamina no plasma.

A mucosa intestinal utiliza vários mecanismos com o objetivo de proteger o hospedeiro contra respostas imunes agressivas a constituintes luminais. Estes mecanismos incluem uma resistente barreira física, presença de enzimas que alteram a natureza dos antígenos, produção de anticorpos secretórios e presença de células reguladoras específicas capazes de controlar o processo inflamatório (LIU; LEFRANÇOIS, 2004). Em nosso modelo, esta grande variedade de mecanismos protetores não foi suficiente para impedir a quebra da tolerância de mucosa induzida por amendoim. Estes antígenos levaram ao influxo de células inflamatórias que, após ativação, podem ter liberado mediadores responsáveis pela patogênese da inflamação intestinal em questão.

Sendo assim, o próximo passo foi quantificar e identificar a população de leucócitos presentes no processo inflamatório no intestino delgado. Embora os animais do grupo experimental *I + D* tenham apresentado três a quatro vezes mais células recuperadas que os controles, após digestão enzimática dos tecidos (e possivelmente maior infiltrado leucocitário), não foi detectada presença abundante de linfócitos T. Isto pode ter ocorrido, principalmente, porque esta análise não envolveu a coleta de linfonodos mesentéricos, onde poderia haver maior presença dessas células por ser o local onde a resposta imune é elaborada. Ainda, é sabido a ocorrência de células $CD4^+$ é mais freqüente no cólon, enquanto $CD8^+$ predominam no intestino delgado (SEIBOLD, 1998). Em nossos experimentos, evidenciou-se, principalmente, a presença de células $CD8^+$, células NK, células dendríticas, eosinófilos ativados e linfócitos B no intestino delgado de camundongos imunizados com EPA e desafiados com sementes de amendoim.

Considerando-se que as células $CD8^+$ se constituem em uma das mais importantes populações dentro dos linfócitos intraepiteliais no epitélio do intestino delgado (CHEROUTRE, 2005), sugerimos que estas células poderiam estar envolvidas no

desenvolvimento da resposta inflamatória no intestino de camundongos imunizados e alimentados com as sementes de amendoim. Os linfócitos T CD8⁺ são reconhecidos como citotóxicos e já foi demonstrado que o número de linfócitos intraepiteliais expressando grânulos de citotoxicidade como granzimas e perforinas é aumentado em biópsias de pacientes com enteropatia associada a leite de vaca e em pacientes com doença celíaca (AUGUSTIN et al., 2005). Estes dados justificariam a presença aumentada das células CD8⁺ no intestino dos animais *I + D*. Adicionalmente, estudos recentes demonstraram que estas células são também capazes de responder a antígenos exógenos produzindo citocinas de padrão Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13, contribuindo assim diretamente para o desenvolvimento de respostas alérgicas (SCHALLER et al., 2005). Com base no fato de que as sementes de amendoim são potenciais alérgenos, este trabalho sugere que o aumento da porcentagem de células CD8⁺ no tecido inflamado poderia, ainda, estar relacionado ao processo inflamatório supostamente alérgico induzido por amendoim. É interessante notar que a porcentagem de células dendríticas nos sítios de inflamação foi também elevada e estas células, assim como linfócitos T, podem expressar a molécula CD8 α na sua superfície, sugerindo a possibilidade de que parte da população CD8⁺ encontrada no intestino poderia ser de células dendríticas expressando o mesmo antígeno de superfície que linfócitos T CD8⁺ (ANJUERE et al., 2004).

Sabe-se que a maneira pela qual o antígeno é apresentado ao sistema imune é também um fator crucial que controla o estabelecimento do estado de tolerância ou imunidade, e evidências indicam que, neste estudo, células dendríticas (e também macrófagos CD11b⁺, dados não mostrados) foram as principais células apresentadoras de antígeno (APC) envolvidas. CHIRDO et al. (2005), mostraram que o englobamento de

antígenos pelas células dendríticas na lamina própria intestinal exerce papel central na indução da tolerância oral a proteínas provenientes da alimentação, e que este estado “quiescente” das células dendríticas é mantido por fatores como PGE₂ ou TGF-β no microambiente local. Em nossos estudos, não foi estabelecido o estado de ativação ou quiescência dessas células, porém propomos que a presença aumentada de células dendríticas no tecido intestinal dos animais experimentais *I + D*, associada à diminuição de TGF-β (visto posteriormente), está de acordo com o fato de este ter se tornado um sítio mais inflamatório, visto que estas foram, possivelmente as células envolvidas na captura e apresentação dos antígenos de amendoim para os linfócitos T durante o desenvolvimento da resposta imune patogênica. Em 2004, CHAMBER et al. demonstraram que a transferência adotiva de células dendríticas de camundongos com alergia alimentar para animais “naive” induziu produção de IgE mesmo na ausência de posterior desafio com o antígeno. Este fato demonstra, mais uma vez, a provável participação de células dendríticas na indução do processo inflamatório supostamente alérgico em nosso modelo. Células dendríticas derivadas do tecido gastrintestinal de camundongos alérgicos são também resistentes à apoptose mediada por células T, em comparação a controles não alérgicos (MAN et al., 2004). Embora também não tenhamos analisado os índices de apoptose, este fato poderia justificar, mais uma vez, a presença aumentada de células CD11b⁺CD11c⁺ em nosso modelo. Além disso, nossos resultados estão de acordo com relatos anteriores onde camundongos imunizados com proteínas de amendoim apresentaram recrutamento de macrófagos para o pulmão após desafio oral ou nasal com as mesmas proteínas (FISCHER et al., 2005).

Pouco se sabe sobre a participação das células NK em processos alérgicos (AKTAS et al., 2005). Em 1998, PERITT et al. descreveram a diferenciação de células NK humanas nos subtipos NK1 e NK2, sendo as últimas produtoras de citocinas Th2 como IL-5 e IL-13. Neste trabalho, foi observada elevada porcentagem de células NK no intestino delgado de animais de ambos os grupos imunizados com EPA, *I* e *I + D*, além de alta expressão de IL-13 em *I + D*. Estes camundongos também apresentaram produção das imunoglobulinas IgG1 e IgE específicas a EPA, sugerindo que as células NK encontradas poderiam ser do fenótipo NK2 sendo responsáveis, pelo menos em parte, pelo quadro alérgico observado nesses animais (KATSUMOTO et al., 2004). Ainda, os resultados obtidos estão parcialmente de acordo com estudos prévios que demonstraram o papel de células NK na modulação da resposta de células B e na produção de anticorpos, além da sua capacidade de interagir diretamente com linfócitos B e/ou produzir citocinas que regulam a diferenciação desses linfócitos e mudança de classe de imunoglobulinas (SATOSKAR et al., 1999; AKTAS et al., 2005). Além disso, as células NK detectadas poderiam ser as responsáveis pela produção de IL-13 e pela imunopatologia intestinal observada em *I + D*, visto que células NK intraepiteliais são capazes de produzir IL-13, sendo responsáveis pela lesão tecidual no intestino de camundongos infectados com nematódeos (McDERMOTT et al., 2005).

Linfócitos B de camundongos SAMP1/YitFc, importante modelo animal para estudo de doença de Crohn, são capazes de se proliferar e bloquear a ação de células T reguladoras (Tregs) contribuindo, dessa forma, para a exacerbação da ileíte observada nesses animais (OLSON et al., 2004). Neste modelo, o comportamento das células B parece ser devido à expressão de GITRL e sua interação com o GITR presente nas células reguladoras, levando à inibição da função das Tregs $\alpha_E^+CD4^+$ (OLSON et al., 2004).

Nossos resultados indicam uma grande população de linfócitos B (CD19⁺) no intestino de camundongos imunizados e desafiados com sementes de amendoim, associada à baixa expressão do fator de transcrição específico para Tregs, Foxp3. Além disso, foi visualizado infiltrado plasmocitário no interior da lâmina própria dos animais do mesmo grupo experimental. Estas células apresentavam retículo endoplasmático rugoso evidenciado com cisternas dilatadas, indicativo de alta produção protéica. A presença de plasmócitos e linfócitos B no infiltrado inflamatório desses animais sugere mais uma vez a participação relevante de células produtoras de anticorpos e seus produtos na patogênese da inflamação intestinal induzida por amendoim.

Eosinófilos são células cuja uma das principais funções é participar de processos alérgicos mediados por IgE, causando, possivelmente, dano tecidual e imunopatologia (LAMPINEN et al., 2004; WILSON et al., 2005). De fato, grande número de doenças está associado à eosinofilia, como asma, rinite alérgica, doenças atópicas da pele, síndrome hipereosinofílica idiopática e doença inflamatória intestinal (MAKIYAMA et al., 1995; SILBERSTEIN, 1995). A ativação de eosinófilos pode levar à geração de ampla variedade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, TNF- α , RANTES, MIP-1 α , VEGF e eotaxina, sugerindo sua potencial participação na modulação da resposta imune (KITA, 1996).

Com base nesses dados, avaliamos a participação de eosinófilos no modelo apresentado e verificamos que estas células poderiam também exercer importante papel na inflamação alérgica intestinal, já que elevados níveis de IgE haviam sido detectados nos animais imunizados com EPA. Os resultados demonstraram que camundongos imunizados *I* e *I + D* apresentavam grande influxo de eosinófilos no intestino. Estes dados estão de

acordo com SALINAS et al. (2006), onde foi observada a importância da participação do infiltrado eosinofílico na patogenia de colite alérgica em crianças recém-nascidas alimentadas exclusivamente com leite materno. Ainda, o elevado número dessas células no intestino poderia ser indício de sua participação na destruição tecidual e na resposta alérgica induzida por amendoim. Concomitantemente, observamos aumento expressivo de mastócitos de submucosa em *I + D*, sugerindo que a inflamação intestinal induzida pela imunização seguida por desafio, via oral, com sementes de amendoim, pode ser mediada também por infiltrado de mastócitos, acompanhado da provável liberação de mediadores e citocinas como TNF- α , além de desgranulação mediada pela ligação de IgE aos antígenos de amendoim e aos mastócitos no sítio inflamatório (STOTEN et al., 2005). Esses resultados estão em concordância com aqueles mostrados por RIJNIERSE et al. (2006), onde foi observado o relevante papel de mastócitos e da citocina TNF- α por eles produzida, na patogênese da colite experimental induzida por 2, 4 dinitrobenzeno. Ainda, concordando com os resultados obtidos em nosso trabalho, no modelo experimental descrito por SALDANHA et al (2004), camundongos que foram imunizados com ovalbumina (OVA) e desafiados por via oral com uma solução de OVA por 3 semanas consecutivas, apresentaram infiltrado inflamatório intestinal com presença de eosinófilos e mastócitos após desafio. Foi observado também aumento da produção de muco pelas células caliciformes além de elevados níveis de IgE e IgG1 no soro desses animais em resposta à ovalbumina. Em nossos experimentos, o aumento expressivo de mastócitos de submucosa em *I + D* concomitantemente ao maior número de mastócitos de mucosa nos animais do grupo *D* sugere que as distintas populações de mastócitos (de mucosa e de submucosa) além de possuírem grânulos de constituição química e produção de mediadores diferentes

(KAMBE et al, 2004; LIU et al 2005), poderiam exercer funções distintas na indução de tolerância oral ou doença na alergia alimentar.

Tem sido mostrado que, assim como a migração de células inflamatórias para o intestino, a modulação da doença por fatores liberados por essas células é de grande importância para o desenvolvimento das DII (STROBER et al., 2002; DRAKES et al., 2005; ELSON et al., 2005). Desse modo, tendo como objetivo investigar a participação de diversas citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e fatores de transcrição intracelulares na destruição tecidual presente nos animais *I + D*, caracterizamos o padrão de expressão de RNAm dessas moléculas no intestino dos camundongos controles e experimentais submetidos ao protocolo experimental de indução da inflamação intestinal por amendoim. As análises foram concentradas em segmentos de jejuno devido às extensas lesões observadas nessa porção do intestino delgado dos animais *I + D*.

Neste modelo proposto, os altos níveis de expressão de RNAm da citocina TNF- α nos animais experimentais *I + D*, como já descrito anteriormente, demonstraram o estado pró-inflamatório da mucosa intestinal após desafio com amendoim. De forma interessante, animais do grupo controle *D*, não imunizados porém alimentados exclusivamente com amendoim por 30 dias também apresentaram alta expressão dessa citocina, como detectado por Real Time PCR. A presença aumentada de TNF- α no intestino dos animais inflamados corrobora com um modelo de ileocolite no qual a produção desregulada dessa citocina no intestino resultou em resposta imune adaptativa anormal e patologia intestinal (KONTOYIANNIS et a, 1999). Por outro lado, ao contrário do grupo experimental, camundongos *D* demonstraram alta expressão de mensagens para IFN- γ , TGF- β e IL-10, confirmando o quadro de tolerância alimentar induzida pela administração contínua dos

antígenos por via oral (FROSSARD et al., 2004, MIYAMOTO et al., 2005), e ausência de extensas lesões teciduais, como em *I + D*.

É sabido que respostas Th2 são essenciais para o desenvolvimento de doenças atópicas e que o fator de transcrição Gata-3 é importante para expansão de células Th2 em detrimento de Th1 (LI-WEBER; KRAMMER, 2003; ZHU et al., 2004). Em concordância com a alta produção de IgG1 e IgE observadas, os tecidos inflamados demonstraram alta expressão de Gata-3, além de mensagens para as citocinas IL-4 e IL-13, possivelmente produzidas pelas poucas células T presentes no tecido e por células como mastócitos e basófilos, após ligação cruzada com os antígenos de amendoim e IgE (KELLY-WELCH et al., 2005). Em contrapartida, embora IL-5 já tenha sido descrita como uma das principais citocinas presentes na inflamação intestinal alérgica (BAE et al., 1999), não detectamos diferenças significativas na expressão dessa citocina em nosso modelo, apesar do infiltrado eosinofílico presente nos segmentos de intestino delgado dos camundongos *I + D*. Ainda, estes animais apresentaram baixa expressão de RNAm para as citocinas de padrão Th1 como IL-12p40, IL-23p19 e IFN- γ . Esses dados estão de acordo com VAN KAMPEN et al. (2005), que descreveram modelo de inflamação intestinal Th2 induzido por IL-4. Nessas condições, os camundongos desenvolveram colite independente de células T, embora menos severa e de menor duração que aquela induzida por IL-12. Adicionalmente, estudos prévios relataram também a alta detecção de citocinas como IL-4 em contraste à baixa produção de IFN- γ em crianças com alergia alimentar, em resposta aos alérgenos para os quais elas haviam sido sensibilizadas, entre eles o amendoim (SCOTT-TAYLOR et al., 2005). Por outro lado, os alérgenos de amendoim Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 e Ara h 6 podem direcionar a resposta a um padrão misto Th1/Th2 em um modelo de sensibilização

oral com proteínas de amendoim e toxina colérica (WIJK et al., 2004). Os resultados obtidos da caracterização do nosso modelo estão também parcialmente de acordo com aqueles apresentados por HOGAN et al., 2000, onde camundongos sensibilizados com partículas antigênicas encapsuladas e desafiados via oral com o alérgeno desenvolveram hipersensibilidade intestinal eosinofílica. Esses animais apresentaram altos níveis de IgE e IgG1 antígeno-específicas no soro e padrão de resposta Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13 no baço e linfonodo mesentérico, após desafio. Ainda, houve desenvolvimento de congestão vascular, edema e infiltrado celular proeminente no jejuno dos camundongos desafiados, quando comparados aos controles. Além disso, BETTS et al., 2004 demonstraram que a exposição de camundongos a alérgenos de amendoim resultou em estimulação seletiva de resposta imune de padrão Th2.

Enquanto é amplamente conhecida a participação de quimiocinas e receptores de quimiocinas nas DII (MAZZUCHELLI et al., 1994; GERBER et al., 1997; MacDERMOTT et al., 1998; UGUCCIONI et al., 1999; AJUEBOR; SWAIN, 2002; D'AMBROSIO; PANINA-BORDIGNON; SINIGAGLIA, 2003), poucos estudos têm mostrado os mecanismos de regulação do tráfego de leucócitos para o intestino na alergia alimentar (NICKEL et al., 1999).

Surpreendentemente, em nosso modelo, a expressão de RNAm para a quimiocina CXCL9 (Mig) foi aproximadamente dez vezes mais alta nos animais imunizados e desafiados *I + D* que nos controles *NI*, *D* e *I*. CXCL9 é uma quimiocina normalmente induzida pela citocina IFN- γ em sinergismo com TNF- α e está envolvida no recrutamento de células NK e linfócitos T ativados para o sítio inflamatório (DAJOTOY et al., 2004). Recentemente foi demonstrado que quimiocinas como CXCL9 podem induzir diversas vias

de sinalização, ao mesmo tempo em que o receptor de quimiocinas presente em eosinófilos CCR3, previamente identificado como potente receptor de ativação em eosinófilos, pode gerar sinais negativos para essas células caso haja a ligação de quimiocinas como CXCL9 (FULKERSON et al., 2005). A alta expressão de CXCL9 pode ter sido uma forma de reação do tecido intestinal frente à extensa produção de fatores patológicos do padrão de resposta Th2, além da tentativa de inibição do papel dos eosinófilos neste modelo. Além disso, esta quimiocina pode estar envolvida também na modulação de respostas alérgicas no pulmão através da regulação da ativação de linfócitos e do recrutamento de eosinófilos (THOMAS et al., 2004). Também já é sabido que após estímulo com IFN- γ , eosinófilos sintetizam e liberam CXCL9 e CXCL10 (IP-10) e expressam RNAm para CXCL11 (I-TAC). Neste caso, TNF- α mas não IL-1 aumenta essa expressão (DAJOTOY et al., 2004). Outros trabalhos mostraram que a expressão de CXCL9 pode ser induzida também por IL-4 (ALBANESI et al., 2000), inclusive exacerbando a doença em modelo de colite induzida por transferência de células Th1 (FORT et al., 2001). Embora estudos futuros ainda sejam necessários para melhor elucidação do papel de CXCL9 em nosso modelo, sugerimos que os eosinófilos presentes nos tecidos inflamados podem estar produzindo esta quimiocina principalmente via indução de TNF- α e/ou IL-4, já que não houve detecção expressiva de IFN- γ nesses tecidos nem presença evidente de células de padrão Th1, como normalmente ocorre na presença de CXCL9 (DAJOTOY et al., 2004). Embora CXCR3, receptor de CXCL9, não tenha sido altamente expresso nos tecidos inflamados, esta quimiocina poderia estar contribuindo para o recrutamento de células NK, supostamente importante reguladoras do processo inflamatório intestinal induzido por amendoim.

De forma interessante, embora tenhamos observado grande infiltrado de eosinófilos, não foi detectada, nesses tecidos, alta expressão de CCL11 (eotaxina), quimiocina responsável pelo recrutamento de eosinófilos da corrente sanguínea para o sítio inflamatório (KANG et al, 2005). Neste ponto, a análise da participação desta quimiocina pode ter sido limitada pela técnica utilizada, visto que Real Time PCR permite a quantificação apenas de mensagens para determinados genes, e não verificação da proteína produzida. É possível que, embora não tenhamos detectado expressão significativa de mensagens para CCL11 após 30 dias de dieta, haja a presença dessa proteína nos tecidos inflamados, tendo em vista o infiltrado eosinofílico presente. Para confirmação desses dados seria necessária a avaliação, além da presença da proteína, da produção de RNAm para CCL11 em períodos mais precoces, anteriores ao 30º dia de exposição às sementes. Em contrapartida, sabe-se que pacientes com doença de Crohn ou colite ulcerativa apresentaram níveis de CCL11 elevados no soro, contribuindo para as evidências da participação de eosinófilos nessas patologias intestinais (MIR et al., 2002). Por outro lado, é possível também que a presença aumentada dessas células nos tecidos inflamados seja devida à presença de outras quimiocinas como CCL5 (RANTES) (SPECHT et al, 2006) ou até mesmo a citocina IL-13, também capaz de atrair eosinófilos para sítios inflamatórios (HAMILLOS et al, 1999; LARBI et al, 2003).

A severidade do processo inflamatório induzido por amendoim pode, ainda, ter sido a consequência da diminuição dos mecanismos regulatórios envolvidos na homeostasia de mucosa, como demonstrado pela baixa expressão de RNAm para TGF- β e IL-10 no intestino dos animais inflamados, visto a importância dessas citocinas na regulação dos processos inflamatórios de mucosa (SHI et al., 1999; FROSSARD et al., 2004). Estes

camundongos também apresentaram baixa detecção de transcritos para Foxp3. De acordo com HORI et al., 2003, pacientes com mutação neste fator de transcrição possuem, especificamente, ausência de Tregs CD25⁺ e exibem doenças alérgicas caracterizadas por eczema severo, altos níveis de IgE, eosinofilia e alergia alimentar. Além disso, células T CD4⁺CD25⁺ são capazes de impedir o desenvolvimento de colite em camundongos Scid ou Rag $\gamma^{-/-}$, induzida pela transferência de células T CD4⁺CD45RB^{high} para estes animais (MOTTET et al., 2003).

Em nosso modelo, a modulação da inflamação intestinal por células reguladoras, citocinas ou imunoglobulinas parece ser decisiva no direcionamento do quadro imunopatológico observado nos animais imunizados e alimentados com amendoim. Nesse sentido, buscando melhor esclarecer o papel desses fatores na imunomodulação da doença, avaliamos o desenvolvimento da inflamação intestinal nos animais deficientes de células B, IFN- γ , IL-4 e IL-10 frente à imunização e desafio dos camundongos com proteínas de amendoim.

Com relação ao papel de linfócitos B observamos que animais B KO imunizados e submetidos à dieta com amendoim perderam menos peso que os animais selvagens sem, no entanto, diminuírem o consumo das sementes, demonstrando novamente a possível participação de IgG1 e IgE na imunopatologia da doença. Além disso, mais uma vez existe a possibilidade da perda de peso ser consequência de uma dieta nutricionalmente desequilibrada oferecida a esses animais, justificando a dificuldade de ganho de peso nos animais não imunizados porém também expostos ao amendoim na alimentação, *D*. Ainda, estes resultados demonstraram que a ausência de IgA protetora na mucosa intestinal poderia também contribuir para indução de danos teciduais em camundongos deficientes de células

B, como visto nas alterações morfológicas observadas em todos os grupos experimentais e controles B KO, principalmente com presença de congestão no interior das vilosidades. Este papel protetor de IgA foi ainda mais visível quando analisamos segmentos intestinais de animais B KO imunizados e desafiados com amendoim. Nestes tecidos, além da presença de congestão, observamos deformidade das vilosidades e pequeno alargamento com diminuição da altura das mesmas, sugerindo um processo inflamatório inicial nesses animais, porém nitidamente inferior àquele encontrado nos animais WT *I + D*. Estes dados nos permitem concluir que, além dos anticorpos patogênicos IgG1 ou IgE, a ausência de IgA protetora poderia também levar ao desenvolvimento de inflamação intestinal em camundongos B KO.

Em adição à impossibilidade da participação de anticorpos de padrão Th2 no desenvolvimento da doença, verificamos tendência ao aumento de expressão das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 nos segmentos intestinais dos animais B KO *I + D* ao compararmos com os controles B KO *NI*, *D* e *I*. Assim como os selvagens, os camundongos B KO *I + D* apresentaram padrão de resposta tipo Th2 quando submetidos ao protocolo de indução da inflamação intestinal por amendoim. Porém, ao compararmos apenas os animais imunizados e desafiados (*I + D*) WT e B KO, observamos que a indução da doença na ausência de linfócitos B levou à diminuição da produção de transcritos para IL-4 e TNF- α , demonstrando o papel supostamente patogênico dessas citocinas e sua relação com a presença de linfócitos B na indução do quadro inflamatório nos camundongos selvagens. Em contrapartida, na ausência de células B e seus produtos, houve aumento da expressão de IL-12, IFN- γ e IL-10, contrabalançando o perfil de resposta imune apresentado por camundongos selvagens imunizados e desafiados com os antígenos alimentares. Os

resultados obtidos demonstraram a possibilidade de controle desse processo inflamatório na ausência de células B, sendo sua presença um dos fatores essenciais para o desenvolvimento da doença. Sendo assim, esses dados confirmam novamente a hipótese da participação de imunoglobulinas na patogênese da doença em nosso modelo. Ainda, trabalhos demonstraram que a participação de células B antígeno-específicas é requerida para a indução de inflamação de mucosa, funcionando, provavelmente, como células apresentadoras de antígenos para proteínas solúveis na inflamação pulmonar alérgica em animais deficientes de IgA. Neste caso, a deficiência de IgA está relacionada a um menor acúmulo de linfócitos B na mucosa pulmonar e conseqüente diminuição das citocinas IL-4 e IL-5 após indução do quadro alérgico (ARNABOLDI et al., 2005). Esses resultados concordam parcialmente com aqueles apresentados aqui onde foi detectada nítida participação de linfócitos B no desenvolvimento do processo inflamatório alérgico, com diminuição da imunopatologia e resposta Th2 no intestino de camundongos B KO *I + D* quando comparados aos selvagens imunizados e desafiados.

Uma vez constatado o mecanismo supostamente alérgico e dependente de anticorpos e células B no desenvolvimento da inflamação intestinal induzida por amendoim, a próxima etapa foi investigar a participação da citocina IFN- γ na modulação desse processo inflamatório.

É sabido que a indução de IFN- γ em modelo de alergia a amendoim suprime a reação de hipersensibilidade a essas sementes (LEE et al., 2001). Em nosso modelo, esta citocina pareceu exercer função importante na modulação da inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares. Enquanto a produção de anticorpos “patogênicos” IgG1 e IgE permaneceu da mesma forma que nos animais selvagens, na ausência de IFN- γ os animais

perderam aparentemente mais peso frente às imunizações e desafios com amendoim do que camundongos WT submetidos ao mesmo protocolo experimental. Ao compararmos a expressão de RNAm para citocinas somente dentro do grupo “IFN- γ KO”, notamos perfil alérgico-inflamatório no intestino dos camundongos *I + D*, compatível com o quadro esperado durante o desafio com proteínas alergênicas na ausência de IFN- γ . Estes resultados corroboram mais uma vez com a hipótese de inflamação intestinal mediada por mecanismos alérgicos nesses animais. De forma semelhante, porém em outro modelo de estudos, na ausência de IFN- γ camundongos C57BL/6 desenvolveram resposta alérgica aumentada ao fungo *Cryptococcus neoformans*, com aumento de produção de citocinas tipo Th2 (ARORA et al., 2005). No entanto, ao contrário do esperado, camundongos IFN- γ KO não apresentaram lesões intestinais de duodeno e jejuno mais severas que os animais selvagens, com exceção do evidente infiltrado inflamatório e ampla destruição das vilosidades do íleo. Estes resultados podem ser devidos à diminuição de TNF- α e IL-4 e à tendência ao aumento das mensagens para as citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β nos segmentos de jejuno dos animais na ausência de IFN- γ , demonstrando que, embora esses animais não tenham sido capazes de controlar o processo alérgico através da produção de IFN- γ , o aumento de expressão de citocinas reguladoras foi supostamente capaz de suprimir parte do processo inflamatório intestinal, visualizado por lesões menos evidentes nesses animais em relação aos selvagens. Embora estudos futuros ainda sejam necessários para elucidação dos mecanismos envolvidos na supressão dessa resposta inflamatória, o papel protetor de IL-10 e TGF- β no intestino dos camundongos IFN- γ KO imunizados e desafiados com os antígenos alimentares alergênicos parece ser devido à ação de células T reguladoras no sítio inflamatório, atenuando os efeitos deletérios da resposta Th2 nesses

animais. Assim como nos animais B KO, o balanço entre citocinas pró-inflamatórias, reguladoras e indutoras de resposta alérgica demonstrou ser essencial para o controle da doença.

Como visto até agora, a patogênese da inflamação intestinal neste novo modelo é supostamente dependente da indução de respostas tipo Th2, com a participação de citocinas como IL-4. Logo, com a finalidade de estabelecer o real papel dessa citocina na patologia estudada, submetemos camundongos IL-4 KO ao protocolo de imunizações e desafio com sementes de amendoim.

Ao contrário dos animais selvagens, deficientes de células B ou IFN- γ KO, camundongos deficientes de IL-4 ganharam peso durante o período experimental, demonstrando a importância da supressão da resposta imune mediada por essa citocina no controle da patogênese da doença.

Os animais IL-4 KO *I + D* responderam ao EPA de maneira oposta aos anteriores, inclusive com produção mais alta de IgG2a e diminuição de IgG1 e IgE, quando comparados aos demais grupos, evidenciando a influência de IL-4 na mudança de classe de anticorpos “patogênicos” em camundongos WT *I + D*. Além disso, ao avaliarmos secções histológicas de segmentos intestinais de camundongos IL-4 KO experimentais e controles verificamos, novamente, a relevância da participação dessa citocina na indução do processo inflamatório. A ausência de lesões no intestino desses camundongos após imunização e desafio com sementes de amendoim forneceu importantes evidências de que, nesse modelo de inflamação intestinal, a citocina IL-4 exerce papel fundamental na patogenia da doença. Da mesma forma, estudos anteriores também já haviam demonstrado a importância da

expressão de IL-4 no desenvolvimento de alergia alimentar em humanos (COEFFIER et al., 2005).

A ausência de IL-4 possibilitou o aumento de expressão de RNAm para TGF- β , IL-10 e IFN- γ nos animais *I + D* em relação aos controles *NI*, *D* e *I*. De forma similar, quando comparados aos animais experimentais WT *I + D*, camundongos IL-4 KO foram capazes de limitar o processo inflamatório supostamente por meio da diminuição da expressão de fatores inflamatórios como TNF- α , maior produção de transcritos para citocinas reguladoras e também IFN- γ , na tentativa de modulação da resposta imune patológica que ocorrer em animais selvagens (PENG et al., 2002). Nossos resultados estão em concordância com os papéis contraditórios e com a necessidade do balanço entre citocinas reguladoras, IL-4, IFN- γ na modulação de respostas imunes protetoras ou patogênicas. Em outro modelo, onde foi estudada a indução da doença do enxerto versus hospedeiro com a utilização de camundongos doadores deficientes de IFN- γ ou IL-4 ficou claramente demonstrado, assim como no processo inflamatório induzido por amendoim, o papel patogênico de IL-4 em contraste à proteção induzida por IFN- γ (MURPHY et al., 1998). Ainda, estudos anteriores também apontaram o papel relevante de IL-4 no desenvolvimento de respostas alérgicas tipo Th2 em modelo murino de asma. Neste trabalho, animais deficientes de IL-4 apresentaram proteção à doença através da indução de IFN- γ e IgG2a e diminuição de anticorpos Th2 como IgG1 e IgE específicos ao alérgeno em questão (KOMAI et al., 2003).

Finalmente, investigando a função da citocina reguladora IL-10 neste modelo, camundongos IL-10 KO foram imunizados e desafiados com as sementes de amendoim.

Verificamos que a participação de IL-10 na regulação da imunopatologia intestinal em nosso modelo foi ambivalente pois, ao mesmo tempo em que demonstrou ser importante na modulação da produção de anticorpos Th2 anti-EPA (animais IL-10 KO *I + D* apresentaram índices mais altos de IgG1 e tendência ao aumento de IgE quando comparados aos selvagens *I + D*), camundongos IL-10 KO *I + D* não apresentaram ampla destruição tecidual, com exceção de lesões no íleo e da presença de congestão no jejuno dos animais alimentados com amendoim. A presença de pouco processo inflamatório nesses segmentos intestinais pode ser devida à menor expressão de IL-4 e TNF- α nesses tecidos, já que estas são, possivelmente, as citocinas envolvidas no dano tecidual em animais WT *I + D*, mesmo na ausência da citocina reguladora IL-10. Ao contrário, quando avaliamos o desenvolvimento da inflamação intestinal dentro do grupo de animais IL-10 KO, foi visível a indução da doença nos camundongos imunizados e desafiados, embora menos significativa que no grupo WT. Trabalhos anteriores mostraram que a reversão do quadro inflamatório de colite induzida por administração de DSS ocorre após administração de vetor adenoviral de IL-10 (SASAKI et al., 2005); ou seja, IL-10 é uma citocina importante para a regulação dos processos inflamatórios de mucosa. É importante salientar também que, embora animais IL-10 KO desenvolvam colite espontaneamente, essa inflamação intestinal exacerbada não foi observada como esperado em nossos experimentos. Isto se justificaria pelo fato de não terem sido avaliados camundongos IL-10 KO com idade entre 10 e 25 semanas quando esta doença começa de fato a se desenvolver (SPECHT et al., 2006). Adicionalmente, ao avaliar-se a produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico de crianças com dermatite atópica verificou-se, dentre outras citocinas, diminuição da produção de IL-10 frente a estímulos como alimentos, flora intestinal,

Staphylococcus aureus e vacinas (DUNSTAN et al., 2005), mostrando a necessidade da presença dessa citocina no controle de processos alérgicos. Ainda, em trabalhos envolvendo a indução de inflamação eosinofílica em modelo murino de asma, foi observado que animais deficientes de IL-10 apresentaram produção reduzida de IL-5, na ausência de alterações significativas nos níveis de IL-4 e IgE, concomitante ao aumento de produção de IL-12 e IFN- γ em resposta à imunização e desafio com ovalbumina (YANG et al., 2000). Estes resultados estão parcialmente de acordo com os nossos, onde camundongos IL-10 KO imunizados e desafiados com amendoim não demonstraram alteração significativa no padrão de expressão de IFN- γ e IL-5, porém apresentaram aumento aparente de transcritos para IL-12 no intestino, e elevada produção de IgE no soro, quando comparados aos animais selvagens *I + D*. Estudos futuros ainda são necessários para se determinar o papel de IL-10 na inflamação intestinal em camundongos em idade mais avançada, nos quais a ausência de regulação dos mecanismos inflamatórios de mucosa é um evento chave no desenvolvimento de doenças intestinais. É possível que a indução da inflamação intestinal por amendoim em animais IL-10 KO mais velhos resulte em resultados mais promissores, com provável aumento da destruição tecidual frente aos antígenos de amendoim.

Além de todos esses fatores observados até então, não se pode subestimar também, sob outro ponto de vista, a participação da flora comensal assim como de mecanismos autoimunes da patogênese da inflamação intestinal demonstrada neste trabalho. BASHIR et al. (2004), demonstraram que a sinalização via TLR4 pela microbiota intestinal ou por produtos como carragenina pode prevenir reações alérgicas. Em nosso modelo é possível que, juntamente às respostas alérgicas induzidas por amendoim, a flora comensal poderia estar não funcional, dessa forma não sendo capaz de ativar TLR4 e induzir inibição do

desenvolvimento da inflamação intestinal alérgica. Além disso, estudos anteriores já demonstraram que citocinas Th2 são capazes de induzir a diminuição da expressão de TLR3 e TLR4 em células epiteliais intestinais humanas, levando à maior susceptibilidade de desenvolvimento de processos inflamatórios intestinais crônicos (MUELLER et al, 2006), fato que também poderia estar ocorrendo em nosso modelo. Por outro, é também possível que possa ter ocorrido o desencadeamento de uma resposta imune contra antígenos próprios intestinais, devido a um mimetismo antigênico com as proteínas de amendoim, de forma similar à ocorrência da imunopatologia na doença celíaca (HILL; McMILLAN, 2006). Porém, essas hipóteses ainda devem ser confirmadas em estudos posteriores.

Tendo por base os resultados obtidos nesse trabalho, sugerimos que quando as proteínas de amendoim penetram nas barreiras mucosas, podem ser capturadas por macrófagos ou células dendríticas (RESCIGNO, 2001) e apresentadas às células T “naive” no tecido linfóide associado à mucosa ou nos linfonodos mesentéricos, onde seriam diferenciadas células com perfil de resposta Th2. Moléculas como Gata-3 induziriam a transcrição de genes das citocinas IL-4 e IL-13, com conseqüente inibição da produção de transcritos para IFN- γ , direcionando a mudança de classe de imunoglobulinas para IgG1 e IgE, por linfócitos B (VERCELLI et al., 1990; VAN DER POUW KRAAN et al., 1998). As imunoglobulinas ligadas na superfície de mastócitos ou eosinófilos (TKACZYK et al., 2004), possivelmente se ligariam de maneira cruzada aos alérgenos de amendoim, resultando na desgranulação de mediadores alérgicos pré-formados e subseqüente ativação celular (SAMPSON, 1997). As células ativadas poderiam então produzir uma variedade de citocinas e quimiocinas que, em seguida, recrutariam outras células inflamatórias que

contribuiriam para a resposta alérgica de fase tardia mediada por IgE e os danos teciduais observados (Figura 27).

Finalmente, a prevenção das respostas imunes desencadeadas por antígenos alimentares é complexa e envolve primariamente a presença de uma barreira de mucosa intacta. Segundo, o sistema imune inato deve ser capaz de neutralizar alguns patógenos ou antígenos alimentares e, finalmente, a resposta imune adaptativa deve ser mantida levando a um estado de tolerância oral. Na ausência de um ou mais desses fatores, pode haver o desenvolvimento de desordens inflamatórias intestinais como doença de Crohn, colite ulcerativa ou doença celíaca. Experimentos animais já demonstraram vários aspectos do desenvolvimento e da modulação da inflamação intestinal em camundongos. No entanto, nenhum deles descreveu até agora um modelo no qual a indução da doença reproduz a inflamação intestinal humana que ocorre após a quebra da tolerância de mucosa e indução de imunidade ativa contra antígenos alimentares no intestino. Os limites entre doenças inflamatórias, autoimunes e alérgicas são difíceis de serem delineados, e este trabalho contribui para o entendimento da patogênese de desordens gastrintestinais como a inflamação intestinal induzida por antígenos alimentares com envolvimento de mecanismos alérgicos.

Concluindo, baseando nos conhecimentos adquiridos com este trabalho, nossos resultados suportam o desenvolvimento de futuras terapias para processos inflamatórios intestinais e doenças alérgicas alimentares, tendo por base, por exemplo, a modificação de respostas imunes tipo Th2 na alergia alimentar intestinal e indução de um ambiente regulatório na mucosa, com restabelecimento da tolerância oral perdida frente a antígenos alimentares.

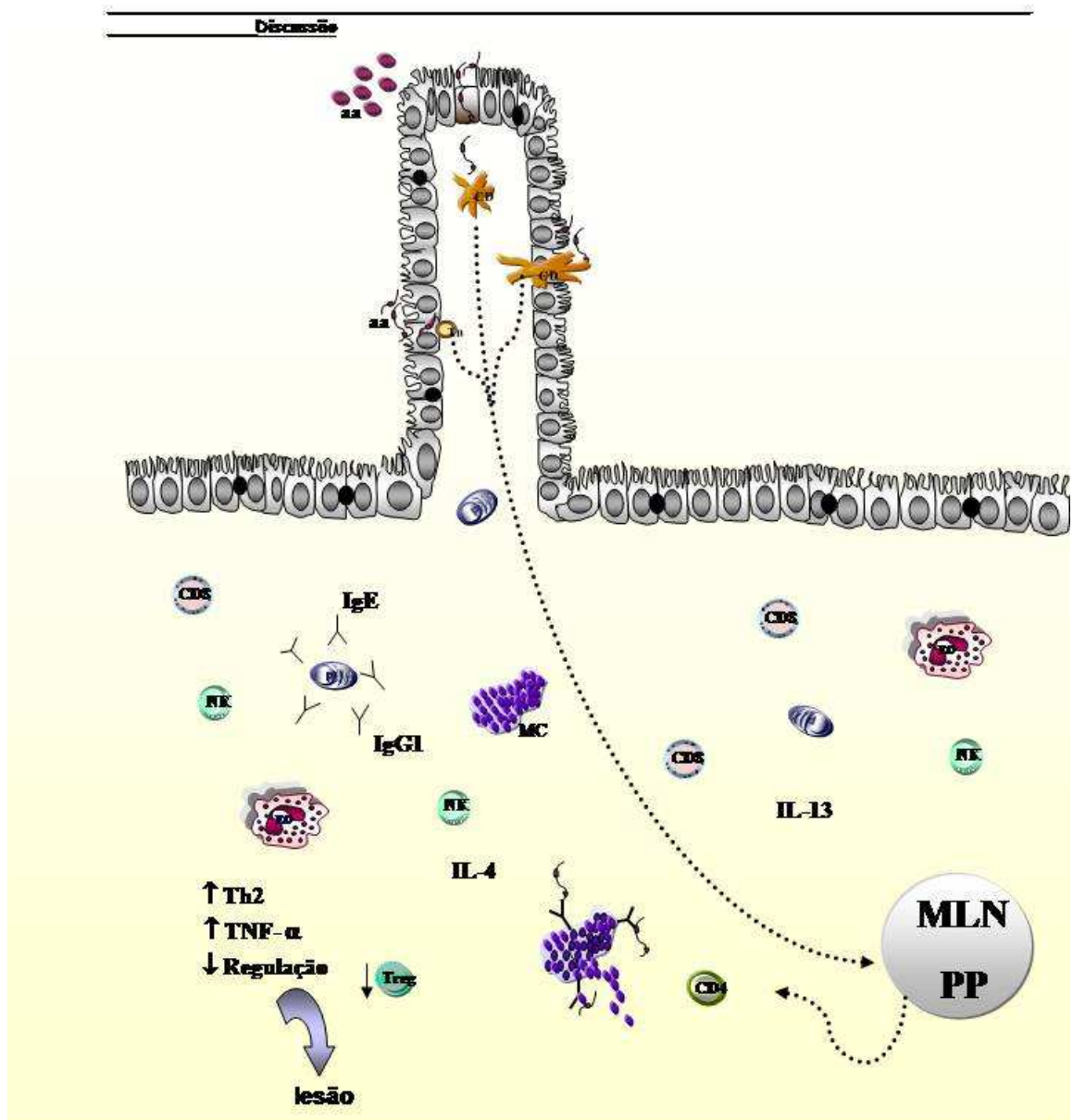
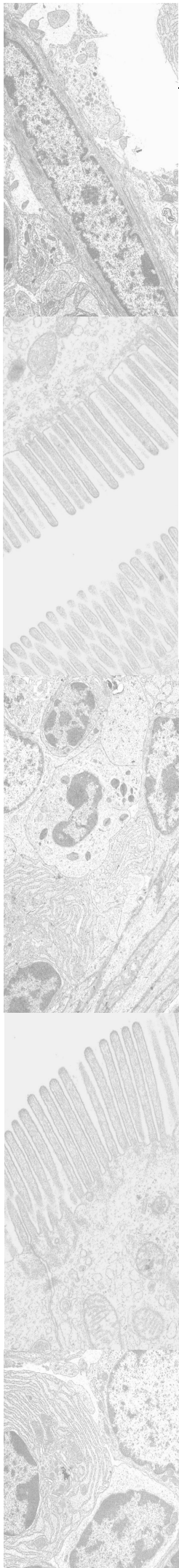


Figura 27. Modulação da resposta imune por antígenos alimentares no novo modelo de inflamação intestinal proposto. Baseado nos resultados obtidos nesse trabalho, este modelo esquematiza os mecanismos pelos quais os antígenos alergênicos induzem a quebra da tolerância, o processo inflamatório e o desenvolvimento das lesões na mucosa intestinal. CD, célula dendrítica; Tn, linfócito T "naive"; aa, antígenos alimentares; CD8, células T CD8⁺; CD4, células T CD4⁺; NK, células *natural killer*; EO, eosinófilos; MC, mastócitos; FL, plasmócitos; Treg, célula T reguladora; MLN, linfonodo mesentérico; PP, placas de Peyer.



Conclusões

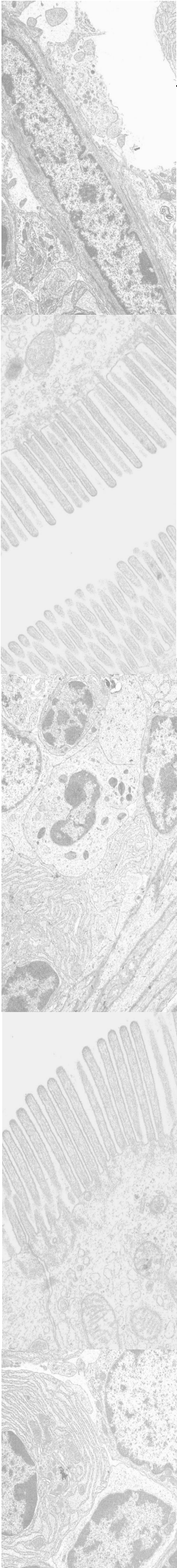
6. Conclusões

6.1. Foi estabelecido, neste trabalho, um novo modelo animal para estudo e melhor entendimento da imunopatologia e desenvolvimento das inflamações intestinais.

6.2. A inflamação desenvolvida neste modelo é caracterizada por lesões no intestino em resposta à quebra dos mecanismos de tolerância de mucosa a antígenos alimentares.

6.3. A produção de anticorpos “patogênicos” alérgeno-específicos, como na alergia alimentar, é fundamental para o desenvolvimento do processo inflamatório evidenciado.

6.4. Neste modelo, além de anticorpos, é necessário o envolvimento de um padrão de resposta imune Th2, com a participação de citocinas como IL-4, infiltrado celular característico de respostas inflamatórias alérgicas e ausência/diminuição de mecanismos reguladores na mucosa intestinal.



Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

AJUEBOR, M.N.; SWAIN, M.G. Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract. **Immunol.**, 105: 137-143, 2002.

AKTAS, E.; AKDIS, M.; BILGIC, S.; DISCH, R.; FALK, C.S.; BLASER, K.; AKDIS, C.; DENIZ, G. Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK 1 and NK 2 cells. **Clin Exp Immunol.**, 140: 301–309, 2005.

ALBANESI, C.; SCARPONI, C.; SEBASTIANI, S.; CAVANI, A.; FEDERICI, M.; DE PITA, O.; PUDDU, P.; GIROLOMONI, G. IL-4 enhances keratinocyte expression of CXCR3 agonistic chemokines. **J Immunol.**, 165: 1395–1402, 2000.

ALLEZ, M.; BRIMNES, J.; DOTAN, I.; MAYER, L. Expansion of CD8⁺ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. **Gastroenterol.**, 123: 1516-26, 2002.

AL-MUHSEN, S.; CLARKE, E.A.; KAGAN S.R. Peanut allergy: an overview. **Can Med Assoc J.**, 168: 1279-85, 2003.

ANJUERE, F.; LUCI, C.; LEBENS, M.; ROUSSEAU, D.; HERVOUET, C.; MILON, G.; HOLMGREN, J.; ARDAVIN, C.; CZERKINSKY, C. In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. **J Immunol.**, 173: 5103–5111, 2004.

ARNABOLDI, P.M.; BEHR, M.J.; METZGER, D.W. Mucosal B cell deficiency in IgA^{-/-} mice abrogates the development of allergic lung inflammation. **J Immunol.**, 175: 1276–1285, 2005.

ARORA, S.; HERNANDEZ, Y.; ERB-DOWNWARD, J.R.; MCDONALD, R.A.; TOEWS, G.B.; HUFFNAGLE, G.B. Role of IFN- γ in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. **J Immunol.**, 174: 6346–6356, 2005.

AUGUSTIN, M.T.; KOKKONEN, J.; KARTTUNEN, T.J. Duodenal cytotoxic lymphocytes in cow's milk protein sensitive enteropathy and coeliac disease. **Scand J Gastroenterol.**, 40: 1398-1406, 2005.

BAE, S.J.; TANAKA, Y.; HAKUGAWA, J.; KATAYAMA, I. Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. **J Dermatol Sci.**, 21: 1-7, 1999.

BASHIR, M.E.; LOUIE, S.; SHI, H.N.; NAGLER-ANDERSON, C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. **J Immunol.**, 172: 6978–6987, 2004.

BELKAID, Y.; JOUIN, H.; MILON, G. A method to re-cover, enumerate, and identify lymphomyeloid cells present in an inflammatory dermal site. A study in laboratory mice. **J Immunol Meth.**, 199: 5–25, 1996.

BETTS, C.J.; FLANAGAN, B.F.; CADDICK, H.T.; DEARMAN, R.J.; KIMBER, I. Intradermal exposure of BALB/c strain mice to peanut protein elicits a type 2 cytokine response. **Food Chem Toxicol.**, 42: 1589–1599, 2004.

BISCHOFF, S.; CROWE, E.S. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. **Gastroenterol.**, 128: 1089-1113, 2005.

BLUMBERG, R.S.; SAUBERMANN, L. J.; STROBER, W. Animals models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. **Curr Opin Immunol.**, 11: 648-656, 1999.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol.**, 3: 521-533, 2003.

BURKS, W.; SAMPSON, H.A.; BANNON, G.A. Peanut allergens. **Allergy.**, 53: 725–30, 1998.

BURKS, A.W.; WILLIAMS, L.W.; CONNAUGHTON, C.; COCKRELL, G.; O'BRIEN, T.J.; HELM, R.M. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. **J Allergy Clin Immunol.**, 90: 962–9, 1992.

BURKS, A.W.; WILLIAMS, L.W.; HELM, R.M.; CONNAUGHTON, C.; COCKRELL, G.; O'BRIEN, T. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. **J Allergy Clin Immunol.**, 88: 172–9, 1991.

BURKS, A.W.; WILLIAMS, L.W.; MALLORY, S.B.; SHIRELL, M.A.; WILLIAMS, C. Peanut protein as a major source of adverse food reactions in patients with atopic dermatitis. **Allergy Proc.**, 10: 265-9, 1989.

CHAMBER, J.S.; BERTELLI, E.; WINTERBONE, M.S.; MAN, A.L.; NICOLETTI, C. Adoptive transfer of dendritic cells from allergic mice induces specific immunoglobulin E antibody in naive recipients in absence of antigen challenge without altering the T helper 1/T helper 2 balance **Immunol.**, 112: 72–79, 2004.

CHEROUTRE, H. IELs: enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium **Immunol Rev.**, 206: 114–131, 2005.

CHIRDO, F,G; MILLINGTON, O.R.; BEACOCK-SHARP, H.; MOWAT, A.M. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. **Eur J Immunol.**, 35:1831-40, 2005

COEFFIER, M.; LORENTZ, A.; MANNNS, M.P.; BISCHOFF, S.C. Epsilon germ-line and IL-4 transcripts are expressed in human intestinal mucosa and enhanced in patients with food allergy. **Allergy.**, 60: 822–827, 2005.

DAJOTOY, T.; ANDERSSON, P.; BJARTELL, A.; LOFDAHL, C.G.; TAPPER, H.; EGESTEN, A. Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN- γ . inflammation. **J Leukoc Biol.**, 76: 685–691, 2004.

D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **J Immunol Meth.**, 273: 3-13, 2003.

DAVIDSON, N.J.; FORT, M.M.; MULLER, W.; LEACH, M.W.; RENNICK, D. M. Chronic colitis in IL-10^{-/-} mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. **Int Rev Immunol.**, 19: 91-121, 2000.

DE JONG E.C.; ZIJVERDEN M.V.; SPANHAAK, S.; KOPPELMAN, S.J.; PELLEGRAM, H.; PENNINKS, A.H. Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. **Clin Exp Allergy.**, 2: 743-751, 1998.

DOHI, T.; FUJIHASHI, K.; RENNERT, P.D.; IWATANI, K.; KIYONO, H.; MCGHEE, J.R. Hapten induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. **J Exp Med.**, 189: 1169-1180, 1999.

DRAKES, M.L.; BLANCHARD, T.G.; CZINN, S.J. Colon lamina propria dendritic cells induce a proinflammatory cytokine response in lamina propria T cells in the SCID mouse model of colitis. **J Leuk Biol.**, 78: 1291–1300, 2005.

DUNSTAN, J.A.; HALE, J.; BRECKLER, H.; LEHMANN, S.; WESTON, P.R.; PRESCOTT, S. L. Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon- γ responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. **Clin Exp Allergy.**, 35: 1309–1317, 2005.

ECKMANN, L.; JUNG, H.C.; SCHAURER-MALY, C.; PANJA, A.; MORZYCKA WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M.F. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin-8. **Gastroenterol.**, 195: 1689, 1993a.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F.; FIERER, J. Epithelial secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. **Infect Immun.**, 61: 4369, 1993b.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F.; FIERER, J. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. **Trends Microbiol.**, 3:118, 1995.

ELSON, C.O.; CONG, Y.; MCCRACKEN, V.J.; DIMMITT, R.A.; LORENZ, R.G.; WEAVER, C.T. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. **Immun Rev.**, 206: 260–276, 2005.

FANTINI, M.C.; BECKER, C.; MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; GALLE, P.R.; NEURATH, M.F. TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4+CD25+ T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. **J Immunol.**, 172: 5149–5153, 2004.

FISCHER, R.; MCGHEE, J.R.; VU, H.L.; ATKINSON, T.P.; JACKSON, R.J.; TOME, D.; BOYAKA, P.N. Oral and Nasal Sensitization Promote Distinct Immune Responses and Lung Reactivity in a Mouse Model of Peanut Allergy. **Am J Pathol.**, 167: 1621-1630, 2005.

FORT, M.M.; LESLEY, R.; DAVIDSON, N.J.; MENON, S.; BROMBACHER, F.; LEACH, M.W.; RENNICK, D.M. IL-4 Exacerbates Disease in a Th1 Cell Transfer Model of Colitis. **J Immunol.**, 166: 2793–2800, 2001.

FRIES, J.H. Peanuts: allergic and other untoward reactions. **Ann Allergy.**, 48: 220–6, 1982.

FROSSARD, C. P.; CONRAD, M.D.B.H.; PHILIPPE E.A. Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy. **J Allergy Clin Immunol.**, 114: 377-82, 2004.

FULKERSON, P.C.; ZHU, H.; WILLIAMS, D.A.; ZIMMERMANN, N.; ROTHENBERG, M.E. CXCL9 inhibits eosinophil responses by a CCR3- and Rac2-dependent Mechanism. **Blood.**, 106: 436-443, 2005.

GARCIA-ZEPEDA, E.A.; ROTHENBERG, M.E.; OWNBEY, R.T.; CELESTIN, J.; LEDER, P.; LUSTER, A.D. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. **Nat Med.**, 2: 449-56, 1996.

GEBOES, K. From inflammation to lesion. **Acta Gastroenterol Belg.**, 57: 273-84, 1994.

GERBER, B.O.; ZANNI, M.P.; UGUCCIONI, M.; LOETSCHER, M.; MACKAY, C.R.; PICHLER, W.J.; YAWALKAR, N.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils. **Curr Biol.**, 7:836-843, 1997.

HAMILOS, D.L.; THAWLEY, S.E.; KRAMPER, M.A.; KAMIL, A.; HAMID, Q.A. Effect of intranasal fluticasone on cellular infiltration, endothelial adhesion molecule expression and proinflammatory cytokine mRNA in nasal polyp disease. **Allergy Clin Immunol.**, 103: 79-87, 1999.

HANAUER, S.B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflamm Bowel Dis.**, 12: S3-9, 2006.

HANAUER, S.B.; KIRSNER, J.B. **Inflammatory bowel disease: a guide for patients and their families.** New York: Raven Press, p. 194, 1985

HILL, P.G.; McMILLAN, S.A. Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. **Ann Clin Biochem.** 43: 105-17, 2006.

HOGAN, S.; MISHRA, E.; BRANDT, E.; FOSTER, P.; ROTHENBERG, M. A critical role for eotaxin in experimental oral antigen-induced eosinophilic gastrointestinal allergy. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 97: 6681–6686, 2000.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Sci.**, 299: 1057–1061, 2003.

HSIEH, K.Y.; TSAIW, C.C.; WUZ, C.H.H.; LIN, R.H. Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. **Clin Exp Allergy.**, 33: 1067–1075, 2003.

INATOMI, O.; ANDOH, A.; KITAMURA, K.; YASUI, H.; ZHANG, Z.; FUJIYAMA, Y. Butyrate blocks interferon-gamma-inducible protein-10 release in human intestinal subepithelial myofibroblasts. **J Gastroenterol.**, 40: 483-9, 2005.

ISAACS, K.L.; LEWIS, J.D.; SANDBORN, W.J.; SANDS, B.E.; TARGAN, S.R. State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD. **Inflamm Bowel Dis.**, 11: S3-12, 2005.

KAMBE, N.; HIRAMATSU, H.; SHIMONAKA, M.; FUJINO, H.; NISHIKOMORI, R.; HEIKE, T.; ITO, M.; KOBAYASHI, K.; UEYAMA, Y.; MATSUYOSHI, N.; MIYACI, Y.; NAKAHATA, T. Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cell with identical distribution pattern to human body. **Blood**, 103: 860-867, 2004.

KANG, J.H.; LEE, D.H.; LEE, J.S.; KIM, H.J.; SHIN, J.W.; LEE, Y.H.; LEE, Y.E.; PARK, C.S.; CHUNG, Y. Eosinophilic differentiation is promoted by blockage of Notch signaling with a gamma secretase inhibitor. **Eur J Immunol.**, 35: 2982–2990, 2005.

KATSUMOTO, T.; KIMURA, M.; YAMASHITA, M.; HOSOKAWA, H.; HASHIMOTO, K.; HASEGAWA, A.; OMORI, M.; MIYAMOTO, T.; TANIGUCHI, M.; NAKAYAMA, T. Stat-6 dependent differentiation and production of IL-5 and IL-13 in murine NK2 cells. **J Immunol.**, 173: 4967-4975, 2004.

KEEFFE, E.B.; GIRARD, D.E. Peanut shell colitis. **Arch Intern Med.**, 145: 1314-5, 1985.

KELLY-WELCH, A.; HANSON, E.M.; KEEGAN, A.D. Interleukin-13 (IL-13) pathway. **Sci Stke.**, 1-2, 2005.

KESHAVARZIAN, A.; FUSUNYAN, R.D.; JACYNO, M.; WINSHIP, D.; MACDERMOTT, R.P.; SANDERSON, I.R. Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. **Am J Gastroenterol.**, 94: 704-12, 1999.

KITA H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? **J Allergy Clin Immunol.**, 97: 889-92, 1996.

KLEBER-JANKE, T.; CRAMERI, R.; APPENZELLER, U.; SCHLAAK, M.; BECKER, W.M. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. **Int Arch Allergy Immunol.**, 119: 265-74, 1999.

KOMAI, M.; TANAKA, H.; MASUDA, T.; NAGAO, K.; ISHIZAKI, M.; SAWADA, M.; NAGAI, H. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. **Br J Pharmacol.**, 138: 912-920, 2003.

KONTOYIANNIS D., PASPARAKIS, M.; PIZARRO, T.T.; COMINELLI, F.; KOLLIAS, G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. **Immunity.** 10: 387-398, 1999.

KOPPELMAN, S. J.; VLOOSWIJK, R.A.A.; KNIPPELS, L.M.J.; HESSING, M.; KNOL, E.F.; VAN REIJSSEN, F.C.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A.F.M. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. **Allergy.**, 56: 132-137, 2001.

KOPPELMAN, S.J.; WENSINGW, M.; ERTMANNW, M.; KNULSTW, A.C.; KNOL, E.F. Relevance of Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h 2 is the most important peanut allergen. **Clin Exp Allergy.**, 34: 583-590, 2004.

KORZENIK, J.R. Past and current theories of etiology of IBD: toothpaste, worms, and refrigerators. **J Clin Gastroenterol.**, 39: S59-65, 2005.

KRAJINA, T.; LEITHAUSER, F.; MOLLER, P.; TROBONJACA, Z.; REIMANN, J. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. **Eur J Immunol.**, 33: 1073-83, 2003.

KRIEGLSTEIN, C.F.; CERWINKA, W.H.; LAROUX, F.S.; SALTER, J.W.; RUSSEL, J.M.; SCHUERMANN, G.; GRISHAM, M.B.; ROSS, C.R.; GRANGER, D.N. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. **J Exp Med.**, 194: 1207-1218, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nat.**, 227: 680-5, 1970.

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; KANSSON, L.D.H.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy.**, 59: 793-805, 2004.

LARBI, K.Y.; DANGERFIELD, J.P.; CULLEY, F.J.; MARSHALL, D.; HASKARD, D.O.; JOSE, P.J.; WILLIAMS, T.J.; NOURSHARGH, S. P-selectin mediates IL-13-induced eosinophil transmigration but not eotaxin generation in vivo: a comparative study with IL-4-elicited responses. **J. Leukoc. Biol.** 73: 65–73; 2003.

LEE, S.Y.; HUANG, C.K.; ZHANG, T.F.; SCHOFIELD, B.H.; BURKS, A.W.; BANNON, G.A.; SAMPSON, H.A.; LI, X.M. Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. **Clin Immunol.**, 101: 220–228, 2001.

LIU, S.; HIEDAYATI, N.; SHUDOU, M.; MAEYAMA, K. Activation of connective tissue-type and mucosal-type mast cells in compound 48/80-induced airway response. **Eur J Pharmacol.**, 530: 128-135, 2005.

LIU, Z.; LEFRANÇOIS, L. Intestinal Epithelial Antigen Induces Mucosal CD8 T Cell Tolerance, Activation, and Inflammatory Response. **J Immunol.**, 173: 4324–4330, 2004.

LI-WEBER, M.; KRAMMER, P. H. Regulation of IL-4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. **Nat. Rev. Immunol.**, 3: 534-543, 2003.

LOHMANN, T.; LAUE, S.; NIETZSCHMANN, U.; KAPELLEN, T.M.; LEHMANN, I.; SCHROEDER, S.; PASCHKE, R.; KIESS, W. Reduced Expression of Th1-Associated Chemokine Receptors on Peripheral Blood Lymphocytes at Diagnosis of Type 1 Diabetes. **Diabetes.**, 51: 2474-2480, 2002.

MacDERMOTT, R.P.; SANDERSON, I.R.; REINECKER, H.C. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.**, 4: 54-67, 1998.

MAKIYAMA, K.; ZEA-IRIARTE, W.; TSUJI, X. Activation of eosinophils in the pathophysiology of ulcerative colitis. **J Gastroenterol.**,30: 64–69, 1995.

MAN, A.L.; BERTELLI, E.; REGOLI, M.; CHAMBERS, S.J.; NICOLETTI, C. Antigen-specific T cell-mediated apoptosis of dendritic cells is impaired in a mouse model of food allergy. **J Allergy Clin Immunol.**, 113: 965-72, 2004.

MARTIN, B.; BANZ, A.; BIENVENU, B.; CORDIER, C.; DAUTIGNY, N.; BECOURT, C.; LUCAS B. Suppression of CD4 T lymphocyte effector functions by CD4⁺CD25⁺ cells in vivo. **J Immunol.**, 172: 3391–3398, 2004.

MAUL, J.; LODDENKEMPER, C.; MUNDT, P.; BERG, E.; GIESE, T.; STALLMACH, A.; ZEITZ, M.; DUCHMANN, R. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25 (high) T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol.**, 128: 1868-78, 2005.

MAYER, L. Mucosal Immunity. **Pediatr.**, 111: 1595–1600, 2003.

MAZZUCHELLI, L.; HAUSER, C.; ZGRAGGEN, K.; WAGNER, H.; HESS, M.; LAISSUE, J.A.; MUELLER, C. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. **Am J Pathol.**, 144: 997-1007, 1994.

McCORMICK, B.A.; COLGAN, S.P.; DELP-ARCHER, C.; MILLER, S.I.; MADARA, J.L. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. **J Cell Biol.**, 123: 895-907, 1993.

McCORMICK, B.A.; MILLER, S.I.; CARNES, D.; MADARA, J.L. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. **Infect Immun.**, 63: 2302-9, 1995.

McDERMOTT, J.R.; HUMPHREYS, N.E.; FORMAN, S.P.; DONALDSON, D.D.; GRENCIS, R.K. Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection. **J Immunol.**, 175: 3207–3213, 2005.

METCALFE, D.D. Food allergy. **Curr Opin Immunol.**, 3: 881-6, 1991.

MILLER, A.; LIDER, O.; AL-SABBAGH, A.; WEINER, H.L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein: V. Hierarchy of suppression by myelin basic protein from different species. **J Neuroimmunol.**, 39: 243–50, 1992.

MIR, A.; MINGUEZ, M.; TATAY, J.; PASCUAL, I.; PENA, A.; SANCHIZ, V.; ALMELA, P.; MORA, F.; BENAGES, A. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol.**, 97: 1452-1457, 2002.

MIYAMOTO, K.; KINGSLEY, C.Y.; ZHANG, X.; JABS, C.; IZIKSON, L.; SOBEL, R.A.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.Y.K.; SHARPE, A.H. The ICOS Molecule Plays a Crucial Role in the Development of Mucosal Tolerance. **J Immunol.**, 175: 7341–7347, 2005.

MOTTET, C.; UHLIG, H.H.; POWRIE, F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells. **J Immunol.**, 170: 3939-43, 2003.

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

MUELLER, T.; TERADA, T.; ROSENBERG, I.A.; SHIBOLET, O.; PODOLSKY, D.K. Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells. **J Immunol.**, 176: 5805-5814, 2006.

MURAKAMI, H.; AKBAR, S.M.F.; MATSUI, H.; HORIIKE, N.; ONJI, M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. **Clin Exp Immunol.**, 128: 504-510, 2002.

MURPHY, W.J.; WELNIAK, L.A.; TAUB, D.D.; WILTROUT, O.H.; TAYLOR, P.A.; VALLERA, A.A.; KOPF, M.; YOUNG, H.; LONGO, D.L.; BLAZAR, B.R. Differential effects of the absence of interferon-g and IL-4 in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice. **J Clin Invest.**, 102: 1742-1748, 1998.

NICKEL, R.; BECK, L.A.; STELLATO, C.; SCHLEIMER, R.P. Chemokines and allergic diseases. **J. Allergy Clin Immunol.**, 104: 723-42, 1999.

OLSEN, C.O.; McCABE, R.P.Jr. The immunology of inflammatory bowel disease. In: KIRSHNER, J.B.; SHORTER, R.G. Eds. **Inflammatory bowel disease**. Baltimore: Williams & Wilkins. 203-51, 1995.

OLSON, T.S.; BAMIAS, G.; NAGANUMA, M.; RIVERA-NIEVES, J.; BURCIN, T.L.; ROSS, W.; MORRIS, M.A.; PIZARRO, T.T.; ERNST, P.B.; COMINELLI, F.; LEY, K. Expanded B cell population blocks regulatory T cells and exacerbates ileitis in a murine model of Crohn's disease. **J Clin Invest.**, 114: 389-398, 2004.

OSHITANI, N.; HATO, F.; KITAGAWA, S.; MASUYAMA, J.; HIGUCHI, K.; MATSUMOTO, T.; ARAKAWA, T. Expression of 4C8 antigen, a novel transendothelial migration-associated molecule on activated T lymphocytes, in inflammatory bowel disease. **J Pathol.**, 197: 589-94, 2002.

PAPADAKIS, K.A.; TARGAN, S.R. Role of cytokines in the patogenesis of inflammatory bowel disease. **Ann Rev Med.**, 51: 289-298, 2000.

PENG, S.L.; SZABO, S.J.; GLIMCHER, L.H.; T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. **PNAS.**, 19: 5545-5550, 2002.

PERITT, D.; ROBERTSON, S.; GRI, G.; SHOWE, L.; ASTE-AMEZAGA, M.; TRINCHIERI, G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. **J Immunol.**, 161: 5821-4, 1998.

PIZZI, L.T.; WESTON, C.M.; GOLDFARB, N.I.; MORETTI, D.; COBB, N.; HOWELL, J.B.; INFANTOLINO, A.; DIMARINO, A.J.; COHEN, S. Impact of chronic conditions on quality of life in patients with inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis.**, 12: 47-52, 2006.

PODOLSKY, D.K. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. **Am J Physiol.**, 277: G495-499, 1999.

PONS, L.; PALMER, K.; BURKS, W. Towards immunotherapy for peanut allergy. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.**, 5: 558-562, 2005.

REIF, S.; KLEIN, I.; LUBIN, F.; FARBSTEIN, M.; HALLAK, A.; GILAT, T. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. **Gut.**, 40: 754-60, 1997.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAEHENBUHL, J.P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol.**, 2: 361-367, 2001.

RIJNIERSE, A.; KOSTER, A.S.; NIJKAMP, F.P.; KRANEVELD, A.D. Critical Role for Mast Cells in the Pathogenesis of 2,4-Dinitrobenzene-Induced Murine Colonic Hypersensitivity Reaction. **J Immunol.**, 176: 4375-4384, 2006.

SADLACK, B.; MERZ, H. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. **Cell.**, 75: 253-261, 1993.

SALDANHA, J.C.S.; GARGIULO, D.L.; CARMO-PINTO, F.H.; ANDRADE, M.C.;ALVAREZ-LEITE, J.I.; TEIXEIRA, M.M.;CARA, D.C. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. **Braz J Med Biol Res.**, 37: 809-816,2004.

SALINAS, C.S.; ALONSO, J.B.; SÁNCHEZ, L.O.; GÁLVEZ, A.B.; MAPELLI, L.R. Colitis alérgica en lactantes exclusivamente amamantados al pecho. **An Pediatr.**, 64: 158-61, 2006.

SAMPSON, H.A. Clinical practice. Peanut allergy. **N Engl J Med.**, 346: 1294–1299, 2002

SAMPSON, H.A. Food allergy. **JAMA.**, 278: 1888-94, 1997.

SAMPSON, H.A. Role of immediate food hypersensitivity in the pathogenesis of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol.**, 71: 473-80, 1983.

SAMPSON, H.A. Update on food allergy. **J Allergy Clin Immunol.**, 113: 805-19, 2004.

SASAKI, M.; MATHIS, J.M.; JENNINGS, M.; JORDAN, P.; WANG, Y.; ANDO, T.; JOH, T.; ALEXANDER, J.S. Reversal of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector. **J Inflamm.**, 2: 1476-92, 2005.

SATOSKAR, RA.; STAMM, L.M.; ZHANG, X. NK cell deficient mice develop a Th1 like response but fail to mount an efficient antigen specific IgG2a antibody response. **J Immunol.**, 163: 5298–302, 1999.

SCHALLER, M.A.; LUNDY, S.K.; HUFFNAGLE, G.B.; LUKACS, N.W. CD8⁺ T cell contributions to allergen induced pulmonary inflammation and airway hyperreactivity. **Eur. J. Immunol.**, 35: 2061–2070, 2005.

SCHINKE, S.; FELLERMANN, K.; HERLYN, K.; REICHEL, P.H.; FUNDKE, R.; STANGE, E.F.; GROSS, W.L.; SCHULTZ, H. Autoantibodies against the bactericidal/permeability-increasing protein from inflammatory bowel disease patients can impair the antibiotic activity of bactericidal/permeability-increasing protein. **Inflamm Bowel Dis.**, 10: 763-70, 2004.

SCHREIBER, S. Inflammatory bowel disease: immunological concepts. **Hepato-Gastroenterol.**, 47: 15-28, 2000.

SCOTT-TAYLOR, T. H.; HOURIHANE J. B.W.; HARPERZ, J.; STROBEL, S. Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. **Clin Exp Allergy.**, 35: 1473–1480, 2005.

SEIBOLD, F. Food-Induced Immune Responses as Origin of Bowel Disease? **Dig.**, 71: 251–260, 2005.

SEIBOLD, F.; SEIBOLD-SCHMID, B.; SHU FY, CONG Y, WEAVER, C.; ELSON, CO. Regional differences in intestinal lymphocytes: Regulation of L-selectin. **Gastroenterol.**, 114: 965–974, 1998.

SHANAHAN, F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. **Gastroenterol.**, 120: 622–635, 2001.

SHEVACH, E.M. Organ specific autoimmunity. In: PAUL, W.E. **Fundamental Immunology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1089-1125, 1999

SHI, H.N.; GRUSBY, M.J.; NAGLER-ANDERSON, C.. Orally Induced Peripheral Nonresponsiveness Is Maintained in the Absence of Functional Th1 or Th2 Cells. **J Immunol.**, 162: 5143–5148, 1999.

SHIBA, T.; AIBA, Y.; ISHIKAWA, H.; USHIYAMA, A.; TAKAGI, A.; MINE, T.; KOGA, Y. The suppressive effect of Bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in Inflammatory Bowel Disease. **Microbiol Immunol.**, 47: 371-378, 2003.

SICHERER, S.H.; LEUNG, D.Y.M. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects. **J Allergy Clin Immunol.**, 116: 153-63, 2005.

SILBERSTEIN, D.S. Eosinophil function in health and disease. **Crit Rev Oncol Hematol.**, 19: 47–77, 1995.

SIMONS, E.; WEISS, C.C.; FURLONG, T.J.; SICHERER, S.H. Impact of ingredient labeling practices on food allergic consumers. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, 95: 426-8, 2005.

SINGH, B.; READ, S.; ASSEMAN, C.; MALMSTROM, V.; MOTTET, C.; STEPHENS, L.A.; STEPANKOVA, R.; TLASKALOVA, H.; POWRIE, F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. **Immunol Rev.**, 182: 190-200, 2001.

SPECHT, S.; ARRIENS, S.; HOERAUF, A. Induction of chronic colitis in IL-10 deficient mice requires IL-4. **Microb Infect.**, 1-10, 2006.

STOTEN, A.; HUNTLEY, J.; MISTRY, H.; HARPER, S.; BUNDICK, R.; BROWN, A.; PRITCHARD, D.I. Nonatopic allergen-independent mast cell activation in parasitized eosinophilic athymic rats. **Parasite Immunol.**, 27: 431–43, 2005.

STRID, J.; HOURIHANEW, J.; KIMBERZ, I.; CALLARD, R.; STROBEL, S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. **Clin Exp Allergy.**, 35: 757–766, 2005.

STRID, J.; THOMSON, M.; HOURIHANE, J.; KIMBER, I.; STROBEL, S. A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. **Immunol.**, 113: 293-303, 2004.

STROBER, W.; FUSS, I.J.; BLUMBERG, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Ann Rev Immunol.**, 20: 495-549, 2002.

TEIXEIRA, G.A.P.B. Desenvolvimento de um modelo murino de inflamação intestinal crônica antígeno-específica. **Tese de doutorado em Patologia Experimental**, UFF, Niterói, RJ, 2003.

THOMAS, M.S.; KUNKEL, S.L.; LUKACS, N.W. Regulation of cockroach antigen-induced allergic airway hyperreactivity by the CXCR3 ligand CXCL9. **J Immunol.**, 173: 615-23, 2004.

TKACZYK, C.; OKAYAMA, Y.; METCALFE, D.D.; GILFILLAN, A.M. Fc gamma receptors on mast cells: activatory and inhibitory regulation of mediator release. **Int Arch Allergy Immunol.**, 133: 305–315, 2004.

TURCANU, V.; MALEKI, S.J.; LACK, G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts **J Clin Invest.**, 111: 1065–1072, 2003.

UGUCCIONI, M.; GIONCHETTI, P.; ROBBIANI, D.F. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1 and MCP-3 in ulcerative colitis. **Am J Pathol.**, 155: 331-6, 1999.

VAN DEN BOGAERDE, J.; CAHILL, J.; EMMANUEL, A.V.; VAIZEY, C.J.; TALBOT, I.C.; KNIGHT, S.C. Gut mucosal response to food antigens in Crohn's disease. **Aliment Pharmacol Ther.**, 16: 1903– 15, 2002.

VAN DER POUW KRAAN, T.C.; VAN DER ZEE, J.S.; BOEIJE, L.C.; DE GROOT, E.R.; STAPEL, S.O.; AARDEN, L.A. The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients. **Clin Exp Immunol.**, 111: 129–135, 1998.

VAN KAMPEN, C.; GAULDIE, J.; COLLINS, S.M. Proinflammatory properties of IL-4 in the intestinal microenvironment. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, 288: G111–G117, 2005.

VERCELLI, D.; JABARA, H.H.; LAUENER, R.P.; GEHA, R.S. IL-4 inhibits the synthesis of IFN- γ and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. **J Immunol.**, 144: 570–573, 1990.

VIETH, M.; TANNAPFEL, A. New pieces of the pathogenetic mosaic in inflammatory bowel disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, 18: 123-4, 2006.

XIE, H.A.; HE, S.H. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol.**, 11: 2851-2857, 2005.

WEDEMEYER, J.; LORENTZ, A.; GOKE, M.; MEIER, P.N.; FLEMMING, P.; DAHINDEN, C.A.; MANN, M.P.; BISCHOFF, S.C. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein 3 in inflammatory bowel disease mucosa. **Gut.**, 44: 629-35, 1999.

WIJK, F.; HARTGRING, S.; KOPPELMAN, S.J.; PIETERS, R.; KNIPPELS, L.M.J. Mixed antibody and T cell responses to peanut and peanut allergens Ara h1, Ara h2, Ara h3 and Ara h6 in an oral sensitization model. **Clin Exp Allergy.**, 34: 1422-1428, 2004.

WILSON, M.S.; TAYLOR, M.D.; BALIC, A.; FINNEY, C.A.M.; LAMB, J.R.; MAIZELS, R.M. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. **JEM.**, 202: 1199–1212, 2005.

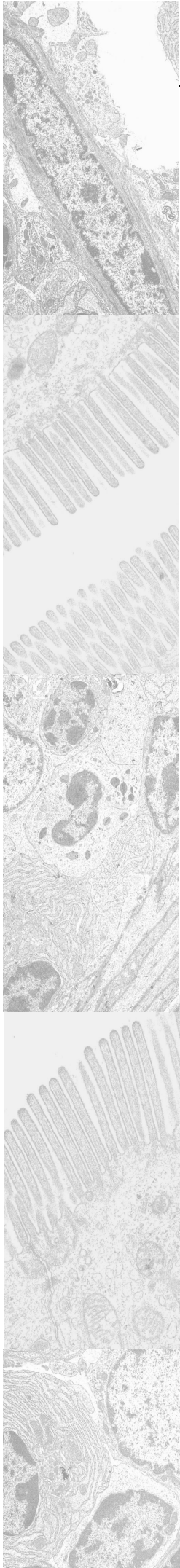
YANG, S.K.; CHOI, M.S.; KIM, O.H.; MYUNG, S.J.; JUNG, H.Y.; HONG, W.S.; KIM, J.H.; MIN, Y.I. The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis: regulation by corticosteroids. **Am J Gastroenterol.**, 97: 126-32, 2002.

YANG, X.; WANG, S.; FAN, Y.; HAN, X. IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction. **Eur J Immunol.**, 30: 382-91, 2000.

YUNGINGER, J.W.; SQUILLACE, D.L.; JONES, R.T.; HELM, R.M. Fatal anaphylactic reactions induced by peanuts. **Allergy Proc.**, 10: 249-53, 1989.

Z'GRAGGEN, K.; WALZ, A.; MAZZUCHELLI, L. The C-X-C chemokine ENA-78 is preferentially expressed in intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol.**, 113: 808-16, 1997.

ZHU, J.; MIN, B.; HI-LI, J.; WATSON, C.J.; GRINBERG, A.; WANG, Q.; KILLEEN, N.; URBAN, JR.J.F.; GUO, L.; PAUL, W.E. Conditional deletion of gata-3 shows its essential function in Th1-Th2 responses. **Nat Immunol.**, 5: 1157-1165, 2004.



Anexos

8. Anexos

8.1. Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal

8.2. Seqüência dos *primers*, concentrações utilizadas e propriedades das reações

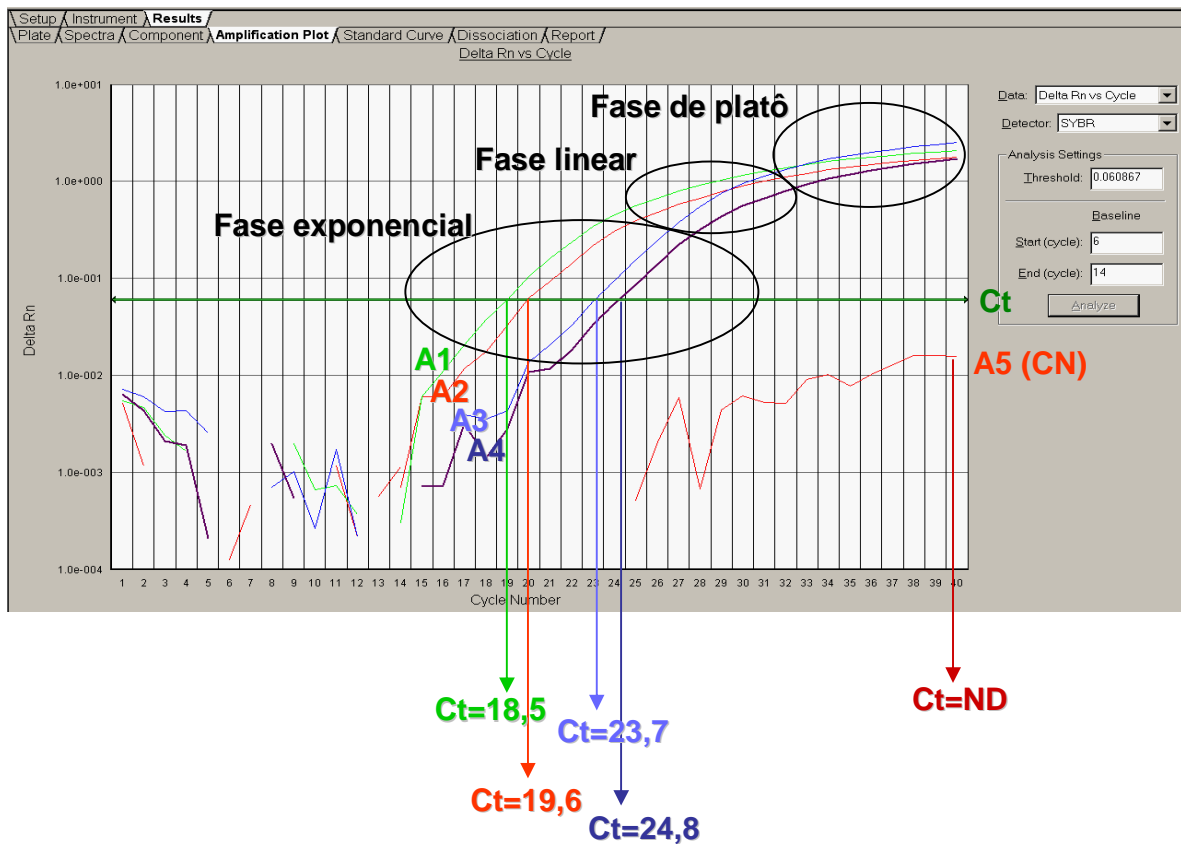
		Seqüência primer <i>sense</i> (S)	[] (µg/µl)	tA(°C)	tD(°C)
		Seqüência primer <i>anti-sense</i> (AS)			
β -actina	S	AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT	0,15	56	75
	AS	AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT			
T-Bet	S	CCC CTG TCC AGT CAG TAA CTT	0,15	56	78
	AS	CTT CTC TGT TTG GCT GGC T			
Gata-3	S	AGG AGT CTC CAA GTG TGC GAA	0,15	56	80
	AS	TTG GAA TGC AGA CAC CAC CT			
IL-4	S	CTG ACG GCA CAG AGC TAT TGA	0,2	56	84
	AS	TAT GCG AAG CAC CTT GGA AGC			
IL-5	S	GAG GTT ACA GAC ATG CAC CAT T	0,2	56	79
	AS	TCA GTT GGT AAC ATG CAC AAA G			
IL-13	S	ACC AAC ATC TCC AAT TGC AA	0,15	56	74
	AS	ATG CAA TAT CCT CTG GGT CC			
TNF-α	S	TGT GCT CAG AGC TTT CAA CAA	0,15	56	80
	AS	CTT GAT GGT GGT GCA TGA GA			
IL-12 p40	S	AGC ACC AGC TTC TTC ATC AGG	0,2	56	83
	AS	GCG CTG GAT TCG AAC AAA G			
IL-23p19	S	AAT GTG CCC CGT ATC CAG TGT	0,2	56	82
	AS	GGC TCC CCT TTG AAG ATG TCA			
IFN-γ	S	GCA TCT TGG CTT TGC AGC T	0,15	56	81
	AS	CCT TTT TCG CCT TGC TGT TG			
IL-10	S	TGG ACA ACA TAC TGC TAA CCG	0,1	56	78
	AS	GGA TCA TTT CCG ATA AGG CT			
TGF-β	S	GCT GAA CCA AGG AGA CGG AAT	0,1	56	80
	AS	GCT GAT CCC GTT GAT TTC CA			
CCL3	S	TTC TGC TGA CAA GCT CAC CCT	0,1	56	83
	AS	ATG GCG CTG AGA AGA CTT GGT			
CXCL1	S	CTT CCC TTG GAC ATT TTG TGT C	0,2	56	79
	AS	TTT GAA CGT CTC TGT CCC GAG			
CXCL9	S	AAT TTC ATC ACG CCC TTG AGC	0,15	56	79
	AS	CAG CTG TTG TGC ATT GGA TAG C			
CCL11	S	ATA TCA GCA CCA GTC GCC CA	0,1	56	78
	AS	TCA TGC CCC CCT TTT AAG ATG			
CXCR3	S	AAC GTC AAG TGC TAG ATG CCT	0,15	56	78
	AS	TCT CGT TTT CCC CAT AAT CG			
Foxp3	S	ACA ACC TGA GCC TGC ACA AGT	0,1	56	83
	AS	GCC CAC CTT TTC TTG GTT TTG			

[] (µg/µl): Concentração do *primer* utilizada na reação em µg/µl

tA(°C): Temperatura de anelamento do *primer*

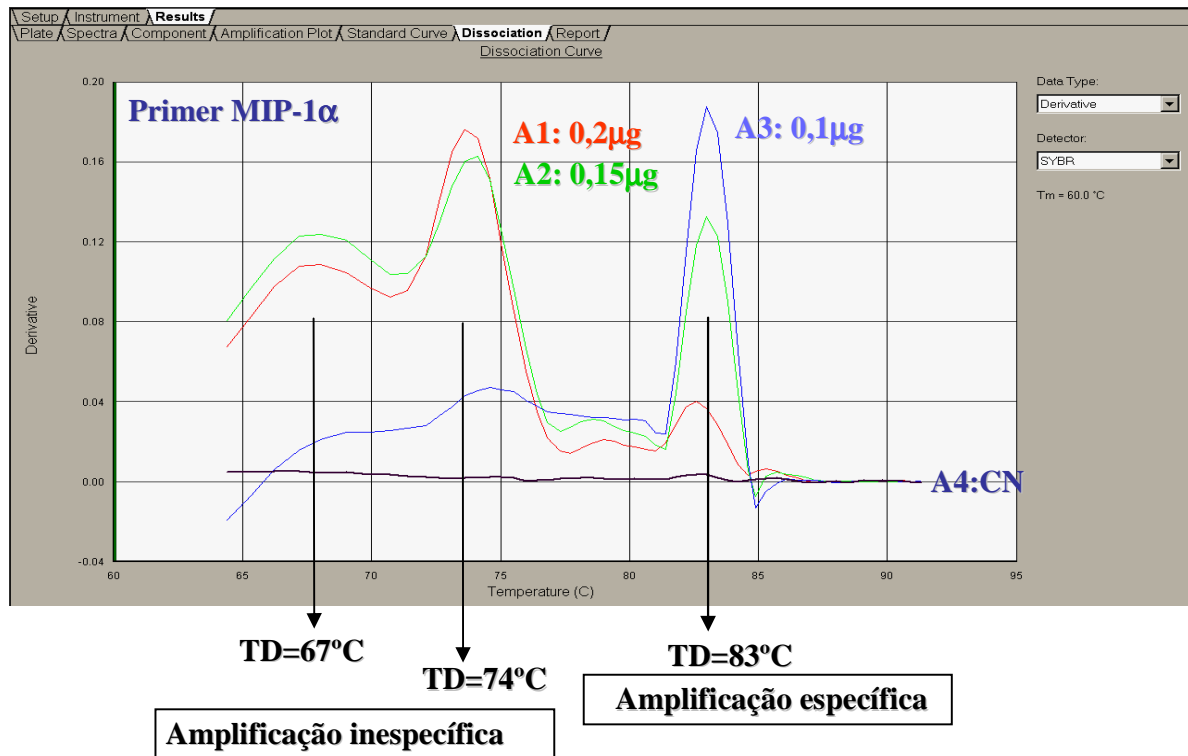
tD(°C): Temperatura de dissociação do *primer*

8.3. Análise quantitativa da expressão de RNAm por Real Time PCR



O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBR Green 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (“cycle threshold” ou linha de corte), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) o que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. A figura demonstra os resultados obtidos para a amplificação de 4 amostras (A1-4) e de um controle negativo – CN (A5); exemplificando as fases de amplificação, a determinação do CT, assim como os valores de CT de cada uma das amostras. ND: não determinado.

8.4. Exemplo de análise da curva de dissociação para determinação da especificidade da reação de amplificação por Real Time PCR



A especificidade da reação de amplificação foi analisada através da curva de dissociação, comparando os picos obtidos da dissociação do produto amplificado à temperatura de dissociação (TD) do fragmento de amplificação esperado (nesse exemplo, TD MIP-1α = 83°C). A figura demonstra os resultados obtidos pela dissociação uma mesma amostra na qual diferentes concentrações de primers (*sense* e *anti-sense*) para MIP-1α foram utilizadas (A1: 0,2 μg; A2: 0,15 μg; A3: 0,1 μg; todas adicionadas a 5 μl de cDNA da amostra teste) e de um controle negativo “CN” (A4: 0,1 μg + água). Podemos observar a gradativa redução dos produtos inespecíficos (identificados como os picos nas temperaturas de 67°C e 74°C) e a detecção do produto específico (identificado pelo pico na temperatura de 83°C) com a diminuição da concentração de *primers* na reação.

8.5. Colorações utilizadas

8.5.1. Coloração azul de Alcian – resorcina para mastócitos de mucosa

Desparafinizar as lâminas, hidratar e lavar em água corrente por 5 minutos. Corar em azul de Alcian pH 1,0 filtrado, por 12 minutos. Lavar 2 vezes em álcool 70%, seguida por 3 lavagens em água destilada. Corar em resorcina por 8 minutos. Montar as lâminas com Bálsamo do Canadá.

Preparo da solução de azul de Alcian

Azul de Alcian 8GX 1g

Ácido clorídrico 0,7N 100mL

Filtrar o corante a vácuo ou com seringa e filtro acoplado, para forçar a passagem do corante.

Preparo da solução de resorcina

Fucsina básica 2,0g

Resorcina 4,0g

Água destilada 200mL

Cloreto férrico 30% 25mL

Álcool 90% 200mL

Ácido clorídrico 4mL

Dissolver a fucsina básica e a resorcina em 200 mL de água destilada em ebulição. Juntar 25 mL de solução de cloreto férrico 30% e deixar ferver por alguns minutos. Filtrar e dissolver o precipitado, sem lavar, em 200 mL de álcool 90% aquecido. Após o resfriamento adicionar 4 mL de ácido clorídrico.

Fixador de Carnoy

Etanol 70mL

Clorofórmio 30mL

Ácido acético glacial 10mL

O tecido deve permanecer nesse fixador por no máximo 4 horas, depois disso deve ser retirado, colocado em álcool 70% e mantido em geladeira até o processamento.

8.5.2. Coloração de azul de toluidina para mastócitos de tecido conjuntivo

Desparafinizar as lâminas, hidratar e lavar em água corrente por 5 minutos. Corar em azul de toluidina 0.5% por 3 minutos. Banho rápido em tampão fosfato citrato pH 3.0, passar em xilol. Montar as lâminas com Bálsamo do Canadá.

Azul de toluidina

Azul de toluidina 0,5g

Borato de sódio 5,0g

Dissolver em 100mL de tampão fosfato citrato, filtrar o corante toda vez que o utilizar.

Tampão fosfato citrato (pH 3,0)

Ácido cítrico 0,1M 600mL

Fosfato dissódico 0,2M 600mL

8.5.3. Coloração hematoxilina-eosina

Desparafinizar as lâminas, hidratar e lavar em água corrente por 5 minutos. Corar em hematoxilina filtrada por 3 minutos, lavar em água corrente por 5 minutos. Diferenciar em álcool ácido (1-3 passadas). Lavar em água corrente por 5 minutos. Passar as lâminas em solução Scott por 3 minutos e lavar novamente em água corrente por 5 minutos. Mergulhar as lâminas em álcool 80%, corar em eosina por 30 segundos. Passar as lâminas nos álcoois 95%, álcool absoluto, álcool/xilol e xilol puro. Montar as lâminas com Bálsamo do Canadá.

Hematoxilina de Harris (solução estoque)

Hematoxilina cristais	5 g
Álcool absoluto	50 mL
Alúmen de potássio ou de amônia	100 g
Água destilada	1000 mL
Óxido vermelho de mercúrio	2,5 g

Dissolver a hematoxilina em álcool absoluto e o alúmen na água destilada quente. Misturar ambas soluções e ferver rapidamente (menos de 1 minuto). Acrescentar óxido vermelho de mercúrio. Aquecer novamente até a solução se tornar “púrpura escura”. Retirar imediatamente do fogo e esfriar rapidamente a solução. Ao esfriar, filtrar a solução.

Hematoxilina para uso

Hematoxilina estoque	250 mL
Ácido acético glacial	15 mL

Solução alcoólica de eosina – floxina (solução corante)

Eosina 1%	62,5 mL
Floxina 1%	6,25 mL
Álcool 95°	487,5 mL
Ácido acético glacial	2,5 mL

Álcool-ácido 1%

Álcool 70%	198 mL
Ácido clorídrico	2 mL

Solução Scott

Sulfato de magnésio	10 g
Bicarbonato de sódio	1,8 g
Água destilada	380 mL

8.5.4. Coloração PAS (ácido periódico de Schiff)

Desparafinizar as lâminas, hidratar e lavar em água corrente por 5 minutos. Incubar os cortes em ácido periódico por 8 minutos. Lavar por 3 minutos em água corrente e secar as lâminas com papel de filtro. Incubar as lâminas com reativo de Schiff por 20 minutos, ao abrigo da luz. Lavar 3 vezes em água sulfurosa, 2 minutos cada banho. Em seguida, lavar por 10 minutos em água corrente. Corar com hematoxilina por 1 minuto, lavar e montar com Bálsamo do Canadá.

Água sulfurosa

Bissulfito de sódio 10%	10 mL
Água destilada	180 mL
Ácido clorídrico	10 mL

8.5.5. Coloração vermelho congo para eosinófilos

Desparafinizar as lâminas, hidratar e lavar em água corrente por 5 minutos. Corar em hematoxilina de Harris por 3 minutos, lavar em água corrente por 2 minutos. Passar as lâminas em álcool-ácido, lavar novamente em água corrente por 5 minutos. Mergulhar as lâminas em solução alcalina por 20 minutos. Corar na solução de vermelho congo por 50 minutos-3 horas. Passar as lâminas em álcool 80%, álcool/xilol e xilol puro. Montar as lâminas com Bálsamo do Canadá.

Solução alcalina (estoque)

Álcool 80% 500mL

Cloreto de sódio 20g

Solução alcalina (uso)

Solução estoque 50mL

NaOH 1% 0.5 mL

Vermelho Congo

Álcool 80% 500mL

NaCl 20g

Vermelho congo 1.25g

8.6. Soluções para microscopia eletrônica de transmissão

Tetróxido de ósmio 1%

Foram misturadas partes iguais de tetróxido de ósmio a 2% (Polysciences Inc.) e tampão cacodilato de sódio 0,2M.

Tampão cacodilato de sódio 0.2M

Foram dissolvidos 4.28 g de cacodilato de sódio em 100 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7.3 –7.4 com HCl 1N.

Resina Araldite 502

Foram misturadas 10 partes de Araldite 502 (Polysciences Inc., Washington, PA, EUA) e 7 partes de DDSA (Polysciences Inc.). A seguir, a mistura foi agitada cuidadosamente para ficar completamente homogênea. Acrescentou-se então, 1.5% de DMP-30 (Polysciences Inc.). A mistura foi congelada e guardada hermeticamente fechada na geladeira.

Acetato de uranila

Foram misturados 60 mL de água destilada com 1.5 a 2.0 g de acetato de uranila (Merck S.A., Rio de Janeiro), obtendo uma solução saturada. Adicionou-se uma gota de ácido acético (Merck S.A.) a essa solução. No momento do uso, foram misturadas partes iguais dessa solução e álcool a 100% (Merck S.A.).

Citrato de chumbo

Em um balão volumétrico de 25 mL, foram misturados 0.66 g de nitrato de chumbo (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 0.88 g de citrato de sódio (Merck S.A.) e 15 mL de água bidestilada gelada. Agitou-se vigorosamente por 1 minuto e deixado em repouso por 30 minutos, agitando a cada 5 minutos. Em seguida, foram misturados 4 mL de solução de NaOH 1N gelada e adicionado água destilada gelada até 25 mL.

Acetato de uranila e citrato de chumbo (coloração de Reynold's)

As grades foram contrastadas no acetato de uranila por 20 minutos. Em seguida, lavadas em metanol a 50% e dados 3 banhos com água destilada. Prosseguiu-se com a contrastação utilizando o citrato de chumbo por mais 30 minutos, 3 banhos de água destilada. Foi retirado cuidadosamente o excesso de água das grades e guardadas.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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