



Universidade Federal Fluminense
Centro de Ciências Médicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

DANIELLE MOTA FONTES ANTUNES

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE D-XILOSE NO MODELO
EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL CRÔNICA
ANTÍGENO-ESPECÍFICA EM RATOS.

NITERÓI

2007

DANIELLE MOTA FONTES ANTUNES

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE D-XILOSE NO MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL CRÔNICA ANTÍGENO-ESPECÍFICA EM RATOS.

Dissertação submetida à apreciação da banca do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadores: Prof^o Dr. Gilberto Perez Cardoso

Prof^a Dr^a. Gerlinde Agate Platais Brasil Teixeira

Niterói

2007

Antunes, Danielle Mota Fontes

Avaliação da absorção intestinal de D-xilose no modelo experimental de inflamação intestinal crônica antígeno-específica em ratos. / Danielle Mota Fontes Antunes. – Niterói : [s. n.], 2007.

115f., 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade Federal Fluminense, 2007.

Bibliografia: f. 98-112.

1. Inflamação intestinal crônica. 2. Amendoim. 3. Ratos. 4. D-xilose. I. Título.

DANIELLE MOTA FONTES ANTUNES

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE D-XILOSE NO MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL CRÔNICA ANTÍGENO-ESPECÍFICA EM RATOS.

Dissertação submetida à apreciação da banca do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em 13/12/2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilson Teles Boaventura

Prof. Dr. Mauricio Afonso Vericimo

Prof. Dr. José Galvão Alves

Niterói

2007

À minha família, pelo apoio presente em todos os momentos e pelo exemplo de amor e fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado, proporcionando a realização de mais uma conquista.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo amor incondicional e apoio presente em todos os momentos.

Ao Romulo, por sempre ter sido um companheiro exemplar, me apoiando com muito amor, compreensão e amizade.

Ao prof. Gilberto, pela confiança, orientação e amizade.

À prof., amiga e orientadora Gerlinde, por ter me recebido de braços abertos no GIG, acreditando e confiando em meu trabalho, sendo responsável pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos do GIG – Patrícia, Munique, Priscila, Valéria, Monique, Mônica, Andrea e Adriana – pela ajuda, respeito, carinho e aprendizado, assim também aos amigos que já passaram por lá e deixaram uma marca especial, como Janilda, Vinícius, Cecília e Archimedes. À Sylvia, pelo carinho e ajuda na revisão do texto.

Aos amigos do Mestrado, em especial a minha turma, pelo carinho, apoio e os momentos maravilhosos de descontração.

Aos profs do Departamento de Imunobiologia, pelo apoio presente sempre que necessário, em especial ao Prof. Mauricio Verícimo.

Aos profs do CCM, pelo ensino e respeito. Aos Profs Solange Artimos e Jocemir Lugon, pelas reflexões críticas que foram tão construtivas; aos Profs Salim Kanaan e Silvana Moreno, pela ajuda incontestável.

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer".

Albert Einstein

RESUMO

A alergia alimentar consiste em uma reação adversa que ocorre em pessoas susceptíveis quando ingerem alimentos sensibilizantes, sendo uma das causas de inflamação intestinal crônica. O estudo de modelos animais de inflamação da mucosa, na tentativa de desvendar a patogênese das doenças inflamatórias intestinais, tem sido estendido por quase meio século. A resposta imune inapropriada aos alimentos, como ao amendoim, glúten e leite pode estar relacionada à patogênese das doenças celíaca e de Crohn, as quais cursam com má-absorção intestinal. Recentemente, vários estudos têm utilizado a absorção intestinal de D-xilose como ferramenta investigativa na avaliação de problemas de absorção de nutrientes em doenças intestinais. O objetivo do presente estudo experimental consiste em avaliar a absorção intestinal de D-xilose no modelo em ratos de inflamação intestinal crônica antígeno-específica. Para isto, os animais do grupo experimental foram inoculados com extrato protéico de amendoim antes de serem expostos à dieta desafio, composta exclusivamente de sementes de amendoim *in natura*, para a indução da reação inflamatória intestinal através da alergia ao amendoim. Nossos resultados mostraram que a inoculação com extrato protéico de amendoim levou a uma produção de maiores títulos de IgG específicos do que no grupo controle ($p < 0,0001$) e estes títulos se correlacionaram positivamente com a alteração inflamatória da morfologia intestinal. Os animais pertencentes ao grupo experimental mostraram uma absorção intestinal de D-xilose menor do que os pertencentes ao grupo controle ($p < 0,0001$). Assim, o uso do teste sérico da D-xilose foi útil para identificar a presença de má-absorção intestinal em nosso modelo de inflamação intestinal crônica em ratos.

Palavras-chave: inflamação intestinal crônica, amendoim, ratos, D-xilose.

ABSTRACT

Food allergy is an adverse reaction that occurs in susceptible people when they eat sensitizing foods and is one of the causes of Inflammatory Bowel Disease (IBD). The study of animal models of mucosal inflammation as a means to probe the pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease (IBD) extends for almost a half century. The inappropriate immune response to foods, such as peanut, wheat, milk may be implicated in the pathogenesis of celiac and Crohn's diseases, which present small intestinal malabsorption. A number of recent studies have utilized D-xylose absorption as an investigative tool to study small intestinal function in a variety of clinical settings, including in IBDs. Thus, the aim of the present experimental study was to evaluate the intestinal absorption of D-xylose in an antigen specific gut inflammatory reaction rat model. Animals of the experimental group were immunized with peanut protein extract before their exposure to a challenge diet containing exclusively peanut seeds to induce the gut inflammatory reaction due to peanut allergy. Our results show that systemic immunization with peanut protein extracts renders antibody IgG titers higher than control group ($p < 0.0001$) and that the antibody titers correlate positively to an inflammatory alteration of the gut morphology. Animals pertaining to the experimental group showed an intestinal absorption of D-xylose lower than control rats ($p < 0.0001$). In conclusion, the use of serum D-xylose test was useful to identify the presence of small intestinal malabsorption in our antigen specific gut inflammatory reaction rat model.

Key-words: chronic gut inflammation, peanuts, rats, D-xylose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Arquitetura intestinal.	22
Figura 2. Processamento e apresentação de antígenos nas vilosidades intestinais.	24
Figura 3. Um modelo para o transporte de açúcar pelo enterócito.	31
Figura 4 Vias de absorção de aminoácidos e peptídios.	33
Figura 5. Fluxograma da classificação da EAACI de 1995 para reações adversas aos alimentos.	46
Figura 6. Possíveis mecanismos que levam ao desenvolvimento da DII.	49
Figura 7. Desenho esquemático das principais alterações observadas em diferentes estágios da inflamação intestinal crônica.	51
Quadro 1. Protocolo experimental I.	58
Quadro 2. Protocolo experimental II.	60
Figura 8. Consumo de ração e amendoim expresso em mg/gpc, durante o período de dieta desafio.	71
Figura 9. Média de calorias ingeridas entre os grupos do experimento durante o período de dieta desafio.	72
Figura 10. Média da diferença de peso, em gramas, dos animais dos grupos	74
Figura 11. Média dos níveis de IgG total anti-proteína de amendoim dos grupos durante as semanas de dieta desafio.	75
Figura 12. Títulos de anticorpos IgG total anti-amendoim nos grupos.	76
Figura 13. Diferenças histológicas entre os ratos do grupo controle e experimental.	77
Figura 14. Análise histomorfométrica dos segmentos intestinais do grupo experimental e controle.	78
Figura 15. Análise histomorfométrica dos segmentos intestinais dos grupos experimental e controle.	79
Figura 16. Determinação da curva de absorção e excreção de D-xilose em animais normais.	80
Figura 17. Média de D-xilose sérica (mg/ml) nos ratos do grupo experimental e controle.	81
Figura 18. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão altura/largura da vilosidade no duodeno.	82
Figura 19. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão altura da célula epitelial/largura da <i>lamina propria</i> no jejuno.	82
Figura 20. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão altura da vilosidade/altura da cripta no duodeno.	83

Figura 21. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais no duodeno.....	84
Figura 22. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a sorologia	84
Figura 23. Representação da correlação linear entre a sorologia e a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais no duodeno.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de modelos animais de DII.	52
Tabela 2. Distribuição dos macronutrientes.	61
Tabela 3. Distribuição de vitaminas e aminoácidos.....	62
Tabela 4. Comparação da significância entre grupos quanto ao consumo calórico médio durante o período de dieta desafio	73

LISTA DE ABREVIATURAS

α/α	Alfa/alfa
α/β	Alfa/Beta
$\gamma\delta$	Gama - Delta
AA	Aminoácidos
Ac	Anticorpo
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
Ara h 1-8	Fração da proteína do amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)
BALB/c	Linhagem isogênica de camundongos
BSA	Albumina de soro bovino
CCR6	Receptor de quimiocina
CD	Cluster of differentiation
CEI	Células epiteliais intestinais
c-kit	CD117 – receptor do fator de célula tronco
C57BL/6J	Linhagem isogênica de camundongos
CP	Placas da Cripta
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DSS	Dextrana de Sulfato de Sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylene Diamine TetrAcetic acid).
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
GLUT (1-5)	Transportadores de membrana de glicose
HCl	Ácido clorídrico
IA	Grupo Imune Amendoim
ICE	Enzima conversora de interleucina
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucinas
IR	Grupo Imune Ração
K ⁺	Potássio
LIE	Linfócitos intra-epiteliais
Lou-M	Linhagem isogênica de ratos
LPS	Lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas
MALT	Tecido Linfóide associado às mucosas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
Na ⁺	Sódio
NA	Grupo Normal Amendoim
NR	Grupo Normal Ração
OPD	Ortofenilenodiamina
3OMDG	Análogo de glicose: 3-O-metil-D-glicopiranosídeo
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão Salino Fosfato
PPs	Placas de Peyer
RAG	Proteína de recombinação gênica de linfócitos
rpm	Rotações por minuto

RU	Retocolite Ulcerativa
Sc	Subcutâneo
SGLT (1,5)	Co-transporte de molécula de glicose.
TCR	Receptor da célula T
TGF	Fator de crescimento tumoral
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
Th3	Células T helper 3
Thy-1	CD90 – marcador para linfócito T
TNF	Fator de Necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	O tubo digestório	21
2.2	Arquitetura e organização morfofuncional da mucosa intestinal.....	22
2.3	Mecanismos extrínsecos de proteção	24
2.3.1	Proteólise	24
2.3.2	O peristaltismo	25
2.3.3	O muco	25
2.4	Epitélio de absorção intestinal	26
2.4.1	Enterócitos	26
2.4.2	Células caliciformes	27
2.4.3	Células de Paneth.....	27
2.4.4	Células enteroendócrinas	28
2.4.5	Células M.....	28
2.4.6	Células indiferenciadas da cripta	28
2.4.7	Linfócitos intra-epiteliais (LIE)	29
2.5	Mecanismos de absorção de nutrientes	30
2.5.1	Absorção do açúcar	30
2.5.2	Absorção de proteínas.....	32
2.5.3	Absorção de lipídios.....	33
2.6	Tecido Linfóide Associado às Mucosas (MALT)	35
2.6.1	Placas da cripta (Cryptopatches-CP).....	36
2.6.2	Placas de Peyer (PP).....	36
2.7	Padrão de resposta imune aos antígenos presentes no lúmen intestinal.....	38
2.8	Tolerância Oral	41
2.8.1	Características do desenvolvimento e manutenção da tolerância oral	42
2.8.2	Regulação antígeno-específica.....	44
2.9	Alergia alimentar.....	45
2.9.1	Proteínas	47
2.10	Inflamação Intestinal: O Problema.....	48

2.11	Modelos animais.....	52
2.12	Inflamação intestinal crônica e a má-absorção de nutrientes	54
2.12.1	Avaliação da absorção de glicídios através do teste da D-xilose	54
3	OBJETIVOS	56
3.1	Geral.....	56
3.2	Específicos	56
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1	Animais.....	57
4.2	Protocolos Experimentais	57
4.2.1	Protocolo experimental I – Experimento piloto para indução da inflamação.....	57
4.2.2	Protocolo experimental II – Indução da inflamação intestinal crônica e estudo do metabolismo de açúcares.....	59
4.3	Dietas	61
4.3.1	Ração comercial	61
4.3.2	Amendoim.....	61
4.3.3	Comparação da distribuição de macronutrientes da ração e do amendoim	61
4.4	Extração de proteínas do amendoim	62
4.4.1	Procedimento de extração	62
4.4.2	Dosagem de proteína obtida nos extratos de amendoim.....	63
4.5	Inoculações: extrato bruto de amendoim e salina	63
4.6	Sangrias	64
4.7	Determinação do consumo diário de alimento.....	64
4.8	Peso dos animais	64
4.9	Avaliação dos níveis de IgG anti-proteínas do Amendoim	65
4.10	Teste de absorção de carboidratos – Dosagem da D-xilose sérica.....	65
4.10.1	Padronização da técnica de absorção de D-xilose em ratos normais e determinação da curva-padrão	65
4.10.2	Uso da técnica de D-xilose para avaliação dos animais do experimento	
	67	
4.11	Coleta de segmentos do intestino dos ratos.....	67

4.12	Estatística.....	69
5	RESULTADOS.....	70
5.1	Protocolo Experimental – I.....	70
5.1.1	Avaliação do consumo de ração e de semente de amendoim.....	70
5.1.2	Peso dos animais.....	73
5.1.3	Sorologia – dosagem de IgG total anti-proteína de amendoim.....	74
5.2	Protocolo Experimental II.....	75
5.2.1	Desenvolvimento do Modelo de Inflamação Intestinal Crônica em Ratos 75	
5.2.2	Avaliação sorológica.....	76
5.2.3	Avaliação Histológica.....	76
5.2.4	Padronização do teste da D-xilose sérica.....	79
5.2.5	Correlação entre o teste de absorção de D-xilose e os achados sorológicos e histológicos e entre a sorologia e um parâmetro histomorfométrico. 81	
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONCLUSÕES.....	97
8	BIBLIOGRAFIA.....	98
	ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

Contrariamente ao que pensamos, a maior área de contato do corpo não é a pele, mas sim a superfície mucosa, que é bombardeada imediatamente após o nascimento por uma ampla variedade de microrganismos e proteínas antigênicas decorrentes do ambiente (Brandtzaeg, 2002). Em humanos, estima-se que a mucosa do intestino delgado apresente 300m² de superfície e esta se encontra constantemente exposta ao contato com antígenos. Aproximadamente 30 kg de proteínas alimentares chegam a este órgão durante um ano, dos quais 130-190g destas proteínas são absorvidas de forma imunogênica (Brandtzaeg, 1998). Isto significa que a principal fonte de perturbação da atividade imunológica ocorre via mucosa, uma vez que uma grande quantidade de células do sistema imunitário encontra-se neste local. Devido às interações do sistema imunitário de mucosas com o sistêmico, os eventos iniciados no trato gastrintestinal possuem importante reflexão sistêmica (Weiner, 2001).

Apesar deste fato, na maioria das vezes em que os antígenos penetram o organismo através do intestino, a resposta imunológica resultante não é a resposta clássica Th1 ou Th2 (Weiner, 2001). Esta rede imunológica da mucosa apresenta um aspecto único – a habilidade em manter uma responsividade não inflamatória (tolerância) a uma gama enorme de antígenos derivados de fontes alimentares e bactérias comensais. A resposta imunitária inflamatória aos agentes potencialmente perigosos (bactéria, vírus entre outros) deve, no entanto, ser preservada para manter a integridade do intestino e permitir a absorção do nutriente (Hyun et al., 2006).

Recentemente, alguns autores têm relatado um aumento na incidência de reações adversas aos alimentos ingeridos, fato que pode ser decorrente de uma falha da indução da tolerância oral ou de uma quebra em sua manutenção. Dentre os

alimentos causadores de reações adversas, um dos mais comuns é o amendoim. A prevalência da alergia a esta semente que contém proteínas potencialmente alergênicas, tem aumentado em crianças e adultos principalmente nos EUA e Reino Unido (Strid et al., 2004).

A doença de Crohn e a retocolite ulcerativa são denominadas doenças inflamatórias intestinais (DII), porém apresentam características imunorregulatórias e manifestações clínicas distintas, sendo uma das principais causas de morbidade em países ocidentais (Weber & Turner, 2007). A literatura médica enfatiza a relação existente entre as DII e os processos relacionados à má absorção e perda de peso corporal. Vários problemas metabólicos podem complicar estas doenças, e isso geralmente ocorre em pacientes com formas severas (Allan, 1998).

O estudo de inflamação de mucosa em modelos animais para desvendar a patogênese das doenças inflamatórias do intestino se estende ao longo de quase meio século (Strober et al., 2002). Diferentes modelos estão disponíveis para o uso na pesquisa destas doenças, podendo ser usados para avaliar a patogênese, as alterações extraintestinais e moléculas farmacológicas ou agentes que podem levar a uma possível cura. Em geral, um modelo apropriado ou ótimo deve apresentar características similares ou idênticas ao curso da respectiva doença em humanos, tais como fisiopatologia, sinais e sintomas, inflamação e alterações morfológicas (Jurjus et al., 2004).

Estudos recentes têm utilizado a absorção da D-xilose como ferramenta investigativa da função duodenal em diferentes manifestações clínicas humanas, sendo um método simples e barato (Ehrenpreis et al., 2001). A D-xilose é uma pentose encontrada naturalmente nas plantas e sua metabolização incompleta permite seu uso como teste absorptivo (Craig & Ehrenpreis, 1999). Na literatura, não há descrição quanto ao uso do teste de D-xilose em modelos experimentais de DII.

Em um trabalho anterior do nosso grupo, Teixeira (2003) desenvolveu em camundongos C57BL/6J, um modelo de alergia ao amendoim que cursa com inflamação intestinal crônica, caracterizado por atrofia das vilosidades, hiperplasia da cripta, aumento do infiltrado de leucócitos mononucleares e edema na *lamina propria* (Teixeira, 2003). Estes achados são típicos da doença celíaca humana (enteropatia

causada pelo glúten), podendo também ser observado em outras enteropatias induzidas por alimentos (Marsh, 1995).

Assim, estabelecer o modelo de inflamação intestinal crônica antígeno-específico em ratos, avaliar a absorção intestinal de D-xilose e testar se há uma correlação positiva entre os achados laboratoriais e clínicos - histológicos permitirá uma melhor compreensão dos prejuízos nos processos inflamatórios intestinais com respeito à absorção e ao metabolismo de nutrientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O tubo digestório

O tubo digestório compreende a boca, a faringe, o esôfago, o estômago, o intestino delgado, o intestino grosso e o ânus. Os alimentos são triturados na boca durante a mastigação, onde os amidos sofrem a primeira clivagem enzimática; ao chegar no estômago, inicia-se a digestão protéica. O pH muito baixo e a ação de enzimas propiciam o início da quebra das proteínas. No duodeno, o homogeneizado de macromoléculas de origem protéica, lipídica e de carboidrato encontrará uma série de enzimas que reduzirão a imensa maioria destas moléculas às suas unidades básicas desprovidas de significado imunológico (Swarbrick et al, 1979 *apud* Teixeira, 2003).

O muco, os movimentos peristálticos e mecanismos imunológicos agem como barreiras físico-químicas, que dificultam a penetração de macromoléculas. Apesar de todos estes mecanismos para garantir um contato restrito do organismo com macromoléculas e microrganismos do meio ambiente, este contato acaba ocorrendo. Embora insignificante do ponto de vista nutricional, ele é de grande importância do ponto de vista imunológico, pois é responsável pela ativação constante do sistema como um todo, principalmente das células do sistema imune de mucosas (Swarbrick et al, 1979; Mayer, 2005).

A absorção dos nutrientes ocorre sob a ação de mecanismos ativos e passivos, através da superfície de milhões de pequenas dobras. Após a entrada de macromoléculas nas placas de Peyer ou na *lamina propria*, elas podem alcançar os vasos linfáticos que as conduzirão aos linfonodos mesentéricos de drenagem regional. Nessas estruturas, há uma vasta coleção de células apresentadoras de antígenos

(APC), além de linfócitos T e B. O enorme repertório de macromoléculas provenientes do intestino pode também alcançar a circulação do sistema porta e estimular componentes do sistema imunológico presentes no fígado. De fato, já foi atribuído ao fígado um papel importante na indução da tolerância oral. As macromoléculas e microrganismos podem ainda alcançar a circulação sistêmica e se redistribuírem por todo o organismo (Cantor & Dumont, 1967; Qian et al, 1985).

2.2 Arquitetura e organização morfofuncional da mucosa intestinal

A organização morfológica da parede do tubo digestório é muito parecida em toda sua extensão. Assim, vista de dentro para a luz intestinal, a parede é constituída por quatro camadas: a serosa, a muscular, a submucosa e a mais complexa das quatro, a mucosa. A organização da mucosa e da submucosa, com pregas circulares, vilosidades e bordas em escova das células epiteliais, gera um aumento da área de contato de até 150 vezes a área da pele (Figura 1) (Camerini et al, 1993).

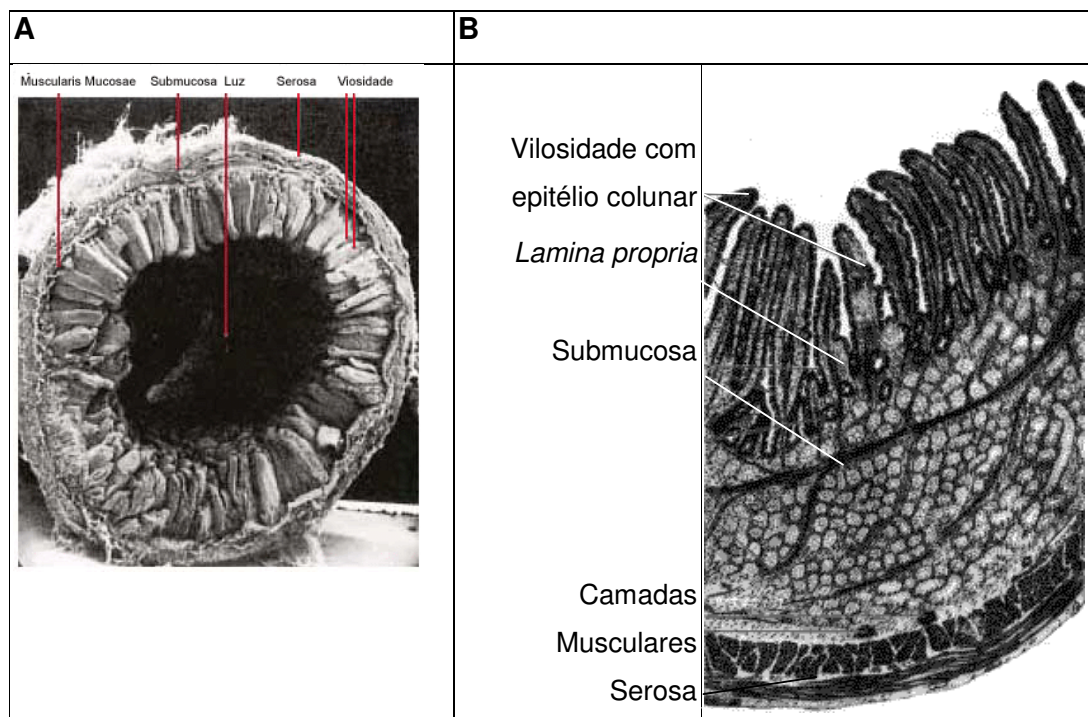


Figura 1. Arquitetura intestinal. A) Eletromicrografia da seção transversal do intestino delgado, demonstrando as vilosidades e a parede intestinal. B) Histologia do intestino normal, demonstrando as camadas: serosa, muscular externa e interna, submucosa e mucosa, esta composta pela *lamina propria*, vilosidades e glândulas. Fonte: Mowat, 2003.

A camada mais externa das quatro, em relação à luz intestinal, recebe o nome de serosa ou adventícia, de acordo com o trecho considerado. Da faringe ao hiato diafragmático, o tubo digestório é recoberto por um tecido conjuntivo frouxo que se funde com os tecidos adjacentes, recebendo a denominação de adventícia. Atravessando o hiato diafragmático e entrando na cavidade peritoneal, é recoberta pela serosa, que como a adventícia, é composta por tecido conjuntivo frouxo. Esta camada é recoberta pelo mesotélio que, por sua vez, continua com o peritônio parietal, permitindo, deste modo, que o estômago e as alças intestinais não fiquem soltos na cavidade abdominal (Camerini et al, 1993).

A mucosa, camada mais complexa das quatro, é formada por glândulas, pela *lamina propria* e por uma camada de células epiteliais colunares que, revestindo as vilosidades e as criptas, mantém contato com o meio ambiente (Camerini et al, 1993). É na camada mucosa que ocorre a maioria das interações entre o meio ambiente e o organismo (Johnson & Kudsk, 1999).

A *lamina propria*, que tem a largura aproximada da altura das células epiteliais, é composta por um tecido conjuntivo reticular e fibroelástico que dá sustentação aos vasos sanguíneos e linfáticos e às terminações nervosas. Nesta região encontramos também uma quantidade importante de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, mastócitos e eosinófilos (Camerini et al, 1993).

As células epiteliais intestinais (CEI) ou enterócitos são distintas de acordo com a região do tubo digestório em que se encontram. Elas permitem uma absorção seletiva do material da luz, além de secretarem seus produtos de modo diferenciado (Johnson & Kudsk, 1999).

Disperso entre as CEI, observamos um grande número de linfócitos intra-epiteliais (LIE). Estes linfócitos estão mais concentrados no duodeno e no jejuno proximal numa relação aproximada de 10/1 CEI/LIE. Estas células participam de modo decisivo na regulação das interações que ocorrem entre o meio ambiente e o sistema imunológico, sendo que estas interações produzem efeitos locais e sistêmicos (Guy-Grand et al, 1978).

2.3 Mecanismos extrínsecos de proteção

A função primária do intestino é a absorção de nutrientes. No entanto, tendo em vista sua função e a sua grande superfície de contato com o meio, o mesmo fica exposto a uma grande variedade de antígenos derivados não só dos alimentos, como também das bactérias que compõem a microflora e/ou de possíveis microrganismos patogênicos. Do ponto de vista fisiológico, o intestino é limitado por uma barreira seletiva que permite a absorção de produtos essenciais e, ao mesmo tempo, impede a entrada de substâncias agressoras (Johnson & Kudsk, 1999).

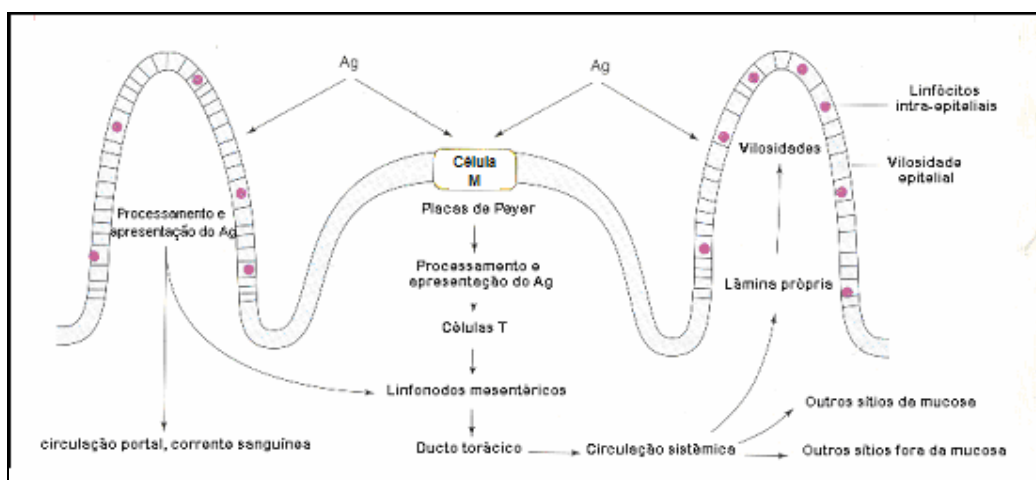


Figura 2. Processamento e apresentação de antígenos nas vilosidades intestinais. Esquema modificado de Weiner, 1997.

2.3.1 Proteólise

O primeiro mecanismo a ser considerado é a atividade proteolítica das secreções gastrintestinais. A absorção do nitrogênio dietético sofre influência das condições gerais e locais de digestão, tais como: capacidade proteolítica, modo de ingestão, composição química da dieta, absorção e motilidade intestinal (Waitzberg & Mester, 1998). Qualquer alteração nestes fatores pode ter influência sobre o sistema imunológico. Assim, ao se alterar a capacidade proteolítica das secreções, a capacidade de absorção antigênica é modificada, podendo levar a repercussões imunológicas importantes. Um exemplo disto é a dificuldade de indução de tolerância oral concomitante a uma administração de inibidores de proteólise (Bruce & Ferguson,

1986). Este modelo experimental é traduzido na clínica, por exemplo, nos pacientes com fibrose cística que apresentam uma secreção pancreática diminuída e, por conseguinte, uma alta incidência de alergia alimentar (Walker & Isselbacher, 1974).

Outras proteínas secretadas pelas glândulas exócrinas, como o muco, também apresentam um papel importante que limita o contato do organismo com antígenos, principalmente de microrganismos patogênicos. Dentre estes fatores, que dificultam, mas não impedem completamente a penetração dos microrganismos na parede intestinal, destaca-se a lactoferrina. Esta proteína – ligante de ferro - é secretada pelo pâncreas e dificulta a reprodução das bactérias dependentes deste íon (Johnson & Kudsk, 1999).

2.3.2 O peristaltismo

O peristaltismo intestinal não constitui uma barreira propriamente dita, mas regula a velocidade do trânsito intestinal e conseqüentemente, o tempo de contato do conteúdo luminal com as barreiras físico-químicas estabelecidas pelo muco e pelo glicocálix (Teixeira, 2003).

2.3.3 O muco

O muco, outra barreira importante para a proteção, é um meio semi-sólido que recobre a mucosa sob a forma de uma película aderente. Esta película pode ser dividida em três camadas principais, de dentro para fora: o glicocálix, o muco propriamente dito e a camada lipídica (Lamont, 1992 *apud* Teixeira, 2003).

A camada lipídica é a mais externa e a primeira, entre as três, a fazer contato com o material da luz intestinal. Composta predominantemente por fosfatidilcolina, esta camada contribui de forma significativa na seletividade dos produtos que entrarão no muco propriamente dito. Os lipídios que compõem a camada mais externa, bem como aqueles que se localizam no interior do muco, agem como seqüestradores de radicais livres secretados pelos microrganismos (Lamont, 1992).

O muco propriamente dito é composto por uma família heterogênea de glicoproteínas altamente viscosas, as mucinas, que não só diferem nas suas proporções ao longo do trato digestório, como também ao longo da ontogenia do indivíduo (Shub et al, 1983).

Por ser um meio semi-sólido, o muco age como uma membrana seletiva que permite a difusão de substâncias de baixo peso molecular, dificultando ou impedindo a passagem de macromoléculas e de microrganismos que permanecem em suspensão no meio. Assim, ao permanecerem em suspensão no muco, os mesmos são eliminados pelo peristaltismo. Os grupamentos de carboidratos que compõem estas glicoproteínas são análogos aos existentes nas células epiteliais ou enterócitos (Johnson & Kudsk, 1999). Desta forma, postula-se então que o muco compete pela ligação de proteínas e microrganismos da luz intestinal que, de outra forma, se ligariam aos enterócitos (Matsuo et al, 1997).

O glicocálix, que se encontra na interface entre o muco secretado e as microvilosidades, é a camada mais densa das três. É composto por glicoproteínas que revestem as microvilosidades da superfície apical dos enterócitos (Johnson & Kudsk, 1999; Mayer, 2000).

Deste modo, somente quando vencidas as barreiras físicas o conteúdo luminal pode entrar em contato direto com o tecido epitelial da mucosa intestinal (Johnson & Kudsk, 1999).

2.4 Epitélio de absorção intestinal

O tecido epitelial é constituído por uma monocamada de células epiteliais, os enterócitos. Além deste constituinte principal e mais abundante, este tecido também é composto pelas células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas, células M, células indiferenciadas da cripta e os linfócitos intra-epiteliais (LIE) (Neutra & Kraehenbuhl, 1992; Johnson & Kudsk, 1999; Mayer, 2000).

2.4.1 Enterócitos

Os enterócitos são células colunares, responsáveis pela absorção seletiva dos nutrientes. Estão organizados de modo a regular e controlar a passagem de macromoléculas do lúmen para a região intersticial. Encontram-se conectados uns aos outros na região apical pelas junções bloqueadoras (*tight junctions*), que controlam a passagem de moléculas hidrossolúveis, principalmente das macromoléculas. Estas

junções são refeitas e mantidas de forma eficiente durante a renovação epitelial e durante a migração de LIE do tecido epitelial para o lúmen (Johnson & Kudsk, 1999).

Outra função importante das células epiteliais é sua capacidade de apresentar antígenos para os linfócitos encontrados na *lamina propria* (Kaiselien et al, 1989). Para tanto, estas células expressam constitutivamente baixos níveis de moléculas de histocompatibilidade de classe II na superfície basolateral, aumentando assim de forma significativa na presença de citocinas pró-inflamatórias (Ramachandran et al, 2000 *apud* Teixeira, 2003).

Desta forma, os enterócitos apresentam, fisiologicamente, peptídeos absorvidos do lúmen intestinal por endocitose (a partir das microvilosidades da região apical celular) que, após o processamento, são expressos associados a moléculas de MHC de classe II (Ramachandran et al, 2000; Neutra et al, 2001).

A apresentação de antígenos feita pelos enterócitos é diferente das APC. Os enterócitos estimulam, preferencialmente, um padrão supressor dos linfócitos T CD8⁺. Contudo, o aumento de IFN- γ no meio pode alterar este padrão de resposta celular, potencializando a apresentação para linfócitos T CD4⁺ (Mayer, 2000; Mayer, 2003).

2.4.2 Células calciformes

As células calciformes encontram-se distribuídas, tanto nas vilosidades como nas criptas, por todo o intestino delgado e grosso. São responsáveis pela secreção e liberação de muco (Kato & Owen, 1999).

2.4.3 Células de Paneth

As células de Paneth encontram-se geralmente localizadas nas criptas do intestino delgado. Seu citoplasma é constituído, entre outros componentes, por vários grânulos secretores contendo lisozima e fator de necrose tumoral (TNF). Atuam no controle da proliferação de microrganismos na cripta (Kato & Owen, 1999).

2.4.4 Células enteroendócrinas

As células enteroendócrinas encontram-se distribuídas por todo o trato gastrointestinal, tendo como principal função a liberação de hormônios nos capilares dos tecidos conectivos em resposta às mudanças no meio externo (Kato & Owen, 1999).

2.4.5 Células M

Além dos enterócitos, a mucosa intestinal possui outro tipo de célula epitelial recobrando as placas de Peyer - as células M. Estas células apresentam sua superfície apical polarizada e une-se às células vizinhas por junções *tight*. Sua face basolateral apresenta grandes invaginações, formando bolsas intra-epiteliais que aumentam a superfície de contato com o tecido linfóide subjacente organizado. Estas bolsas constituem locais específicos para as interações entre as células M e as subpopulações de LIE, uma vez que as primeiras são conhecidas por absorverem antígenos da luz intestinal por transcitose (Neutra et al, 2001).

2.4.6 Células indiferenciadas da cripta

O epitélio intestinal caracteriza-se por uma população celular dinâmica. Assim, as células epiteliais encontradas na cripta, são imaturas e se tornam, cada vez mais, diferenciadas à medida que se desloca no sentido apical da vilosidade. Deste modo, existem células epiteliais em diferentes estágios de maturação nas paredes ascendentes das criptas. A partir da transição cripta-vilosidade, até o topo da vilosidade, encontram-se apenas células maduras e diferenciadas (Baggi et al, 1999). Embora a renovação celular ocorra de forma constante, sem risco à integridade da barreira mucosa, esta requer uma regulação precisa, tanto da proliferação quanto da diferenciação celular. Para tal, torna-se necessário a presença de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, substratos metabólicos, prostaglandinas e estímulos imunológicos (Podolsky, 2000).

Dos fatores de crescimento, destacam-se o TGF- α e o TGF- β que regulam a renovação das células epiteliais a partir da cripta para a vilosidade, através do controle da proliferação e da diferenciação celular. Deste modo, o TGF- α estimula a proliferação

das células epiteliais indiferenciadas da cripta que migram no sentido da vilosidade e neste caminho iniciam sua diferenciação estimulada e controlada pelo TGF- β . A expressão de TGF- α nas células da vilosidade e, do mesmo modo, a expressão de TGF- β encontrada nas células da cripta, sugere uma necessidade constitutiva de restrição na proliferação (Podolsky, 2000).

Como exemplos da influência do substrato metabólico, destacam-se a glutamina e os ácidos graxos de cadeia curta. No intestino delgado, principalmente na mucosa intestinal, a glutamina funciona como principal substrato energético para os enterócitos e linfócitos. Já no cólon, os principais substratos energéticos para os colonócitos são os ácidos graxos de cadeia curta – acetato, propionato e butirato – formados a partir da ação fermentativa das bactérias residentes desta região sobre as fibras alimentares (Gu et al, 2001).

2.4.7 Linfócitos intra-epiteliais (LIE)

Os LIE estão localizados acima da *lamina propria*, principalmente no duodeno e no jejuno proximal, e participam de modo decisivo na regulação das interações que ocorrem entre o meio ambiente e o sistema imunológico, tanto local quanto sistêmico. Estes linfócitos são, predominantemente, (98%) linfócitos T $\gamma\delta$ CD8⁺ CD45RO⁺ (células de memória) (Mayer, 2005).

Contudo, também estão presentes linfócitos T com TCR $\alpha\beta$. Embora não exista unanimidade quanto às funções desempenhadas por estes linfócitos, Mayer sugere que a função citotóxica e/ou supressora seja a principal (Mayer, 2000). Outra característica importante é a expressão da integrina seletiva $\alpha E\beta 7$, que se liga a E-caderina nas células epiteliais cuja expressão é induzida pelo TGF- β (James & Kiyono, 1999).

Tanto os LIE que expressam o TCR $\alpha\beta$ quanto os que expressam $\gamma\delta$, apresentam uma diversidade limitada de receptores de antígenos. Esses achados apóiam a teoria de que a variação da especificidade destes linfócitos é limitada (Mayer, 2005).

Imerso na *lamina propria*, encontramos também uma quantidade importante de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, mastócitos e eosinófilos. Os linfócitos da *lamina*

propria constituem uma mistura heterogênea de subpopulações linfocitárias - linfócitos T, linfócitos B e plasmócitos secretores de imunoglobulinas, principalmente IgA. Similarmente aos LIE, os linfócitos da *lamina propria* são T CD8⁺ CD45RO⁺, embora também expressem a integrina seletiva $\alpha 4\beta 7$ (James & Kiyono, 1999; Mayer, 2000; Nagler-Anderson, 2000).

As populações celulares descritas acima constituem o tecido epitelial e o tecido linfóide difuso que revestem a superfície mucosa, onde cada elemento tem seu papel em uma rede de interações complexas. Além deste tecido linfóide difuso, a mucosa intestinal possui um tecido linfóide organizado, representado pelas placas de Peyer (Teixeira, 2003).

2.5 Mecanismos de absorção de nutrientes

2.5.1 Absorção do açúcar

Os açúcares são a principal fonte de caloria em todos os estágios da vida. As fontes dietéticas de açúcar variam da lactose no leite a carboidratos complexos. Estes carboidratos são digeridos em monossacarídeos, na maioria glicose, galactose e frutose, antes da absorção no intestino delgado. A digestão ocorre através de uma série de reações complexas mediadas por amilases salivares e pancreáticas e por dissacaridases ancoradas na superfície da borda em escova dos enterócitos que cobrem a superfície do intestino delgado. Os enterócitos maduros no topo das vilosidades intestinais são os responsáveis por completarem a absorção de açúcares no corpo. Uma vez que absorvidas, a galactose e a frutose na maioria das vezes são convertidas em glicose para o metabolismo ou estocagem (Wright et al., 2003; Drozdowski & Thomson, 2006).

Como resultado da ação das amilases salivares e pancreáticas e das dissacaridases da borda em escova, os carboidratos presentes na dieta são convertidos em suas unidades monoméricas (hexose - as mais freqüentes) antes da absorção. Estes são apresentados ao epitélio intestinal na forma de glicose, galactose e frutose. Os açúcares são absorvidos no início e no meio do intestino delgado pelos enterócitos maduros, na parte superior da vilosidade (Wright et al., 1994; Wright et al., 2003; Drozdowski & Thomson, 2006; Raybould et al., 2006).

A glicose e a galactose são transportadas ativamente pela membrana borda em escova através do co-transportador (*symport*) Na^+ /açúcar e são acumuladas dentro da célula. Enquanto algumas destas glicoses fluem no metabolismo celular, uma grande fração sai da célula pela membrana basolateral por difusão (*uniport*). No caso de análogos de glicose que são transportados pela SGLT1, mas não são metabolizados, como por exemplo, a alfa-metil-D-glicopiranosídeo, o meio intracelular pode alcançar uma concentração 500-vezes maior do que aquela no lúmen intestinal. A energia para este transporte ativo vem do gradiente de sódio que passa pela membrana borda em escova. Este gradiente de sódio é mantido pela Na^+/K^+ -ATPase basolateral, que impulsiona os íons sódio co-transportados para fora pela membrana basolateral (Figura 3) (Wright et al., 2003).

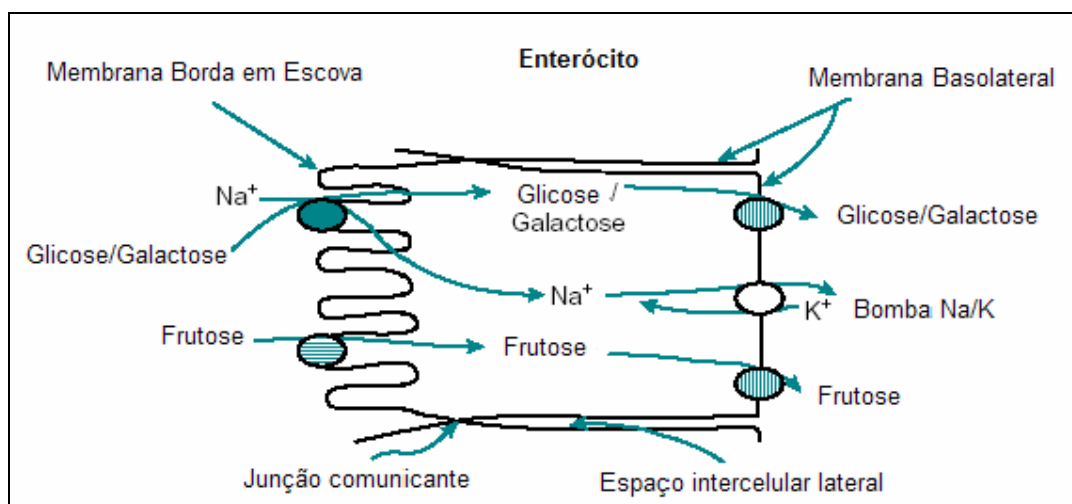


Figura 3. Um modelo para o transporte de açúcar pelo enterócito. Os açúcares são transportados pela célula e não pelas junções comunicantes. Na borda em escova, a glicose e a galactose são transportadas para dentro da célula por um sódio co-transportador de glicose, denominado primariamente de SGLT1. A frutose é transportada passivamente pela borda em escova pela SGLT5. Alguns autores sugerem que há um segundo transportador de glicose de baixa afinidade na borda em escova: uns dizem que é o GLUT2, enquanto outros dizem que pode ser um segundo SGLT. A glicose, a galactose e a frutose são transportadas passivamente para o exterior do enterócito pela membrana basolateral, indo para o sangue. Para os análogos de açúcar que não são metabolizados, como o 3OMDG (3-O-metil-D-glicopiranosídeo), o principal caminho é através do GLUT2. A frutose e a glicose podem passar também pela GLUT2, mas há uma grande evidência de que a frutose também passa pela GLUT5 e que a glicose deixe a célula por um mecanismo tipo a exocitose. Fonte: Wright et al., 2003.

Para cada molécula de glicose que é transportada pela borda em escova, dois íons sódio (e dois ânions) também são transportados pelo epitélio. Isto atrai

aproximadamente 1.100 moléculas de água pelo epitélio para manter a isosmolaridade do absorvido, lembrando que a absorção de íon e do nutriente pelo intestino não aumenta a osmolaridade do fluido que continua no lúmen intestinal. O conjunto de absorção glicose, sal e água justificam o fato de que a absorção de água que ocorre na porção inicial e no meio do intestino é glicose-dependente, e é a explicação para a terapia de reidratação oral, usada tão eficazmente para tratar pacientes com diarreia secretora (Hirschhorn & Greenough, 1991; Wright et al., 2003).

2.5.2 Absorção de proteínas

As proteínas ingeridas não sofrem na boca, modificações químicas, sendo apenas reduzidas a partículas menores. No estômago, as proteínas e polipeptídios são desnaturados por ação do HCl e hidrolisadas pela pepsina. A digestão no estômago representa apenas 10-20% da digestão total protéica. A maior parte desta digestão ocorre no lúmen do duodeno e jejuno, sob a influência do suco pancreático, processando-se, quase completamente no íleo terminal (Frenhani & Burini, 1999; Teixeira, 2003).

No intestino delgado, a enteropeptidase, em pH neutro, ativa o tripsinogênio a tripsina que, por sua vez, promove a ativação das outras propeptidases do suco pancreático. Ocorre, então, a hidrólise luminal de proteínas e polipeptídios, produzindo aminoácidos (AA) livres e pequenos peptídios (2-6 AA). Os AA e pequenos peptídios, produtos da hidrólise luminal, são então hidrolisados pelas peptidases da borda em escova em AA, di e tripeptídios que são absorvidos, principalmente, no jejuno proximal (Frenhani & Burini, 1999). É importante ressaltar que uma parte dos peptídeos é absorvida intacta por difusão. Depois de absorvidos, estes podem ser hidrolisados em aminoácidos por peptidases celulares e passar para a circulação (Waitzberg & Mester, 1998), alcançar os linfonodos regionais e serem apresentados ao sistema imunológico local (Mayer, 2005).

A absorção dos produtos da digestão protéica, AA, di e tripeptídios, ocorrem por processos complementares, e podem ser transportados por três mecanismos simples: transferência passiva por difusão, transferência passiva por difusão facilitada e transferência ativa por co-transporte (Figura 4). A transferência passiva pode ser por

vias celulares ou paracelulares, enquanto a transferência ativa, por vias celulares (Frenhani & Burini, 1999).

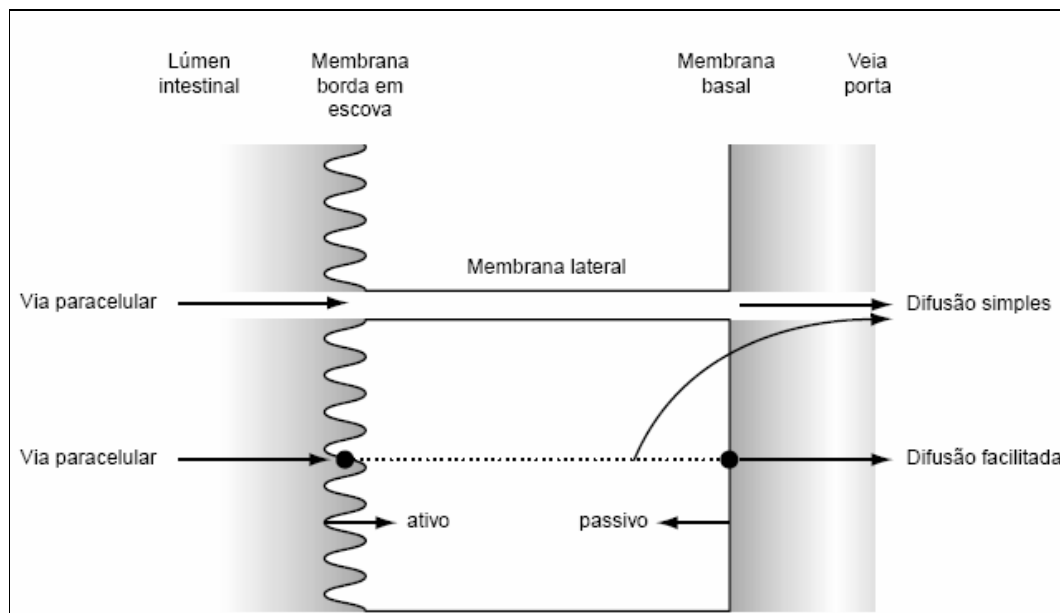


Figura 4 Vias de absorção de aminoácidos e peptídios. Fonte: Frenhani & Burini, 1999.

A atividade dos transportadores de AA e peptídios na borda em escova é regulada pelos respectivos níveis de substratos, sendo que as variações que ocorrem nessa atividade, dependem do custo da síntese dos transportadores e da disponibilidade de nutriente no lúmen, cuja presença causa estimulação da atividade do transportador. Portanto, a absorção não parece ser diretamente regulada por mecanismos neurais ou endócrinos, como os processos digestivos, dependendo apenas da presença dos produtos a serem absorvidos em contato com a superfície da mucosa (Frenhani & Burini, 1999).

2.5.3 Absorção de lipídios

O intestino delgado é o sítio inicial de absorção dos ácidos graxos da dieta. Devido a sua lipossolubilidade acreditava-se que estes eram absorvidos por difusão. Porém, Wilson e colaboradores demonstraram a existência de uma camada estacionária de água junto à borda em escova dos enterócitos, na qual a solubilização

é muito baixa. Desta forma esta camada estacionária atua como barreira, impedindo a migração das moléculas de ácidos graxos até a borda em escova. A solubilização micelar é muito importante para garantir a absorção dos produtos da digestão lipídica no lúmen intestinal. Quando a concentração luminal de sais biliares excede a concentração micelar crítica, formam-se micelas mistas de sais biliares e fosfolipídios. As moléculas difundem-se facilmente por entre a camada estacionária de água, possibilitando um aumento significativo da concentração aquosa de ácidos graxos e monoacilgliceróis (Curi et al., 2002). O fluxo de ácidos graxos pela membrana apical é muito grande, favorecido por alguns fatores como: alta concentração luminal de ácidos graxos, presença de mecanismos apicais de transporte mediados por carreadores e a solubilização micelar dos ácidos graxos no lúmen intestinal (Berk et al., 1996; Trotter et al., 1996). O tamanho da cadeia carbônica também interfere no processo de absorção. Os ácidos graxos de cadeia curta são em sua maioria produzidos no intestino a partir da fermentação bacteriana das fibras, principalmente as solúveis, sendo pouco adquiridos da dieta (leite e derivados são fontes de ácido butírico). A absorção destes ácidos graxos é diretamente proporcional à sua concentração na solução de perfusão (Liao et al., 1984) e geralmente ocorre por difusão. A digestão enzimática dos triglicerídios ocorre de forma mais intensa no duodeno pela ação da lipase e colipase pancreáticas, além de íons cálcio. No duodeno, a lipase pancreática atua na região hidrofóbica da interface óleo-água para separar os dois ácidos graxos da posição alfa. A colipase facilita a ação da lipase pelo deslocamento do sal biliar do substrato, já que estes tendem a inibir a ação da lipase. Os produtos primários da ação da lipase sobre as gorduras (ácidos graxos de cadeia longa e monoglicerídios) combinam-se com os sais biliares formando micelas. As demais gorduras têm digestão diferenciada. Assim, os ésteres de colesterol e fosfolipídios são rompidos por esterases em ácidos graxos, colesterol e lisofosfatídeos. As vitaminas lipossolúveis podem ser incluídas no interior das micelas, que se rompem ao entrar em contato com a borda em escova da membrana intestinal. Os sais biliares permanecem no lúmen para formarem outras micelas no jejuno-íleo e posteriormente sofrerem absorção (Armand, 2007).

Os monoacilgliceróis e os ácidos graxos de cadeia longa são absorvidos na borda em escova dos enterócitos e migram para o retículo endoplasmático liso destes, no qual ocorre a ressíntese dos triacilgliceróis, que formarão as lipoproteínas que atingem

a circulação via sistema linfático. Ockner e Manning isolaram e caracterizaram uma família de pequenas proteínas (aproximadamente 15 kDa) denominadas de proteínas ligantes de ácidos graxos (FABP) responsáveis pelo transporte citosólico dos ácidos graxos de cadeia longa (Ockner & Manning, 1976). Além de transporte, elas atuam como co-fatores de várias enzimas que participam do metabolismo lipídico (como a acetilcoenzima A sintetase), participam do estoque de ácidos graxos de cadeia longa não esterificado e protege a membrana celular contra o potencial ação detergente de concentrações elevadas de ácidos graxos livres. Modulam ainda sinais intracelulares mediados por lipídios, o crescimento e a diferenciação celular (Stremmel, 1988; Prieto et al., 1996). Prieto e colaboradores (1996) demonstraram a existência de FABPs associadas à borda em escova dos enterócitos e uma possível participação destas proteínas na absorção de ácidos graxos. Bass e colaboradores (1985) investigaram a cinética do influxo de ácido oléico marcado no jejuno e no íleo de ratos, utilizando vesículas de membranas da borda em escova dos enterócitos (Bass et al., 1985).

2.6 Tecido Linfóide Associado às Mucosas (MALT)

O conceito de tecido linfóide associado às mucosas foi introduzido por McDermont e Bienenstock (1978), que mostraram que os linfoblastos B de origem intestinal migram preferencialmente para outras mucosas ou outros sítios do próprio intestino (Mcdermott & Bienenstock, 1978; Mcdermott et al, 1980). Guy-Grand e colaboradores (1978) mostraram, no camundongo, que o mesmo ocorre com linfoblastos T. A idéia de um “sistema imunitário comum das mucosas” se baseia nas características desta comunidade linfocitária que se estabelece nas mucosas e pela circulação recursiva das mesmas (Guy-Grand et al, 1978).

O campo da imunologia de mucosa cresceu muito nas últimas duas décadas. Hoje o fenômeno da tolerância oral e da população envolvida neste sistema são focos importantes de estudo onde os modelos animais de inflamação intestinal se destacam para o melhor entendimento deste complexo sistema (Mayer, 2005).

2.6.1 Placas da cripta (Cryptopatches-CP)

Em 1996, Kanamori e colaboradores identificaram um novo tipo de tecido linfóide na mucosa intestinal de murinos, as placas da cripta (CP), por estarem localizadas na *lamina propria* das criptas. Podem ser detectadas a partir de duas ou três semanas após o nascimento, e uma fração dos linfócitos das CP expressam c-kit, IL-7R e Thy-1 (Kanamori et al, 1996).

As CP são compostas por pequenos grupos de células linfóides com fenótipos de linfócitos imaturos e células dendríticas. Suas células precursoras expressam CCR6, e a deleção deste receptor inibe o desenvolvimento dos folículos linfóides isolados (Lügering & Kucharzik, 2006). A função das CP ainda é controversa. Quando foram identificadas pela primeira vez acreditava-se que fosse um sítio extratímico de desenvolvimento de linfócitos T intra-epiteliais através de observações feitas em camundongos atímicos. Estudos mais recentes mostraram que as células das CP têm um fenótipo consistente com as células tronco de origem linfopoiéticas. Novas evidências mostram que a formação dos LIE não depende das CP. Estudos subseqüentes demonstraram que há presença destes linfócitos mesmo em camundongos deficientes de linfócitos T (Mayer, 2005).

2.6.2 Placas de Peyer (PP)

Para muitos autores, são nos agregados linfóides das placas de Peyer que ocorre a maior parte da reatividade às macromoléculas que penetram na mucosa intestinal. Sendo um órgão linfóide reconhecidamente importante do intestino, foi descrito em 1677 por Joseph Hans Conrad Peyer como um agregado linfóide macroscópico (Mayer, 2005).

As PP estão situadas abaixo de um tecido epitelial especializado, denominado de células M. Estas são mais permeáveis a macromoléculas que as células epiteliais, que recobrem as vilosidades e as criptas adjacentes (Owen, 1977; Pappo et al, 1988). Este aumento na permeabilidade está diretamente relacionado às suas características morfológicas, destacando-se uma camada de glicocálix e de muco mais delgada do que aquela que recobre o restante do intestino delgado. Diferentemente das células

epiteliais, as células M não apresentam uma borda em escova (microvilosidades) bem desenvolvida (Mayer, 2005).

O aumento de permeabilidade, em relação ao restante do epitélio, associado à expressão constitutiva de proteínas de classe II do MHC, sugere um papel importante destas células na regulação das interações do sistema imunológico com o meio ambiente (Allan et al, 1993).

As células M, diferentemente dos enterócitos, utilizam a endocitose como principal via de transporte transepitelial. Assim, pouco ou nada do material endocitado é direcionado aos lisossomos. Embora este compartimento endossomal seja acidificado e contenha proteases, pouco se sabe sobre a participação destas células no processamento e apresentação de antígenos. A proximidade das bolsas encontradas na superfície basolateral com a superfície apical diminui efetivamente a distância de transporte da vesícula de transcitose através da barreira de células M (Neutra et al, 2001). Recentemente, Verbrugghe e colaboradores (2006) demonstraram a expressão de Anexina V nas células M. Esta molécula é importante no processo de endocitose e de suporte da membrana plasmática sugerindo, assim, que Anexina V tem um papel importante no transporte de antígenos mediados pelas células M (Verbrugghe et al., 2006).

Uma vez que macromoléculas tenham atravessado as células M, elas entram em contato com as subpopulações de linfócitos localizadas nas bolsas da superfície basolateral. Estas subpopulações são constituídas basicamente por linfócitos T, B e células dendríticas. Os dois últimos tipos celulares funcionam como APC's nas placas de Peyer, processando estas moléculas e apresentando seus produtos aos linfócitos T adjacentes, os quais, por sua vez, estimulam os linfócitos B que ali se encontram. Estes linfócitos T diferem dos intra-epiteliais e são predominantemente CD4⁺ (Neutra et al, 2001).

Foi demonstrado que as interações entre as células envolvidas na resposta aos antígenos oriundos das células M induzem, seletivamente, linfócitos B a secretarem IgA. Deste modo, em estados fisiológicos, ocorre uma resposta do tipo Th2, com secreção das interleucinas (ILs) IL-4, 5, 6, 10, 13 e TGF- β e níveis mínimos de IFN- γ (McIntyre & Strober, 1999; Mayer, 2000; Nagler-Anderson, 2000).

É importante ressaltar que os linfócitos B ativados e diferenciados, antes de se tornarem plasmócitos secretores de IgA, deixam as PP, através dos vasos linfáticos aferentes, em direção aos linfonodos da região mesentérica, onde iniciam seu processo de maturação. Após esta etapa, estes linfócitos B ganham a circulação sistêmica, através do ducto torácico, entrando em contato com as outras estruturas linfóides da periferia. Finalmente, eles retornam para a *lamina propria* na mucosa intestinal onde, finalmente, se diferenciam em plasmócitos (Johnson & Kudsk, 1999).

A maioria dos estudos sobre as PP é realizada em modelos murinos. Existem poucos estudos em humanos, indicando diferenças na estrutura e função deste órgão linfóide entre as diferentes espécies. Primeiro, sua maior concentração está na região do íleo, enquanto que nos camundongos encontramos um número maior na região do duodeno. Segundo, seu desenvolvimento é pré-natal, enquanto que nos murinos o término do desenvolvimento se dá na fase pós-natal, a partir do contato com antígenos no lúmen. Essas diferenças parecem ajudar a explicar as dificuldades encontradas nas tentativas de indução de tolerância oral em humanos (Mayer, 2005).

2.7 Padrão de resposta imune aos antígenos presentes no lúmen intestinal

O intestino possui um tecido linfóide capaz de iniciar e efetuar uma grande variedade de respostas imunológicas. Estas reações afetam não só o trato gastrointestinal, mas o organismo como um todo, de forma sistêmica. Para se ter verdadeira dimensão da importância do trato digestório como um órgão imunológico, basta compararmos as superfícies externas da pele, do pulmão e do trato digestório. Assim, no homem adulto, enquanto a extensão da pele é de apenas 2m², o pulmão possui cerca de 80m² e o trato digestório pode alcançar até 300m² (Brandtzaeg, 2002). Além desta diferença em extensão, o intestino é um local privilegiado para contatos do organismo com o mundo antigênico, incluindo bactérias, parasitas, enzimas, toxinas e uma ampla variedade de proteínas alimentares e seus produtos metabólicos (Teixeira, 2003).

A barreira essencial a este constante contato antigênico é a mucosa e, portanto, sua integridade é fundamental dependendo da replicação, maturação e metabolismo de

seus constituintes. Funções adicionais para a manutenção da homeostase dependem do muco, das lisozimas secretadas pelo pâncreas, fagócitos e de fatores humorais envolvidos no processo inflamatório e na resposta imunológica (Brandtzaeg, 2002).

Estes fatores são produzidos, na sua maioria, localmente e o somatório destes mecanismos celulares e moleculares constitui a barreira da mucosa. No entanto, esta barreira não é absoluta, ao contrário, ocorre uma absorção contínua de antígenos pelas células epiteliais. As estruturas especializadas das PP, dos folículos linfóides, do apêndice vermiforme e de seus epitélios especializados permitem uma captação antigênica contínua (Mayer, 2003).

Por causa deste aporte antigênico intenso e constante, o intestino pode ser descrito como o principal órgão imunológico de contato fisiológico com o meio ambiente. As respostas imunes advindas deste contato podem ser diametralmente opostas levando, por um lado, a resposta imune clássica, com a proliferação linfocitária, produção de altas concentrações de anticorpos (Ac) e citocinas ou, por outro, uma hiporreatividade sistêmica conhecida como tolerância oral (Gebbers & Laissue, 1989).

Embora a maioria dos trabalhos publicados em imunologia dê uma grande ênfase à atividade dos linfócitos e seus produtos nos linfonodos, baço e outras estruturas internas, não são nestes locais que se encontra a maior parte do sistema linfóide. Na verdade, é na mucosa do intestino delgado que se localiza o maior número de linfócitos secretores de imunoglobulinas (Ig) do corpo (Van der Heijden et al, 1995). A observação de um grande número de células do sistema imunológico (linfócitos B e T, macrófagos, polimorfonucleares, etc.) no intestino levou vários autores a descreverem a mucosa e a submucosa do trato digestório como cronicamente inflamada ou fisiologicamente inflamada (Newby et al, 1980; Newby & Stokes, 1984).

Quando os animais são mantidos em condições artificiais, isentos de germes, ocorre uma redução importante do número de células linfóides na mucosa intestinal. No entanto, a redução é ainda mais drástica quando é oferecido a estes animais uma dieta livre de macromoléculas – animais livres de antígenos (Hooijkaas et al, 1984). Portanto, esse tecido linfóide associado às mucosas está envolvido na reatividade a alimentos e outros materiais provenientes do tubo intestinal. Além disso, os eventos imunológicos ali iniciados têm evidentes repercussões sistêmicas e não são restritos às mucosas.

Assim, as mucosas em geral e a mucosa digestiva em particular, podem ser vistas como vias naturais e efetivas de acesso ao sistema imunológico (Menezes et al, 2003).

Assim, o que se achava que eram múltiplos mecanismos para garantir um contato restrito do organismo com macromoléculas e microrganismos do meio ambiente, na verdade, são mecanismos que permitem o contato de forma constante e adequado. A absorção de macromoléculas é de grande importância do ponto de vista das reatividades imunológicas e da manutenção da estrutura morfológica da mucosa uma vez que sem estímulos antigênicos não há secreção de fatores tróficos para a manutenção da fisiologia local (Teixeira, 2003).

Uma das funções das subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+ e linfócitos B é a regulação da proliferação e manutenção da estrutura epitelial, preservando a integridade da mucosa intestinal. Desse modo, a presença dos nutrientes na luz intestinal e seu contato direto com a mucosa intestinal são responsáveis pelos estímulos antigênicos e, conseqüentemente, pela manutenção da estrutura íntegra da mucosa intestinal (Mayer, 2005).

A ausência de estímulos antigênicos derivados de uma desnutrição protéico-calórica ou de uma alimentação peptídica leva à diminuição das subpopulações linfocitárias e seus produtos – as citocinas. Isto pode levar a um aumento do tempo de migração celular da cripta para a vilosidade, o que leva à diminuição na renovação celular, uma das causas da atrofia das vilosidades e, conseqüente, alterações na permeabilidade e perda da função de barreira (King et al, 1997).

Independente da forma como entram as macromoléculas, através das células M ou via enterócitos, a resposta fisiológica observada na mucosa intestinal mostra a ausência de processo inflamatório. Nagler-Anderson e Shi (2001) relatam que após a administração oral de uma proteína ocorre expansão clonal de linfócitos T, independente se o padrão de resposta local é tolerogênica ou imunogênica (Nagler-Anderson & Shi, 2001).

Deste modo, no processo da tolerância oral não ocorre, necessariamente, a deleção dos clones reativos ao tolerógeno, existindo ao contrário, uma complexa rede de interações celulares e moleculares na sua indução e manutenção. A tolerância também é importante para a prevenção de reações de hipersensibilidade aos alimentos

e aos componentes da microflora não patogênica (Nagler-Anderson & Shi, 2001; Neutra et al., 2001).

A importância fisiológica da tolerância oral, que muitas vezes foi negligenciada, está sendo cada vez mais estabelecida. Assim, nos últimos anos, têm sido propostos vários mecanismos para explicar tal fenômeno.

2.8 Tolerância Oral

Embora não reconhecida como tal, a tolerância oral foi o primeiro fenômeno com bases imunológicas a aparecer na literatura após o relato de Jenner, em 1798, sobre a vacinação anti-variólica (Mowat, 1987).

Em 1829, Dakin relata como os índios norte-americanos evitavam as dermatites de contato causadas por uma planta sensibilizante do gênero *Rhus* (*poison ivy*). Eles davam de beber às suas crianças uma infusão da planta. A partir de 1909, surge uma nova série de artigos descrevendo a indução da tolerância oral a diversas proteínas derivadas do leite (Beresdka, 1909), do milho e do ovo (Wells, 1911).

Após um novo hiato de três décadas, surge o trabalho de Chase, em 1946, mostrando que a ingestão prévia de cloreto de picrila (dinitroclorobenzeno) evita a dermatite de contato pelo pincelamento da pele com este composto (Chase, 1946; Kraus et al, 2004).

No entanto, foi a partir do final da década de 70 que surgiu uma grande massa de trabalhos envolvendo a tolerância oral, desta vez utilizando vários antígenos e modelos animais como o cão (Cantor & Dumont, 1967), o porco (Bourne et al, 1975), a cobaia (Heppell & Kilshaw, 1982), o rato (Bazin & Plateau, 1976; Bazin & Plateau, 1977); e o camundongo (Hanson et al, 1977; Vaz et al, 1981; Guerra, 1991; Slavin et al, 2001).

É verdade que os alimentos são digeridos na sua maior parte às unidades estruturais de cada grupo (aminoácidos, ácidos graxos e monossacarídeos). No entanto, uma parcela biologicamente ativa das macromoléculas ingeridas é absorvida *in natura* pela mucosa, entrando em contato direto com os LIE e com as PP (Pappo et al, 1988). Encontram-se vários relatos na literatura mostrando que ocorre a absorção

de macromoléculas minutos ou até segundos após a sua ingestão, inclusive através da passagem para o feto ou para o lactente (Bruce & Ferguson, 1986; Bruce et al, 1987).

A rápida absorção de macromoléculas intactas para a circulação pode ser evidenciada clinicamente nas alergias alimentares, que podem se manifestar por sintomas generalizados, como urticárias, segundos após a ingestão do alimento alergênico. No laboratório, ela também pode ser facilmente comprovada por radioimunoensaio e outros métodos de detecção da presença de antígenos na circulação (Herremans et al, 1999 *apud* Teixeira, 2003).

Outras formas de hipersensibilidade, que não apenas a hipersensibilidade imediata, também estão envolvidas nas alergias alimentares como na doença celíaca e alergia ao leite, por exemplo. Nestas, a característica predominante é o infiltrado de linfócito T, levando a alterações de inflamação crônica com a secreção de citocinas e produção de IgG (Herremans et al, 1999 *apud* Teixeira, 2003).

2.8.1 Características do desenvolvimento e manutenção da tolerância oral

A tolerância induzida por via oral não é um fenômeno subtrativo; ou seja, não exige, necessariamente, a deleção dos clones reativos ao tolerógeno. Isto pode ser afirmado diante das seguintes observações:

1. A transferência adotiva da tolerância oral pode ser obtida pela transferência de linfócitos (Bruce et al, 1987);
2. Alguns dias após a indução de tolerância à OVA, por via oral, aparecem no baço precursores de células secretoras de imunoglobulinas anti-OVA, que alcançam níveis idênticos aos de animais inoculados (Titus & Chiller, 1981). No entanto, estas células não se expandem em clones secretoras de anticorpos. Esta é uma situação semelhante à da existência fisiológica de clones auto-reativos (precursores de células formadoras de auto-anticorpos), hoje amplamente reconhecidos (Klinman et al, 1988; Coutinho et al, 1992; Avrameas & Ternynck, 1995);
3. Tanto a tolerância quanto a inoculação podem advir da introdução do antígeno por via digestiva, na dependência do *status* imunológico, da dose,

freqüência e intervalo entre as exposições antigênicas (Peng et al, 1989; Faria et al, 1993);

4. Na tolerância oral, a supressão da formação de anticorpos parece ser isotipo específica (Suzuki et al, 1986; Kitamura et al, 1988), com uma redução da síntese de anticorpos dos isotipos IgG e IgE. A síntese de IgA pode ser afetada de forma diametralmente oposta. Às vezes, é induzida e outras vezes é inibida (Challacombe & Tomasi, 1983);
5. A digestão do antígeno e seu posterior processamento pelas células acessórias parece ter importância, uma vez que a indução da tolerância é dificultada pela administração de inibidores de enzimas proteolíticas (Bruce & Ferguson, 1986);
6. A transferência de soro de animais normais recém alimentados com OVA, é capaz de transferir a tolerância oral (Bruce & Ferguson, 1986);
7. A transferência adotiva de linfócitos $\gamma\delta$ intra-epiteliais de animais imunes para animais tolerantes é capaz de reverter a tolerância oral (Fujihashi et al, 1992; Fujihashi et al, 1996).
8. A exposição a antígenos orais induz, preferencialmente, um padrão de resposta Th2(IL-4/IL-10) ou Th3 (TGF- β) com propriedades supressoras sobre a resposta Th1 e outras células imunitárias. As células tipo Th3, aparentemente, são distintas das células Th2, uma vez que células CD4(+) secretoras de TGF- β com propriedades supressivas no trato gastrintestinal têm sido geradas em animais deficientes em IL-4 (Inobe et al, 1998; Baggi et al, 1999; Slavin et al, 2001).

Estes dados indicam, portanto, a operação de uma complexa rede de interações linfocitárias na indução e manutenção da tolerância oral. Estão incluídos nestas interações tanto células T com receptores $\alpha\beta$, como $\gamma\delta$ (Fujihashi et al, 1989; Fujihashi et al, 1990).

2.8.2 Regulação antígeno-específica

Embora os mecanismos que resultem na indução de hiporresponsividade sistêmica, após a introdução de um antígeno por via oral, ainda não estejam completamente esclarecidos, sabe-se que a dose do antígeno tem grande importância neste fenômeno (Friedman & Weiner, 1994). Por exemplo, doses baixas e repetitivas induzem uma supressão ativa caracterizada pela presença de células T regulatórias que incluem as células Th3 secretoras de TGF- β e as células Th1 secretoras de IL-10 (Groux, 2001; Carrier et al, 2007), enquanto que, uma dose única alta com frequência leva a hiporresponsividade sistêmica e local tanto da resposta humoral como celular por deleção clonal ou anergia dos clones específicos (Kraus et al, 2004).

Assim, a via fisiológica de contato com antígenos dietéticos, ao contrário das formas artificiais como tem sido estudada a tolerância oral, induzem respostas ativas com proliferação celular, baixa secreção de anticorpos antígeno específicos, além da regulação do micro ambiente local mediado através de citocinas, sem ativar os circuitos inflamatórios das respostas imunitárias clássicas. Esta conclusão pode ser inferida pela observação de que as principais citocinas envolvidas neste mecanismo são a TGF β e IL-10 (Teixeira, 2003).

Dada a multiplicidade das interações inter-linfocitárias, através de interações de grupo, idiotípicas ou idiopeptídicas, cada clone pode, em princípio, ser afetado por uma alteração funcional ou quantitativa de outro clone, alteração esta que se propagaria no sistema imunológico. Embora não se conheça o impacto e extensão de tais interações, estas devem contribuir de forma substancial para a seleção do repertório T e B, ou seja, determinar quais especificidades de regiões variáveis, e quantas de cada tipo estão presentes em um dado momento da vida do indivíduo. A topologia desta rede - qual linfócito interage com qual, e de que forma e qual seu fenótipo efetor (Th1, Th2, Th3, imunoregulador, etc.) - determinaria os estados de tolerância ou imunidade, em relação a antígenos, sejam estes próprios e/ou estranhos (Mayer & Shao, 2004).

É interessante notar que nas doenças auto-imunes observa-se uma perturbação do repertório T e B que é muito mais ampla do que se esperaria no caso de uma atividade restrita a um pequeno conjunto de clones auto-agressivos. Isto sugere que a quebra da tolerância e o conseqüente estabelecimento da auto-imunidade envolvem uma extensa modificação da homeostase do sistema imunológico, alterações estas que

não dizem respeito somente aos clones diretamente auto-reativos, mas a circuitos regulatórios pouco conhecidos. Seria, portanto, desejável que o desequilíbrio desta homeostase pudesse ser estudado através de uma análise global do repertório T e B, e com isso, fosse correlacionado o perfil do repertório com o estado funcional do sistema imunológico (tolerância, auto-agressão, resposta imune) (Mayer & Shao, 2004).

2.9 Alergia alimentar

Aproximadamente 20% da população altera a dieta em função de reações adversas a algum tipo de alimento. Estas podem ser desencadeadas pela variabilidade de antígenos aos quais as pessoas entram em contato diariamente, pela diversidade das respostas imunes a estes antígenos, por desordens metabólicas do indivíduo ou até mesmo toxicidade do alimento em questão (Sicherer & Sampson, 2006).

Em um encontro de especialistas (alergistas, dermatologistas, pediatras, clínicos gerais, pneumologistas e nutricionistas), ocorrido em Utrecht, em 1990, buscava-se o estabelecimento de um consenso sobre as hipersensibilidades alimentares, particularmente no que concerne aos mecanismos da doença, métodos diagnósticos e tratamento. Neste encontro não se chegou a uma conclusão em relação à nomenclatura que diz respeito a todos os mecanismos envolvidos na hipersensibilidade alimentar como, por exemplo, as manifestações extra-entéricas (de Monchy, 1991). No entanto, um ponto importante deste encontro, foi o estabelecimento do uso de termos como alergia e intolerância alimentar. Estas definições e/ou distinções estão enunciadas a seguir:

- ◆ Alergia alimentar

“Definida como manifestações adversas ao alimento, mediadas por mecanismos imunológicos”.

- ◆ Intolerância alimentar

“Definida como mecanismos não imunológicos das reações adversas ao alimento como, por exemplo, a ausência da síntese de lactase na intolerância ao leite”.

Tendo em vista a necessidade de se identificar os fatores desencadeadores das reações adversas, a Academia Européia de Alergologia e Imunologia Clínica (EAACI) estabeleceu, em 1995, uma classificação simples para as reações adversas aos alimentos, baseada nos seus mecanismos patogênicos (Figura 5) (Johansson, 2004).

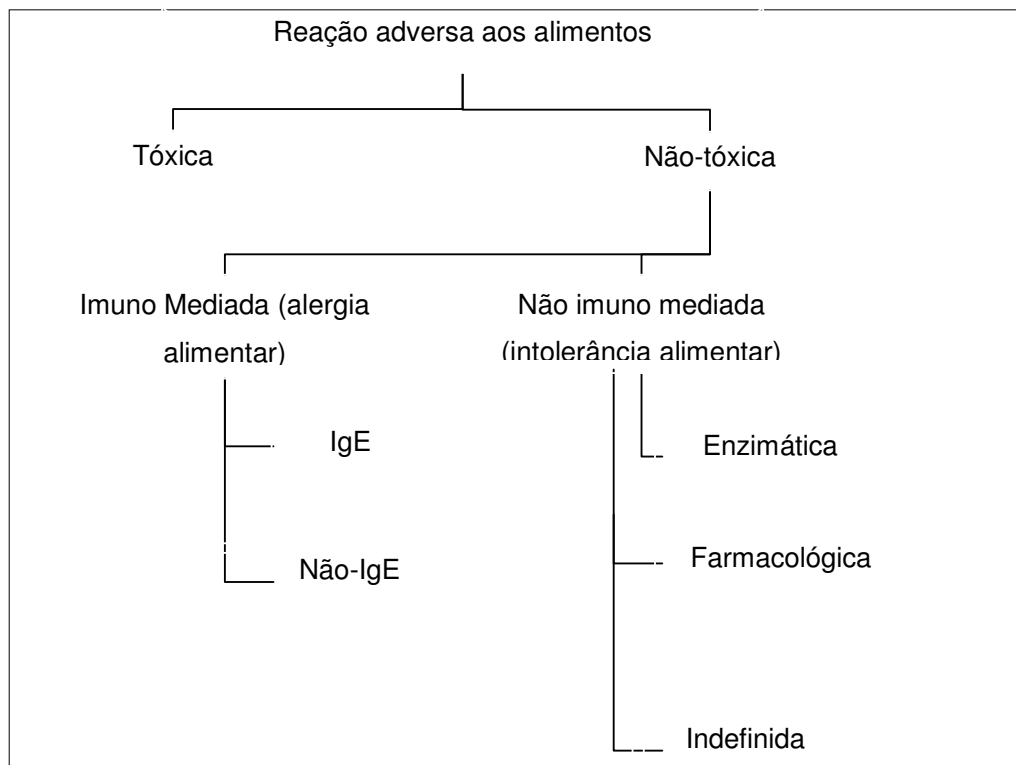


Figura 5. Fluxograma da classificação da EAACI de 1995 para reações adversas aos alimentos baseada nos mecanismos patogênicos. Fonte: Ortolani & Pastorello, 2006 (modificado).

A primeira distinção feita com relação à toxicidade dos alimentos resulta em um efeito nocivo observável em qualquer indivíduo (tóxico). Dois exemplos de efeitos tóxicos agudos são: contaminação bacteriana (a própria bactéria ou suas toxinas) e organofosforados. Como um exemplo de efeito tóxico crônico, podemos citar a contaminação alimentar com metais pesados - chumbo ou mercúrio. Do lado das reações não tóxicas, distinguem-se aquelas de ordem não imunológica (intolerância) ou imunológica (alergia alimentar) (Ortolani & Pastorello, 2006).

As reações adversas não imunológicas podem ser classificadas em:

- a) Enzimáticas - que na maioria dos casos é hereditária, como por exemplo, a intolerância a lactose (ausência da enzima específica);

- b) Farmacológicas - alguns indivíduos apresentam um limiar mais baixo ao contato com substâncias tais como a histamina, presentes em alguns alimentos (morango, vinho tinto);
- c) Indefinidas - aquelas intolerâncias que não se encaixam nas duas formas anteriores (Ortolani & Pastorello, 2006).

As reações adversas de ordem imunológica são, de um modo geral, respostas a proteínas e são classificadas em:

- a) Mediada por imunoglobulinas da classe IgE – a forma de alergia alimentar mais comum e mais estudada que pode apresentar desde sinais e sintomas dos mais leves (edema transitório), até reações graves que envolvem problemas na pele, nos tratos respiratório e gastrointestinal e no sistema cardiovascular (Ortolani & Pastorello, 2006);
- b) Não mediadas pela IgE - que consiste em mecanismos que envolvem outras classes de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), imunocomplexos ou células (Sicherer & Sampson, 2006).

2.9.1 Proteínas

As respostas alérgicas induzidas por certas proteínas em indivíduos suscetíveis já estão bem estudadas e estabelecidas. No entanto, a interação das proteínas com o sistema imune é bastante complexa e por isso torna difícil o entendimento de todos os seus mecanismos. É sugerido que algumas proteínas sejam mais alergênicas do que outras, porém ainda é um desafio para a ciência identificar as características que conferem às proteínas esse potencial alergênico (Huby et al, 2000). Entre as proteínas consideradas muito alergênicas estão aquelas derivadas do amendoim, oleaginosas de árvores (*tree nuts*), clara de ovo, leite, peixes, crustáceos, entre outras (Teixeira, 2003).

A sensibilização induzida pelo amendoim afeta uma parcela significativa da população, principalmente nos Estados Unidos, onde o consumo de amendoim é muito grande (Palmer & Burks, 2006). Por outro lado, para outras oleaginosas, como a castanha do Pará e a castanha de caju, poucos são os relatos de alergenicidade na literatura internacional. Em um levantamento bibliográfico, consultando o banco de

dados do *Pubmed*, no período de 1935 a 2007, foram encontradas as seguintes referências:

- *Cashew nut AND allergy* - 56 relatos envolvendo alergia a castanha de caju;
- *Brazil nut AND allergy* - 41 relatos envolvendo alergia a castanha do Pará;
- *Peanut AND allergy* – 873 relatos envolvendo a alergia ao amendoim;
- *Egg white AND allergy* – 1335 relatos envolvendo a alergia a clara do ovo.

Para o melhor entendimento da resposta imune aos antígenos protéicos, tais como o amendoim e a clara de ovo, é importante conhecer seus componentes alergênicos. Hoje já estão identificados oito alérgenos principais dentre a fração protéica do amendoim (*Arachis hypogaea*) (Ara h1 a Ara h8). Algumas pesquisas recentes na população americana mostram uma maior alergenidade de Ara h1 e Ara h2 (Palmer & Burks, 2006), enquanto que um estudo desenvolvido na Itália mostrou que Ara h3 é o antígeno principal na indução de alergias na população estudada (Restani et al, 2005).

2.10 Inflamação Intestinal: O Problema

A etiologia para a maioria das doenças inflamatórias intestinais (DII) é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, estímulos da microflora, fatores ambientais e possíveis anormalidades na imunidade sistêmica e da mucosa (Elson et al, 1998). Assim, um único agente ou um mecanismo isolado não parece ser suficiente para produzir ou desencadear a inflamação intestinal. Ainda que não existam evidências diretas, a quebra da tolerância oral pode contribuir de modo importante para o desenvolvimento e perpetuação das DII crônicas que iniciaram, muitas vezes, meses ou anos antes de seu diagnóstico (Mowat & Weiner, 1999).

As questões relativas à patogenia da DII foram exemplificadas na seguinte proposição: a atividade inflamatória recorrente e crônica da doença reflete uma resposta apropriada a um estímulo persistentemente anormal (por exemplo, alteração estrutural do intestino ou agente causal no meio ambiente) ou uma resposta anormalmente prolongada a um estímulo normal (Figura 6) (Peakman & Vergani, 1999).

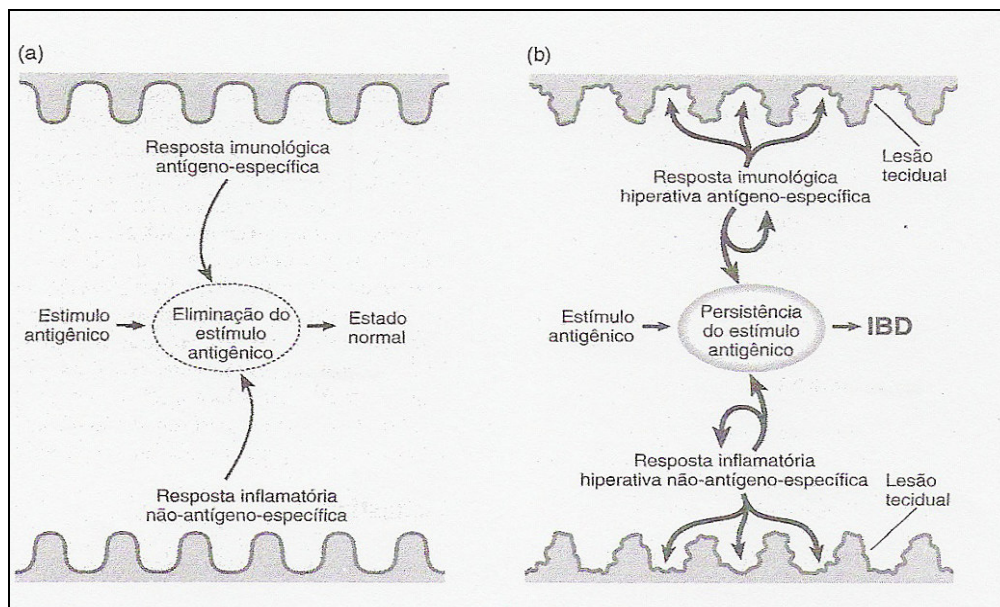


Figura 6. Possíveis mecanismos que levam ao desenvolvimento da DII. No intestino normal (a), um estímulo antigênico intraluminal é tratado pela ação combinada das respostas imunológicas antígeno-específicas e reações inflamatórias, reguladas de modo negativo após a eliminação do estímulo; na DII (b), o estímulo persiste (infecção crônica) ou ocorre a perda da regulação das respostas imunológicas e inflamatórias. Em ambos os casos, o resultado consiste numa resposta imunológica persistentemente intensificada, que provoca a lesão tecidual. Fonte: Peakman & Vergani, 1999.

As inflamações intestinais crônicas podem ser classificadas em um sentido amplo como: retocolite ulcerativa (RU), doença de Crohn (DC), enteropatias com perda protéica (*protein losing enteropathies*), doença celíaca, alergias alimentares e outras enteropatias mediadas imunologicamente (Teixeira, 2003). Uma outra classificação, mais restrita, ressalta apenas duas doenças: a DC e a RU. Ambas resultam em sintomas constantes ou recorrentes incluindo diarreia, dor, diminuição do apetite, perda de peso e retardo de crescimento. Estas doenças manifestam-se durante a infância ou adolescência em 20-25% dos pacientes. A incidência destas DII varia mundialmente, apresentando uma baixa incidência nos países asiáticos e mediterrâneos e uma alta incidência, abrangendo de 0,3% a 0,8% da população no nordeste da Europa, Escandinávia, Nova Zelândia e Estados Unidos (Nicholas et al., 2007).

Tendo em vista que as DC e RU são multifatoriais, mediadas imunologicamente, e, além do mais, podem ser classificadas em várias entidades, utilizamos neste trabalho, a classificação mais ampla das inflamações intestinais crônicas.

Além das alterações no padrão de resposta local dos linfócitos T e B da mucosa intestinal, ou até em função destas, observa-se também uma mudança na população de macrófagos que são importantes na resposta inflamatória imune e de reparo do tecido. Na mucosa intestinal normal, principalmente na *lamina propria* e nas PP, existe uma grande população de macrófagos. Estes representam a principal população de APC capazes de determinar o tipo de resposta celular mediada pelas células T para os antígenos luminiais (Allison et al, 1988).

Não é fácil induzir uma resposta inflamatória em macrófagos intestinais normais residentes da mucosa, pois estes não liberam a IL-1 madura, mas sim uma forma inativa desta (Allison et al, 1988). Esta incapacidade se deve ao fato destes macrófagos expressar apenas a forma inativa da enzima conversora da interleucina (ICE – *Interleukin Converting Enzyme*), mesmo quando estimulados por LPS - um potente ativador destas células. Ao contrário, no processo ativo da inflamação intestinal crônica, a população de macrófagos presentes na mucosa é, na sua maioria, derivada do sangue periférico que, quando estimulados pelo LPS, expressam tanto o precursor quanto a forma ativa da enzima conversora (ICE) e, portanto da IL-1. Isto sugere que a indução do processo inflamatório intestinal depende diretamente de macrófagos derivados de monócitos circulantes e não das populações de macrófagos residentes (Mahida, 2000).

Além disso, os macrófagos recrutados do sangue periférico são fenotipicamente diferentes da população residente da mucosa. Em pacientes com DC e RU, estes macrófagos são capazes de secretar, além da IL-1, muitas outras interleucinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF- α), além de metabólitos reativos do oxigênio e do nitrogênio, que degradam a matriz extracelular. Por outro lado, os macrófagos também são importantes no processo de cicatrização e reparo que ocorrem durante a fase de remissão da doença (Mahida, 2000).

Além dos macrófagos, os neutrófilos, mastócitos e eosinófilos também podem ter um papel importante na patogenia da inflamação intestinal. Entretanto, o papel dessas células ainda não foi completamente elucidado (Madara et al, 1991; Kucharzik et al, 2001).

O número aumentado de mastócitos e eosinófilos na mucosa inflamada está correlacionado à manutenção da resposta inflamatória local, uma vez que liberam

mediadores pró-inflamatórios como a histamina, metabólitos do ácido araquidônico e enzimas proteolíticas (Resnick et al, 1993). Araki e colaboradores (2000) mostraram que animais deficientes de mastócitos apresentam uma forma muito mais branda da colite induzida por uma Dextrana de Sulfato de Sódio - DSS (*dextran sulphate sodium*) (Araki et al, 2000).

As prostaglandinas e os leucotrienos, mediadores lipídicos do processo inflamatório, são sintetizados a partir do ácido araquidônico. Seus efeitos metabólicos incluem a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e a quimiotaxia para neutrófilos (Newberry et al, 1999).

A síntese de mediadores pró-inflamatórios a partir do ácido araquidônico e a importância de determinados substratos metabólicos no restabelecimento dos danos teciduais da mucosa, causados pela inflamação intestinal crônica, indicam a utilização de nutrientes específicos como uma possível terapia exclusiva, ou adjuvante, na resolução da inflamação intestinal crônica (Newberry et al, 1999).

A inflamação intestinal crônica provoca destruição das vilosidades, hiperplasia das criptas e infiltrado inflamatório na *lamina propria*. Optamos por mostrar, esquematicamente (figura 7), uma classificação para as alterações da mucosa intestinal, proposta por Marsh (Marsh, 1995).

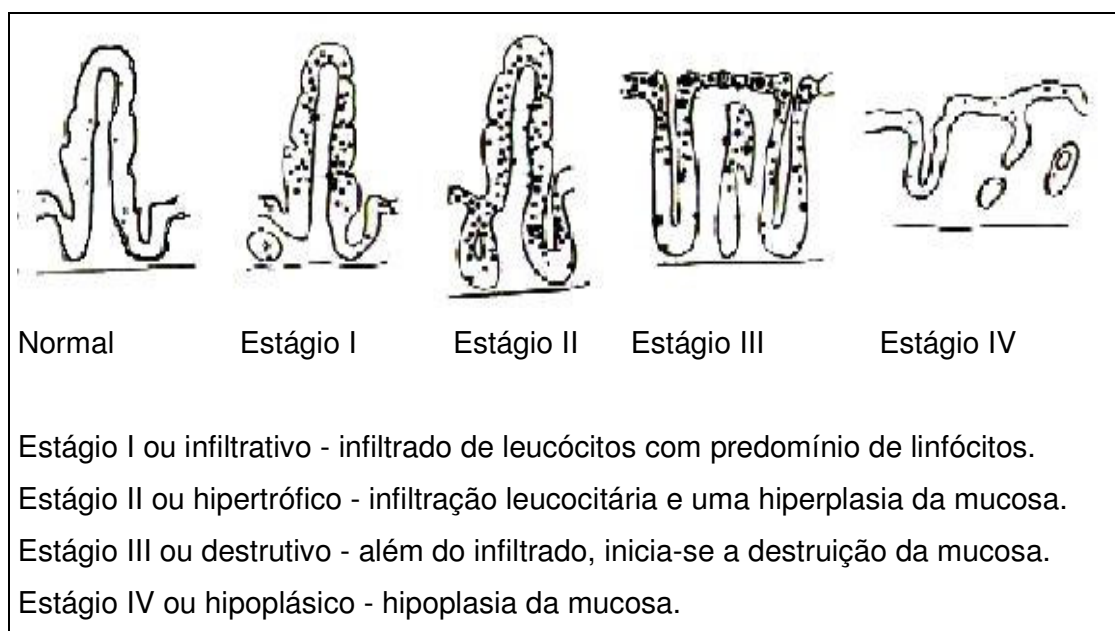


Figura 7. Desenho esquemático das principais alterações observadas em diferentes estágios da inflamação intestinal crônica. Adaptação de Marsh, 1995.

2.11 Modelos animais

Vários modelos têm sido desenvolvidos para o estudo dos mecanismos envolvidos nas DII buscando o entendimento destas entidades em humanos e animais domésticos. Embora nenhuns dos modelos animais atuais tenham reproduzido completamente a DII humana, os modelos animais de inflamação intestinal têm providenciado conhecimentos úteis em relação à patogênese da resposta inflamatória intestinal. Esses modelos animais têm se referido à ocorrência espontânea ou induzida da doença. Modelos induzidos de DII incluem (i) animais que foram tratados com agentes que promovem inflamação intestinal, (ii) roedores que foram manipulados geneticamente por marcadores de genes ou pela introdução de transgenes, e (iii) animais imunodeficientes em que as populações celulares que medeiam a inflamação intestinal foram transferidas (Hendrickson et al., 2002). A tabela 1 cita alguns exemplos de modelos animais de DII descritos.

Tabela 1. Exemplos de modelos animais de DII.

Ocorrência espontânea

Linhagem de camundongo C3H/HeJBir

Linhagem de camundongo SAMP1/Yit

Tratamento com agentes que provocam injúria na mucosa

Enemas de ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS)

Administração de dextrana de sulfato de sódio (DSS)

Alteração da função das citocinas

Camundongo *knockout* IL-10

Camundongo *knockout* IL-2

Camundongo TNF Δ ARE

Camundongo transgênico STAT-4

Alteração da função da célula T

Camundongo *knockout* com receptor α para célula T

Camundongo *knockout* com receptor β para célula T

Rato transgênico HLA-B27

Transferência de células de camundongo CD4⁺ CD45RB^{hi} para SCID ou Rag^{-/-}

Desregulação da função da barreira epitelial

Camundongo mutante com gene multi-drogas resistente

Camundongo *knockout* com fator *trefoil* intestinal

Fonte: Hendrickson et al., 2002.

Nos últimos anos, a geração de animais manipulados geneticamente através da deleção, inserção e/ou alteração de genes específicos levou à geração inesperada de linhagens de roedores que desenvolvem a inflamação intestinal crônica espontânea. Embora nenhuma destas linhagens geneticamente modificadas reproduza fielmente todas as alterações histopatológicas e clínicas associadas às formas humana das DII crônicas, muitas exibem aspectos fundamentais que compõem o desenvolvimento espontâneo destas enfermidades (Hendrickson et al., 2002).

Os modelos experimentais são promissores, uma vez que permitem dissecar os vários constituintes do epitélio intestinal e da resposta imune da mucosa, necessária tanto para a manutenção da homeostasia como para a sua quebra e, conseqüente, inflamação intestinal crônica.

Também têm surgido muitos modelos animais para o estudo da alergia alimentar, entendida classicamente como reação mediada pela IgE. Nos modelos animais descritos na literatura, os aspectos histológicos do trato gastrintestinal não são o foco de atenção principal, como revisto por Helm (2002). Os principais animais utilizados nestes modelos são cobaias, camundongos, ratos, cães atópicos e porcos recém-natos. Geralmente, têm se procurado nestes modelos a produção de IgE, resposta clínica à re-exposição antigênica e a classificação por ranqueamento da alergenicidade dos alimentos, incluindo fontes protéicas não dietéticas (Helm, 2002).

O modelo murino de inflamação intestinal crônica desenvolvido por Teixeira (2003) avalia os processos inflamatórios crônicos desencadeados por proteínas dietéticas oferecidas de forma fisiológica (via oral). Neles, não se observa uma resposta Th2 típica como descrito para a maioria dos modelos de alergia alimentar, mas uma resposta que sugere o padrão Th1 (Teixeira, 2003). A proteína alergênica utilizada neste modelo é o amendoim (*Arachis hypogea*), que pode ser consumido por roedores em condições naturais, não faz parte da composição da ração utilizada para a manutenção dos camundongos utilizados, é uma semente de baixo custo e de fácil obtenção (Teixeira, 1995; Teixeira et al., 2007). Além disso, o amendoim é uma semente considerada como um dos alimentos que mais freqüentemente levam a respostas alérgicas em humanos (Burks et al., 1995). Em nossa revisão não encontramos modelos experimentais de alergia alimentar com respostas tipicamente Th1. Em humanos, algumas formas de intolerância ao glúten, à caseína e outras

proteínas alimentares são mediadas por respostas tipo Th1, reforçando desta forma a importância deste modelo experimental.

2.12 Inflamação intestinal crônica e a má-absorção de nutrientes

A literatura médica enfatiza a relação existente entre as DII e os processos relacionados à má absorção e perda de peso corporal, em que o comprometimento intestinal provoca alterações de absorção de nutrientes (glicídios, lipídios e proteínas) em diferentes graus. A má absorção entérica pode estar presente em uma variedade de condições clínicas, podendo ser resultante da competição bacteriana ou da flora intestinal alterada, de alterações funcionais da mucosa do intestino delgado, da obstrução do fluxo linfático ou de doenças que afetam a mucosa do intestino delgado, como os diferentes tipos de inflamação que a atingem (Kao et al., 1999).

Clinicamente se sabe que a permanência prolongada de tais alterações se reflete, posteriormente, em prejuízos para o organismo. O prejuízo na absorção de aminoácidos influi num mesmo teor de proteínas orgânicas com reflexos gerais, tais como, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, anemia e baixo título de anticorpos plasmáticos.

A má-absorção de açúcares pode ocorrer sob diversas circunstâncias, decorrente de mudanças adaptativas na função do intestino delgado, como as que ocorrem nas DII, como nos casos de DC e RU (Thomson & Wild, 1997).

Indiretamente, a má-absorção pode ser causada pela redução na área de digestão da superfície intestinal, por exemplo, na síndrome do intestino curto ou doenças de inclusão em microvilos, num aumento da motilidade intestinal, ou em defeitos nos processos digestivos, como por exemplo, na insuficiência pancreática ou hipolactasia (Wright et al., 2003).

2.12.1 Avaliação da absorção de glicídios através do teste da D-xilose

Danos nos enterócitos, causados pela ativação de células T e liberação de citocinas, podem levar à má-absorção de monossacarídios e ao aumento da permeabilidade duodenal. Enquanto a má-absorção pode contribuir para a perda de

peso e desnutrição, o aumento da permeabilidade intestinal pode provocar uma enteropatia inflamatória (Sharpstone et al., 1999). Dentro dos quadros de inflamação intestinal observamos alterações importantes na absorção de açúcares. Assim, investigações não-invasivas da função intestinal são úteis para monitorar as modificações sofridas pelos pacientes.

Há diversos testes que podem ser realizados para avaliar a alteração de absorção de carboidratos, tais como o 51 Cr EDTA, lactose, rhamnose e manitol (Howden et al., 1991; Barboza Jr et al., 1999; Tibble & Bjarnason, 2001), porém estes testes são complexos.

O teste da D-xilose é atualmente a mais confiável medida quantitativa da função absorptiva intestinal, sendo um teste simples e barato, usado há quase 60 anos (Roe & Rice, 1948; Eberts et al., 1979). Vários estudos recentes têm utilizado a absorção da D-xilose como ferramenta investigativa da função duodenal em diferentes cursos clínicos, como na infecção pelo HIV (Perin et al., 2001) e DII.

A D-xilose é uma pentose encontrada naturalmente nas plantas e sua metabolização incompleta permite o uso como teste absorptivo (Craig & Ehrenpreis, 1999), sendo um método simples e barato (Ehrenpreis et al., 2001). É absorvida no duodeno e no jejuno; sua absorção é semelhante à de glicídios, já que é estimulado pelo transporte de íons sódio. Ela pode ser dosada na urina ou soro, porém a maioria dos estudos parece ser mais favoráveis ao teste sérico do que ao de excreção urinária para triagem de pacientes adultos e pediátricos para má-absorção intestinal, pois pode sofrer interferências como hidratação inadequada, alteração do *clearance* renal, tempo de coleta, dentre outras (Craig & Atkinson, 1988). Em humanos, há também o teste de D-xilose avaliado através de níveis de H₂ expelidos na respiração após sua ingestão, sendo um teste útil no diagnóstico da má-absorção intestinal tanto em adultos quanto em crianças. O princípio deste teste consiste no fato de que, quando a integridade da mucosa duodenal apresenta um distúrbio, quantidades elevadas de D-xilose administradas oralmente irão alcançar o cólon e serão fermentadas pela flora local, produzindo taxas excessivas de excreção de H₂ pela respiração (Casellas et al., 2000; Rana et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a absorção intestinal de D-xilose no modelo experimental de inflamação intestinal crônica antígeno-específica.

3.2 Específicos

- Reproduzir o modelo murino de inflamação intestinal crônica antígeno-específica, desenvolvido para camundongos, em ratos;
- Padronizar a técnica da D-xilose sérica, adaptada para camundongo, no modelo de alergia alimentar em ratos;
- Avaliar a inflamação intestinal crônica através de parâmetros, como:
 - A evolução do peso corporal;
 - A titulação de anticorpos IgG total anti-proteína de amendoim;
 - Os aspectos histológicos da mucosa intestinal;
 - Absorção intestinal da D-xilose.
- Correlacionar os achados referentes à absorção intestinal da D-xilose com os achados sorológicos e histológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos isogênicos adultos, machos, da linhagem Lou-M, criados e mantidos no Núcleo de Animais de Laboratório – Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inox e sobre cama (maravalha) esterilizada pelo calor. A temperatura ficou em torno de 25°C, controlada por exaustores, assim como a purificação do ar.

Inicialmente, os animais foram divididos em três grupos controle - Normal Ração (NR), Normal Amendoim (NA), Imune Ração (IR) e um grupo experimental - Imune Amendoim (IA). A constituição de cada grupo será detalhada na seção abaixo.

4.2 Protocolos Experimentais

4.2.1 Protocolo experimental I – Experimento piloto para indução da inflamação

4.2.1.1 Objetivo

Reproduzir o modelo murino de inflamação intestinal crônica antígeno-específica em ratos, além de avaliar e comparar o consumo, o peso corporal e a sorologia entre os grupos do experimento.

Quadro 1. Protocolo experimental I

Grupos		Imunização Primária (sc)		Imunização Secundária (sc)		Dieta Desafio
Imune Ração (IR)	SANGRIA ZERO – plexo retroribal - 1ml	Extrato protéico de amendoim + Al(OH) ₃	SANGRIA PÓS – PRIMÁRIA - plexo retroribal - 1ml	Extrato protéico de amendoim	SANGRIA PÓS – SECUNDÁRIA - plexo retroribal - 1ml	Ração <i>ad libitum</i>
Imune Amendoim (IA)						Amendoim <i>in natura ad libitum</i>
Normal Ração (NR)		Salina+ Al(OH) ₃		Salina		Ração <i>ad libitum</i>
Normal Amendoim (NA)						Amendoim <i>in natura ad libitum</i>
SANGRIA PÓS – 1ª SEMANA DE DIETA, AV. DO CONSUMO E PESO CORPORAL						
SANGRIA PÓS – 2ª SEMANA DE DIETA, AV. DO CONSUMO E PESO CORPORAL						
SANGRIA PÓS – 3ª SEMANA DE DIETA, AV. DO CONSUMO E PESO CORPORAL						
SANGRIA PÓS – 4ª SEMANA DE DIETA, AV. DO CONSUMO E PESO CORPORAL						

4.2.1.2 Descrição do Protocolo

Ratos Lou-M machos adultos (8-12 semanas) foram divididos em 4 grupos (n=40), denominados de acordo com o protocolo de inoculação e com a dieta que receberam no período de exposição à dieta desafio:

- Imune Ração (IR): animais submetidos à inoculação (sc) contendo extrato protéico de amendoim e que receberam ração comercial *ad libitum* no cocho de suas gaiolas durante o período de dieta desafio (por 4 semanas); este grupo foi criado como controle do grupo Imune Amendoim, para verificar se o fato destes ratos terem recebido a inoculação com amendoim e não terem se alimentado com a mesma proteína, iriam desenvolver alergia e conseqüentemente inflamação intestinal.
- Imune Amendoim (IA): animais submetidos à inoculação (sc) contendo extrato protéico de amendoim e que receberam semente de amendoim *in natura ad libitum* no cocho de suas gaiolas durante o período de dieta desafio

(4 semanas); consiste no grupo experimental que foi criado para desenvolver alergia à proteína de amendoim e conseqüentemente, inflamação intestinal crônica.

- Normal Ração (NR): animais submetidos à inoculação (sc) contendo solução salina e que receberam ração comercial *ad libitum* no cocho de suas gaiolas durante o período de dieta desafio (4 semanas); consiste no grupo controle normal do experimento.
- Normal Amendoim (NA): animais submetidos à inoculação (sc) contendo solução salina e que receberam semente de amendoim *in natura ad libitum* no cocho de suas gaiolas durante o período de dieta desafio (4 semanas); este grupo foi criado para verificar se o fato destes ratos terem recebido a inoculação com salina e terem se alimentado com a semente de amendoim, iriam desenvolver alergia e conseqüentemente, inflamação intestinal.

Durante o período de quatro semanas após a inoculação secundária, avaliamos o consumo de ração e de semente de amendoim diariamente dos grupos e, semanalmente, todos os ratos foram pesados e sangrados, para avaliação clínica e sorológica respectivamente.

4.2.2 Protocolo experimental II – Indução da inflamação intestinal crônica e estudo do metabolismo de açúcares

4.2.2.1 Objetivo

Indução da inflamação intestinal crônica dos ratos para avaliar os aspectos histológicos da mucosa intestinal e padronizar a técnica da D-xilose sérica para avaliar o metabolismo de carboidratos dos animais controle (NR) e experimental (IA). Correlacionar os parâmetros utilizados para diagnóstico da inflamação intestinal crônica com o teste de absorção da D-xilose.

Quadro 2. Protocolo experimental II

Grupos		Imunização Primária (sc)		Imunização Secundária (sc)		Dieta Desafio
Experimental (IA)	SANGRIA ZERO – plexo retrorbital - 1ml	Extrato protéico de amendoim + Al(OH) ₃	SANGRIA PÓS – PRIMÁRIA - plexo retrorbital - 1ml	Extrato protéico de amendoim	SANGRIA PÓS – SECUNDÁRIA - plexo retrorbital - 1ml	Amendoim <i>in natura ad libitum</i>
Controle (NR)		Salina+ Al(OH) ₃		Salina		Ração <i>ad libitum</i>
SANGRIA PÓS – 1ª SEMANA DE DIETA E PESO CORPORAL						
SANGRIA PÓS – 2ª SEMANA DE DIETA E PESO CORPORAL						
SANGRIA PÓS – 3ª SEMANA DE DIETA E PESO CORPORAL						
SANGRIA PÓS – 4ª SEMANA DE DIETA E PESO CORPORAL						
GAVAGEM DA SOLUÇÃO DE D-XILOSE E SANGRIA						
DOSAGEM DA D-XILOSE						
MORTE – Retirada dos segmentos para a histologia						

4.2.2.2 Descrição do protocolo

Ratos Lou-M machos adultos (8-12 semanas) foram divididos em 2 grupos: Grupo Controle, equivalente ao Normal Ração (NR) e o Grupo Experimental, equivalente ao grupo Imune Amendoim (IA). Depois de terem sido submetidos aos respectivos procedimentos do protocolo anterior até a etapa de exposição à dieta desafio, cada animal foi submetido a uma gavagem intragástrica contendo solução de D-xilose. Em seguida, foram sangrados para a determinação da absorção de D-xilose, através da quantificação deste açúcar no soro. Foi realizada a eutanásia de todos os ratos para o procedimento de retirada de segmentos intestinais e a realização da técnica de histologia.

4.3 Dietas

4.3.1 Ração comercial

Foi fornecida uma ração balanceada (NUVILAB-NUVITAL®) *ad libitum* a todos os animais antes do período de dieta desafio e durante este período, foi fornecida somente aos grupos NR e IR. Esta ração é composta de: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico e aminoácidos.

4.3.2 Amendoim

Utilizamos como dieta desafio para a indução da alergia alimentar, e conseqüentemente, para indução da inflamação intestinal, sementes de amendoim *in natura*, oferecido no coxo da gaiola de forma exclusiva. Esta dieta foi imposta aos animais dos grupos NA e IA por um período de 30 dias após a segunda inoculação.

4.3.3 Comparação da distribuição de macronutrientes da ração e do amendoim

A distribuição de macronutrientes, assim como a distribuição de vitaminas e aminoácidos da ração e do amendoim, encontra-se descrita nas tabelas abaixo.

Tabela 2. Distribuição dos macronutrientes.

Ração Comercial		Amendoim	
Componente	%	Componentes	%
Umidade	12,5	Umidade	11,00
Proteína bruta	22,0	Proteína bruta	29,31
Carboidratos	43,5	Carboidratos	5,94
Extrato etéreo	4,0	Extrato etéreo	48,75
Material mineral	10,0	Material mineral	2,40
Matéria fibrosa	8,0	Matéria fibrosa	2,60
Calorias	298 Kcal	Calorias	579,7 Kcal

Fonte: FRANCO, 1982.

Tabela 3. Distribuição de vitaminas e aminoácidos.

Ração		Amendoim	
Componente	Concentração	Componente	Concentração
Vit A	12.000 UI	Vit A	3,0 mcg
Vit. D3	1.800 UI	Vit. D3	Nd
Vit K	3,00 mg	Vit K	Nd
Vit B1	5,00 mg	Vit B1	910,0 mcg
Vit B12	20,00 mg	Vit B12	0,1 mcg
Niacina	60,00 mg	Niacina	17,6mg
Ac. pantotênico	20mg	Ac. pantotênico	Nd
Biotina	0,05 mg	Biotina	0,039ng
Colina	60,00 mg	Colina	Nd
DL - metionina	300mg	DL - metionina	0,43
Lisina	100mg	Lisina	1,56
Ferro	50,00 mg	Ferro	4 mg
Zinco	60,00 mg	Zinco	6 mg
Cobre	10,00 mg	Cobre	0,90 mg
Iodo	2,00 mg	Iodo	Nd
Manganês	60,00 mg	Manganês	Nd
Selênio	0,05 mg	Selênio	Nd
Cobalto	1,50 mg	Cobalto	Nd

Fonte: FRANCO, 1982.

4.4 Extração de proteínas do amendoim

4.4.1 Procedimento de extração

A obtenção de extratos de amendoim foi realizada pela metodologia desenvolvida para extração de proteínas do milho na Embrapa - Sete Lagoas, M.G, modificação da técnica descrita por Landry (Teixeira, 2003).

De forma sintética, as sementes foram descascadas e moídas em moedor elétrico, tipo de café. O material resultante foi colocado em tubo de 15mL e suspenso em tampão de extração alcalino na proporção de uma parte do material para dez de tampão. O tubo foi agitado delicadamente por inversão durante 30 minutos, à

temperatura ambiente. A seguir, o material foi centrifugado por 30 minutos, a 5°C, 3000 rpm, e o sobrenadante recolhido. Foram realizadas, além desta extração, outras duas com a utilização de um tampão ácido e outro neutro. A concentração de proteínas foi determinada pela técnica de Lowry (Lowry et al, 1951).

4.4.2 Dosagem de proteína obtida nos extratos de amendoim

Resumidamente, a partir da amostra titulada de BSA (1mg/mL) foram feitas 4 diluições de cada amostra de extrato protéico de amendoim. Uma vez que as amostras foram diluídas, acrescentamos o reativo 1 aos tubos e esperamos a reação por 10 minutos. O reativo de Folin-Ciocalteu foi diluído e acrescentado às amostras após os 10 minutos da reação anterior. Após esta última etapa, esperamos por mais 50 minutos para que as amostras obtivessem coloração proporcional ao seu conteúdo de proteína.

Após os 50 minutos de reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 500nm. Cada amostra foi lida duas vezes e foi retirada a média das leituras de cada tubo. Estabelecemos a equação da reta e o valor de R^2 , a partir do qual foi calculada a concentração de proteína das amostras.

Os procedimentos de preparo de reagentes e diluição dos extratos e amostras encontram-se em anexo.

4.5 Inoculações: extrato bruto de amendoim e salina

As inoculações foram realizadas por via subcutânea (sc). Na inoculação primária, cada animal dos grupos Imune Amendoim e Ração recebeu 200µg de extrato protéico de amendoim, mais 5mg de hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$ - adjuvante) em solução salina q.s.p no volume final de 1mL, enquanto que cada animal dos grupos Normal Ração e Normal Amendoim recebeu uma inoculação composta somente por solução salina mais 5mg de adjuvante, num volume final de 1mL.

Após um intervalo de 28 dias, os animais dos grupos Imunes Amendoim e Ração receberam a inoculação secundária (sc) com 200µg de extrato protéico de amendoim em solução salina q.s.p no volume final de 1mL, sem adjuvante, enquanto que os animais dos grupos Normais Ração e Amendoim receberam novamente uma inoculação com salina num mesmo volume final, sem adjuvante.

4.6 Sangrias

Foram retirados 1mL de sangue do plexo retro-orbitário de todos os animais antes de qualquer manipulação e após qualquer exposição aos antígenos, quer por via oral ou por via parenteral. Após a retração dos coágulos, as amostras de sangue foram centrifugadas, os soros recolhidos e, em seguida, guardados a -20°C até serem analisados.

4.7 Determinação do consumo diário de alimento

Os componentes da dieta (amendoim ou ração) foram pesados e colocados nos cochos das gaiolas a cada manhã. Após 24h de consumo *ad libitum*, o alimento restante de cada gaiola foi separado e pesado. O consumo foi avaliado dividindo-se a diferença entre o peso oferecido e o recolhido pelo peso corporal total dos animais do grupo e expresso como miligrama de alimento por grama de peso corporal (mg/gpc).

$$\text{CONSUMO (mg)} = \left[\frac{\text{peso oferecido (g)} - \text{peso recolhido em 24h(g)}}{\text{Peso corporal total do grupo (g)}} \right] \times 1.000$$

O consumo diário foi expresso em (mg) no sentido de melhorar a visualização dos resultados.

A partir da avaliação do consumo diário de alimento, avaliamos o consumo diário de calorias por grama de peso corporal de cada grupo. O cálculo de calorias ingeridas foi realizado através da multiplicação do valor do consumo em gramas do alimento pela quantidade de calorias contidas neste mesmo alimento.

4.8 Peso dos animais

Os animais foram pesados antes e durante ao período de dieta desafio, semanalmente, em balança digital com duas casas decimais da marca Plenna[®].

4.9 Avaliação dos níveis de IgG anti-proteínas do Amendoim

Para a quantificação dos níveis de anticorpos (Ac) IgG total anti-proteínas da semente do amendoim, foi utilizada a técnica de ELISA. Placas de microtitulação foram cobertas com 10 μ g de extrato protéico de amendoim em 100 μ L de tampão PBS por poço e incubadas durante 12 - 18 horas, a 4°C. Em seguida, foram lavadas duas vezes com uma solução de PBS-Tween 0,05% e cobertas com PBS-gelatina durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Após este período, as placas foram esgotadas e incubadas por 1h com os soros a serem testados. Para isto, foram adicionados 20 μ L de soro diluído a 1:10 em 180 μ L de PBS-gelatina na primeira fileira e, em seguida, feita a diluição seriada obtendo-se uma diluição final de 1:12000.

Terminado o período de incubação, cada placa foi lavada seis vezes com PBS-Tween, e em seguida, foi adicionado o Ac IgG de cabra anticadeia γ e β de rato, conjugado com peroxidase. Após novo período de incubação de 1h, a 37°C, as placas foram lavadas como na etapa anterior e, em seguida, foi adicionado 100 μ L da solução do substrato (OPD - 4mg, H₂O₂ - 4 μ L, em 10mL de tampão citrato fosfato).

A reação foi interrompida após 20 minutos com uma solução 0,1M de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A medida das densidades ópticas foi realizada em um leitor de ELISA (Anthos-2010), utilizando um comprimento de onda de 492nm.

A análise dos resultados foi realizada pela comparação do somatório das densidades ópticas de cada soro, denominado de ELISA*. A sorologia foi avaliada pelo método do ELISA a partir dos soros recolhidos das sangrias feitas nas diversas etapas dos experimentos.

4.10 Teste de absorção de carboidratos – Dosagem da D-xilose sérica

4.10.1 Padronização da técnica de absorção de D-xilose em ratos normais e determinação da curva-padrão

Para a dosagem da D-xilose, utilizamos o reagente floroglucinol (VETEC), Ácido acético glacial (Merck), ácido clorídrico fumegante (Merck) e a D-xilose (VETEC). Utilizamos a técnica descrita por Eberts e cols. (1979), padronizando-a para ratos.

Assim, submetemos cinco animais normais, sem manipulação anterior, a um jejum por 12h. Após este período, todos os animais foram sangrados para obter um controle.

A técnica, em resumo consistiu em:

1. Preparo do reagente indicador:
 - Foi pesado 0,5g de fluoroglucinol, acrescentado a 10ml de ácido clorídrico fumante (HCl) e completado para 100ml com ácido acético.
2. Preparo da solução de D-xilose (padrão):
 - Foram diluídos 18,5g de D-xilose em 30ml de água destilada.
 - Para a confecção da curva padrão, realizamos diluições seriadas 1:2 da solução padrão de D-xilose 62% (ou seja, foi retirado 100µl e adicionado a 100µl de água destilada) por 9 diluições, atingindo uma diluição final de 0,0027mg de D-xilose. Estabelecemos 60µl para 2ml de solução indicadora de cor, logo, a solução padrão no primeiro tubo, possuiu, 2mg de D-xilose.
3. Após o preparo das soluções, os ratos foram sangrados para a coleta do soro pós-jejum e depois, foi realizada a gavagem da solução: cada animal recebeu uma gavagem estomacal de 2ml contendo uma solução de D-xilose a 62%, o equivalente à ingestão de 1,23g D-xilose. A seguir, realizamos as sangrias pelo plexo retroorbital na 1^a, 2^a, 3^a e 4^a horas pós-gavagem.
4. Após a coleta do soro dos animais, os tubos para análise por espectrofotômetro foram preparados:
 - Tubo Branco:
 - Consistiu na mistura de 60µl de água destilada em 2ml do reagente de cor.
 - Tubos para curva-padrão:
 - Consistiu na mistura de 60µl da solução padrão no primeiro tubo em 2ml do reagente de cor – a seguir, foi realizado uma diluição seriada em 9 tubos, como descrito no segundo item.
 - Tubos contendo os soros a serem testados:

- Consistiu em 60µl de soro de cada amostra em tubos com 2ml de indicador.
- 5. Todos os tubos foram aquecidos em banho-maria até atingir 100°C, por 4 minutos. Depois, esfriados à temperatura ambiente.
- 6. Os tubos foram lidos em espectrofotômetro (Pelkin Elmer), num comprimento de onda de 554nm.

4.10.2 Uso da técnica de D-xilose para avaliação dos animais do experimento

Após a padronização desta técnica em animais normais, repetimos o mesmo procedimento descrito acima nos animais pertencentes ao experimento, de acordo com o protocolo, que será descrito mais adiante, no item 4.13.2.

Em resumo, os procedimentos realizados nestes animais:

- Jejum dos animais por 12h;
- Sangria pós-jejum dos animais;
- Gavagem estomacal da solução de D-xilose a 62%;
- Sangrias na 1ª e 3ª hora pós-gavagem;
- Soro centrifugado, recolhido e armazenado a -20°C até a análise;
- Preparo dos tubos para análise;
- Aquecimento de todos os tubos até atingir 100°C por 4 minutos;
- Leitura de todos os tubos em espectrofotômetro, em 554nm.

4.11 Coleta de segmentos do intestino dos ratos

A coleta de segmentos do intestino foi realizada pela técnica descrita por Teixeira (Teixeira, 2003). Submete-se o animal à anestesia, utilizando inicialmente Atropina, em dose de 0,05 mg/kg via subcutânea. Dez minutos após a injeção de Atropina, foi aplicado 0,03mL via intramuscular de solução mãe (1mL ketamina (50mg) + 1mL de xilazina (20mg)). Após a parada cardiorespiratória, o peritônio foi aberto e a alça intestinal liberada do mesentério.

A avaliação macroscópica foi feita com a observação da textura e coloração do intestino.

Os segmentos de interesse, duodeno e jejuno, foram dissecados, retirando-se 3cm de cada segmento. Estes segmentos foram colocados sobre um pedaço de papel de filtro e abertos longitudinalmente com auxílio de uma pinça de relojoeiro e tesoura reta oftalmológica. O processo de abertura do segmento de alça é um processo delicado, sendo necessário muito cuidado para não danificar a camada mucosa. Imediatamente após a abertura da alça, pinga-se formol tamponado para a fixação do tecido. Em seguida, este tecido foi colocado em um recipiente contendo solução de formol tamponado até a inclusão em parafina.

A carcaça e as vísceras foram embaladas e preparadas para incineração.

O conjunto dos segmentos intestinais ficou imerso em solução formol-salina 10%, por um período de 24-48 horas;

Após a lavagem das peças em água corrente por 4 horas, seguimos com as etapas de imersão em: 1) álcool a 70%; 2) álcool a 95%, 3) álcool absoluto I, II e III a 100%; 4) xilol I e II, para clarear. O conjunto dos segmentos intestinais ficou imerso durante 50 minutos em cada etapa.

A técnica foi prosseguida com o banho de parafina I e II em estufa, durante 50 minutos cada, e a inclusão dos segmentos em parafina. Foram feitos os cortes histológicos, com espessura de 5 μ m, utilizando micrótomo manual (*American optical corporation-820*). Os cortes foram deixados em banho-maria para distenderem e, então, foram colocados em lâminas, previamente albuminizadas;

Após desparafinização e hidratação, foi realizada a coloração das lâminas em hematoxilina, por 20 minutos e eosina floxina, por 2 minutos. Após a montagem e secagem, as lâminas foram analisadas em microscopia óptica.

Os parâmetros histomorfométricos utilizados, para avaliação da inflamação intestinal, foram: número total de vilosidades por campo; número de leucócitos mononucleares e número de enterócitos. As análises foram feitas por animal em cada grupo, onde para a área do intestino delgado foram analisadas altura e largura de 10 vilosidades. A contagem dos enterócitos e dos leucócitos mononucleares intra-epiteliais foi avaliada com a utilização de objetiva reticulada, com unidade de microscopia no aumento de 60x, onde um campo equivale a 0,2 mm de tecido. As fotomicrografias foram feitas com câmera Olympus acoplada ao microscópio óptico Olympus BX41 usando filme Kodak asa 100.

4.12 Estatística

De acordo com os protocolos experimentais consideramos o n mínimo de 10 para cada grupo. Os dados foram organizados a partir de seus valores originais e representados graficamente.

Foram utilizados os testes T de Student, a Análise de Variância ANOVA com o pós-teste de *Tukey* para a determinação da diferença mínima significativa e o coeficiente de Pearson (r) (correlação linear).

O grau de significância utilizado será representado nos gráficos referente aos resultados, de forma simbólica, como se segue:

- $P < 0,05$ será representado por *
- $P < 0,01$ será representado por **
- $P < 0,001$ será representado por ***

Todos os testes estatísticos foram feitos com auxílio do software **GraphPadInstat®** versão 4.10 for Windows 98, *GraphPad Software*, San Diego – Califórnia – USA, www.graphpad.com Copyright 1992-1998.

5 RESULTADOS

5.1 Protocolo Experimental – I

5.1.1 Avaliação do consumo de ração e de semente de amendoim

5.1.1.1 *Objetivo*

Analisar se há diferença significativa entre os grupos, em relação ao consumo diário de ração e semente de amendoim e de calorias ingeridas durante o período de exposição à dieta desafio.

5.1.1.2 *Consumo diário da dieta e ingestão de calorias durante o período de dieta desafio*

Avaliamos o consumo de dieta de três formas distintas: o consumo médio diário (Figura 8A), o consumo médio semanal (Figura 8B) e consumo médio total (Figura 8C). O consumo de ração pelo grupo Imune Ração (IR) e pelo grupo Normal Ração (NR) não apresentou diferença significativa na avaliação diária. Ambos os grupos apresentam uma flutuação no consumo diário dentro de uma faixa de normalidade. Os animais que foram alimentados com semente de amendoim apresentaram um consumo diário menor, quando comparado aos grupos anteriores. Embora haja uma variabilidade diária de consumo, os animais do grupo Normal Amendoim (NA) consumiram sempre quantidades iguais ou maiores do que o grupo Imune Amendoim (IA). Esta diferença se estabelece claramente a partir da segunda semana com um grau de significância de $p < 0,0001$.

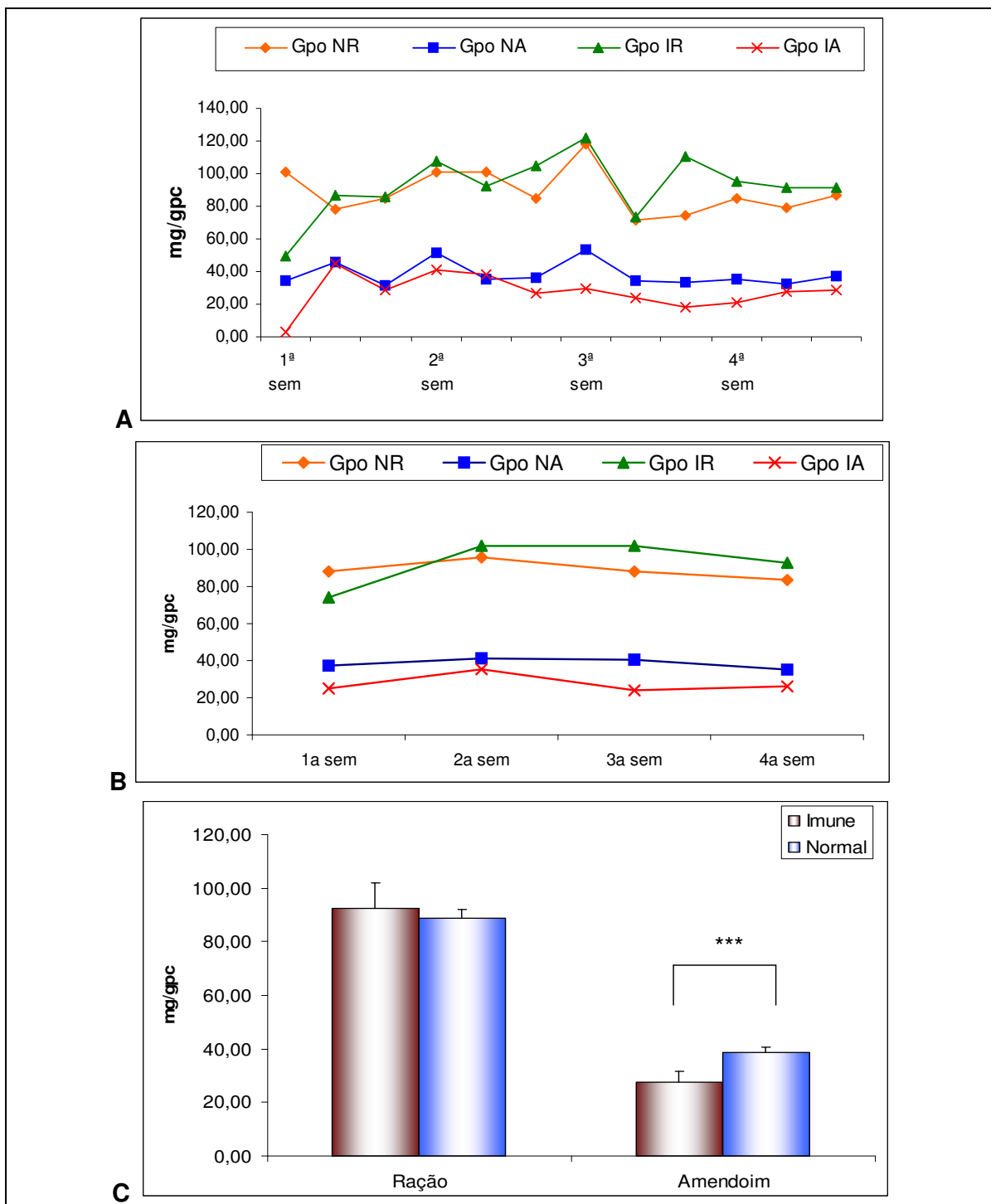


Figura 8. Consumo de ração e amendoim expresso em mg/gpc, durante o período de dieta desafio. Os grupos Normal Ração (NR) e Imune Ração (IR) receberam somente ração no cocho de suas gaiolas, enquanto que os grupos Normal Amendoim (NA) e Imune Amendoim (IA) receberam somente semente de amendoim *in natura*. (A) Representação do consumo diário ao longo da semana. (B) Representação da média do consumo semanal. (C) Média de consumo diário ao longo do período de dieta desafio. A diferença no consumo entre os grupos que foram alimentados com ração e os que foram alimentados

com amendoim foi significativa ($p < 0,0001$). Também foi observada a mesma significância quando comparado o grupo NA com o grupo IA.

Quando apresentamos as médias do consumo semanal, estes padrões de comportamento se tornaram mais evidentes. Na avaliação média do consumo durante as quatro semanas de exposição à dieta desafio, mostramos que os animais que foram alimentados com ração (NR e IR) apresentaram consumo diário significativamente maior do que os dois grupos que consumiram amendoim (NA e IA) ($p < 0,0001$). Embora o consumo médio do grupo IR ($92,61 \pm 9,30 \text{mg/gpc}$) seja maior do que o grupo NR ($88,76 \pm 3,43 \text{mg/gpc}$) não há diferença entre estes grupos. Por outro lado, existe uma diferença significativa quando comparamos o consumo do grupo NA ($38,47 \pm 2,31 \text{mg/gpc}$) com o consumo do grupo IA ($27,60 \pm 3,88 \text{mg/gpc}$) ($p < 0,0001$).

Uma outra maneira de avaliar o consumo do alimento é através da quantificação das calorias totais. Optamos por apresentar graficamente apenas a média do consumo calórico diário por semana (figura 9), uma vez que este nos apresenta a melhor visualização.

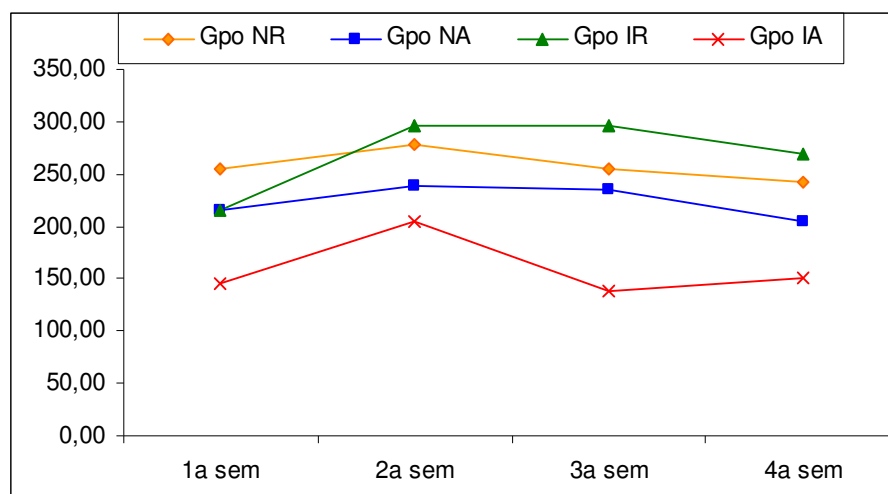


Figura 9. Média de calorias ingeridas entre os grupos do experimento durante o período de dieta desafio. Os grupos que consumiram ração apresentaram uma ingestão significativamente ($p > 0,05$) maior de calorias do que os grupos que consumiram amendoim. Quando comparamos os grupos que consumiram amendoim, o grupo NA apresentou uma ingestão significativamente maior do que o grupo IA ($p < 0,01$).

Podemos visualizar na figura acima que o único grupo que se destaca quanto ao valor calórico consumido foi o grupo inoculado com extrato protéico de amendoim e

alimentado com a respectiva proteína durante o período de dieta desafio (IA) com diferentes graus de significância para cada um dos três grupos restantes. Entre estes, aqueles alimentados com ração (NR e IR) e o grupo alimentado com amendoim e que não foi inoculado com o extrato protéico de amendoim (NA), não há diferença significativa ($p>0,05$) (tabela 4).

Tabela 4. Comparação da significância entre grupos quanto ao consumo calórico médio durante o período de dieta desafio

Comparação entre grupos	Diferença média	q	Significância	p valor
Gpo NR vs Gpo NA	34,263	2,564	ns	P>0,05
Gpo NR vs Gpo IR	-11,172	0,8362	ns	P>0,05
Gpo NR vs Gpo IA	97,305	7,282	**	P<0,01
Gpo NA vs Gpo IR	-45,435	3,400	ns	P>0,05
Gpo NA vs Gpo IA	63,043	4,718	*	P<0,05
Gpo IR vs Gpo IA	108,48	8,119	***	P<0,001

Ao final do período de exposição à dieta, o grupo NR ingeriu em média $257,41\pm 9,96$ kcal, enquanto o grupo IR ingeriu $268,58\pm 26,98$ kcal sem apresentar diferença significativa ($p>0,05$). O grupo NA apresentou uma ingestão média de $223,15\pm 13,43$ kcal, enquanto o grupo IA ingeriu significativamente menos calorias $160,10 \pm 22,51$ kcal ($p<0,05$).

5.1.2 Peso dos animais

5.1.2.1 Objetivo

Verificar se a dieta desafio altera, de forma significativa, o ganho de peso em animais inoculados com a respectiva proteína comparados com os animais inoculados com salina, bem como comparar o ganho de peso em animais inoculados com a proteína do amendoim ou salina que continuam comendo ração (grupos NR e IR).

5.1.2.2 Evolução do peso corporal médio dos animais entre os grupos

Antes do início do período de dieta desafio, os ratos de todos os grupos apresentaram um peso médio de $242,03 \pm 9,60$ g.

Os animais dos grupos alimentados com ração, independente do protocolo de inoculação (proteína do amendoim (IR) ou salina (NR)), apresentaram um ganho de

peso contínuo durante o experimento sem diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos.

Os animais dos grupos alimentados com amendoim (IA e NA), não só não ganharam peso, como os que foram inoculados com a respectiva proteína (IA) apresentaram uma perda significativa de peso ($p<0,001$), chamando a atenção para a perda de peso do grupo IA desde a primeira semana de exposição à dieta desafio (Figura 10).

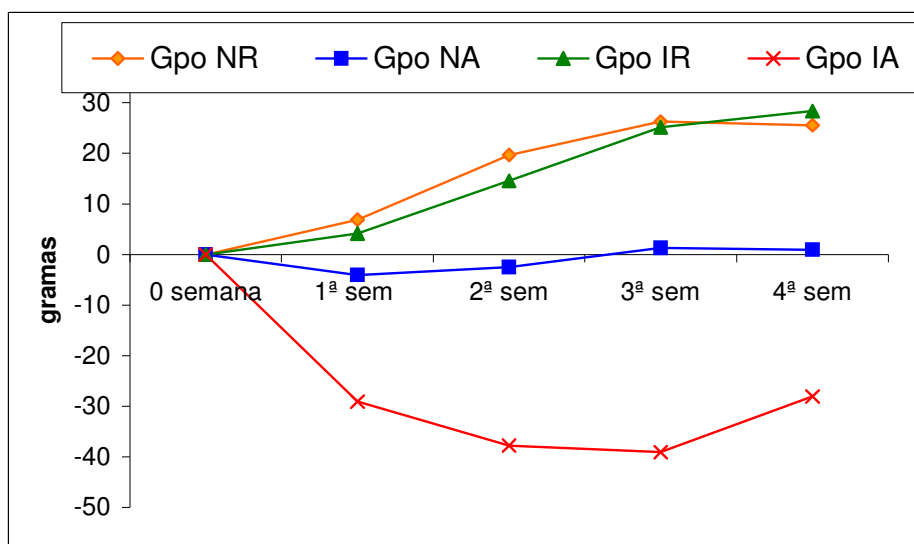


Figura 10. Média da diferença de peso, em gramas, dos animais dos grupos Normal Ração (NR), Normal Amendoim (NA), Imune Ração (IR) e Imune Amendoim (IA), antes e durante as quatro semanas de dieta desafio. Os animais dos grupos controles (NR e IR) apresentaram ganho de peso, enquanto os animais do grupo NA não apresentaram diferença de peso. Já os animais do grupo experimental (IA) apresentaram uma perda de peso significativa ($p<0,001$) a partir do primeiro dia de introdução da dieta desafio.

5.1.3 Sorologia – dosagem de IgG total anti-proteína de amendoim

5.1.3.1 Objetivo

Determinar, através da análise sorológica, se existe diferença quanto aos títulos de IgG total entre os grupos inoculados com extrato protéico de amendoim e salina.

5.1.3.2 Titulação de anticorpos IgG de cada grupo do experimento

A inoculação sistêmica com extrato de amendoim (grupos IR e IA), proporcionou um aumento significativo dos títulos de anticorpos (Ac) específicos anti-amendoim

($p < 0,001$), quando comparado aos grupos inoculados com salina mesmo durante as quatro semanas de dieta desafio. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos títulos de anticorpos entre os grupos inoculados com salina (NR e NA) nem entre os aqueles inoculados com extrato protéico de amendoim (IR e IA) (Figura 11).

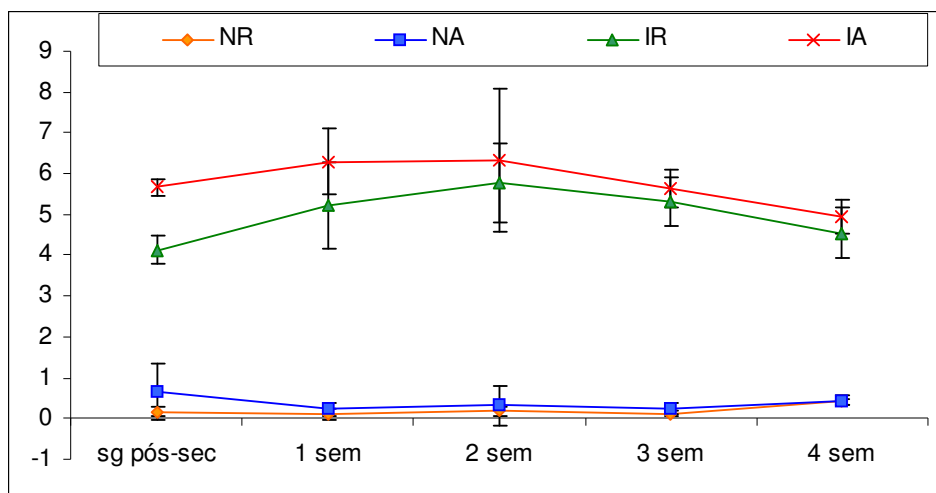


Figura 11. Média dos níveis de IgG total anti-proteína de amendoim dos grupos durante as semanas de dieta desafio. Os animais dos grupos IA e IR apresentaram altos títulos de anticorpos, enquanto os animais dos grupos controles NR e NA apresentaram baixos títulos ($p < 0,001$).

5.2 Protocolo Experimental II

5.2.1 Desenvolvimento do Modelo de Inflamação Intestinal Crônica em Ratos

A partir das análises observadas no experimento piloto (I), pode-se observar que o modelo foi desenvolvido com sucesso, pois os dados sorológicos e de peso foram similares aos achados prévios em camundongos (Teixeira, 2003).

Devido à observação de que os grupos controles NA, NR e IR, apresentaram comportamentos de consumo e peso similares, foi desenvolvido um novo protocolo experimental (II), constando somente dos dois grupos extremos: IA (inoculados com extrato protéico de amendoim e alimentados com a respectiva proteína) e NR (inoculados com salina e alimentados exclusivamente com ração). A partir de agora, denominados de grupo experimental e grupo controle, respectivamente. Este segundo protocolo teve como objetivo avaliar a interferência do processo inflamatório crônico na sua capacidade de absorção de glicídios e para confirmar o estado fisiopatológico e

imunológico (sorologia) dos animais destes grupos, também foi realizada a avaliação histológica do intestino e a titulação de anticorpos anti-amendoim.

5.2.2 Avaliação sorológica

5.2.2.1 Objetivo

Confirmar através da análise sorológica, a resposta imunitária à inoculação com extrato protéico de amendoim.

5.2.2.2 Titulação de anticorpos IgG anti-proteína de amendoim dos grupos

Confirmando resultados prévios, os ratos do grupo experimental (submetidos à inoculação sistêmica com extrato bruto de amendoim) apresentaram títulos de anticorpos IgG significativamente maiores ($5,085 \pm 0,126$) do que os ratos do grupo controle, inoculados com solução salina ($0,905 \pm 0,053$). A diferença entre os títulos nestes grupos foi significativa ($p < 0,0001$) (Figura 12).

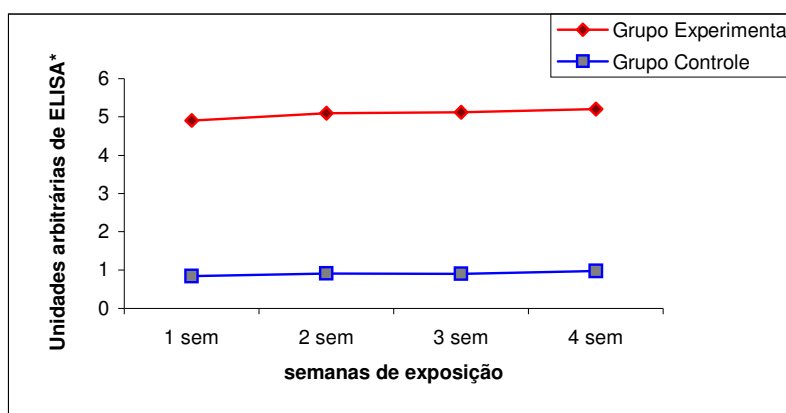


Figura 12. Títulos de anticorpos IgG total anti-amendoim nos grupos experimental e controle. $P < 0,0001$.

5.2.3 Avaliação Histológica

5.2.3.1 Objetivo

Comparar as alterações histomorfométricas entre os grupos controle e experimental.

5.2.3.2 Análise macroscópica e microscópica

Na análise macroscópica, os animais do grupo controle apresentaram tecido intestinal de consistência normal, sem sinais de inflamação. Os animais pertencentes ao grupo experimental apresentaram um tecido intestinal friável e foi observada secreção purulenta em alguns animais (quatro entre os dez animais deste grupo).

A análise microscópica condiz com a macroscopia, onde foi observada uma estrutura intestinal preservada nos animais do grupo controle, enquanto foi observado nos animais do grupo experimental, vilosidades com edema, hiperemia e um grande infiltrado leucocitário, tanto no duodeno quanto no jejuno (Figura 13A e B).

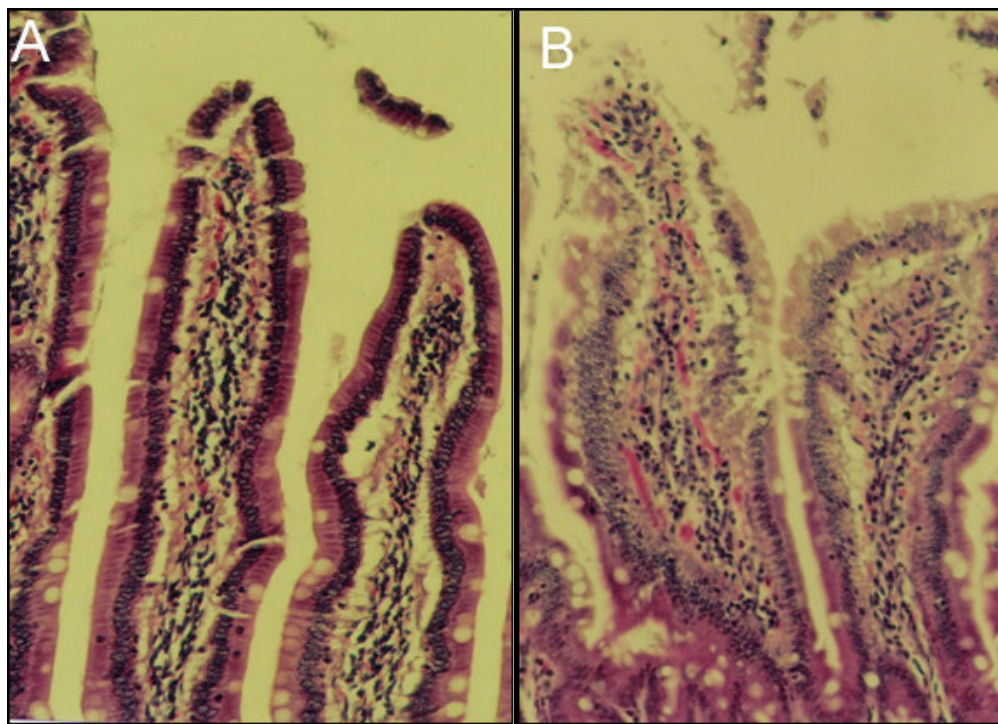


Figura 13. Diferenças histológicas entre os ratos do grupo controle e experimental. (A) Aspectos da vilosidade de um rato do grupo controle, apresentando um tecido preservado, sem edema e poucos leucócitos. (B) Aspectos da vilosidade de um rato do grupo experimental, apresentando hiperemia e grande infiltrado leucocitário (coloração HE, aumento de 200x).

Ao realizar a avaliação histomorfométrica do duodeno de animais do grupo experimental, observamos um aumento significativo da largura das vilosidades com uma conseqüente diminuição da razão altura/largura ($3,54 \pm 1,10$) quando comparamos com o grupo controle ($4,55 \pm 0,74$) ($p < 0,05$). A diminuição desta razão também ocorreu

no jejuno, mas não foi significativa quando comparamos os grupos citados (Figura 14A).

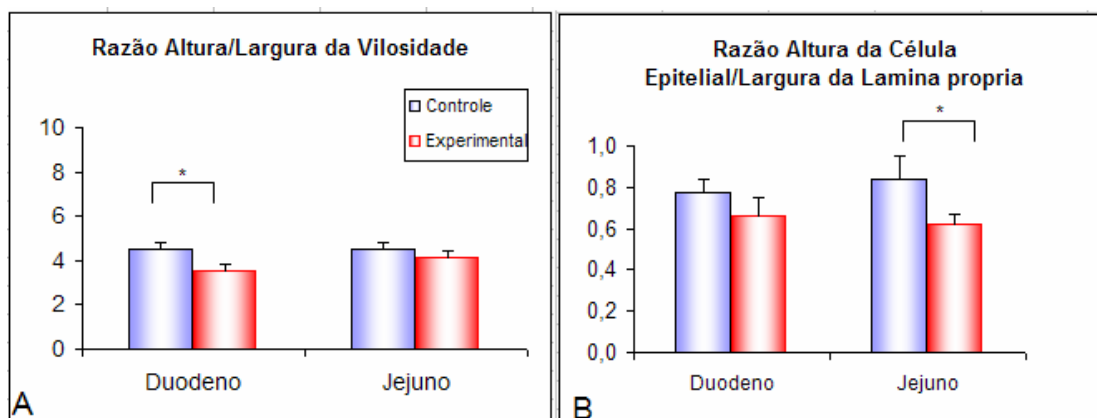


Figura 14. Análise histomorfométrica dos segmentos intestinais do grupo experimental e controle. Representação gráfica da razão altura/largura da vilosidade (A), onde somente o duodeno dos ratos experimentais apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao dos ratos controle, enquanto na representação da razão altura da célula epitelial/largura da *lamina propria* (B), somente o jejuno apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) no jejuno, mas não no duodeno, quando avaliada a razão altura da célula epitelial/largura da *lamina propria*. Nesta avaliação, os animais experimentais apresentaram uma razão menor ($0,62 \pm 0,08$) do que os animais controles ($0,83 \pm 0,38$) (Figura 14B).

O terceiro critério avaliado foi a razão altura da vilosidade/altura da cripta. Esta razão foi maior em animais controle ($1,97 \pm 0,11$), quando comparado aos animais experimentais ($1,80 \pm 0,07$). Após a avaliação dos dois segmentos intestinais, observamos uma diferença significativa ($p < 0,05$) somente no duodeno (Figura 15A).

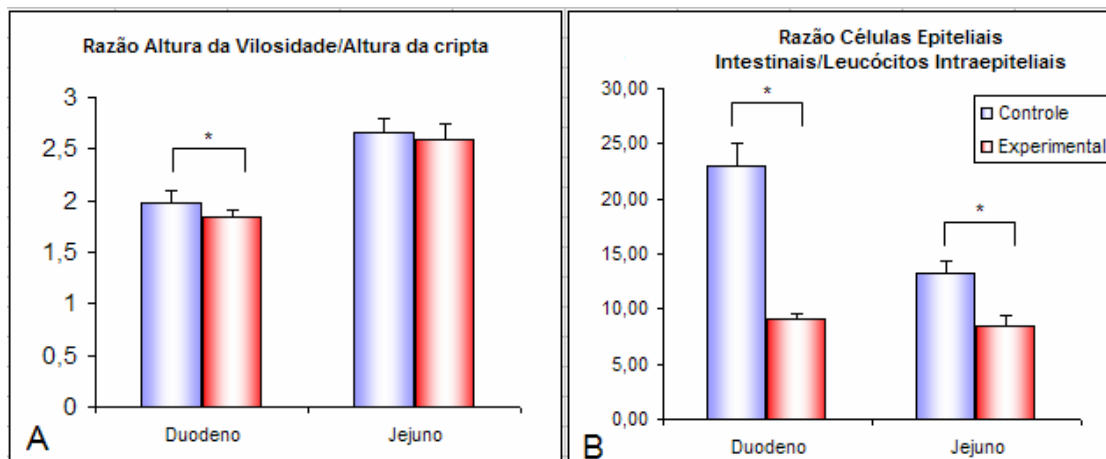


Figura 15. Análise histomorfométrica dos segmentos intestinais dos grupos experimental e controle. Representação gráfica da razão altura da vilosidade/altura da cripta (A), onde observamos diferença significativa ($p < 0,05$) somente no duodeno dos ratos experimentais quando comparado ao dos ratos controle. Na representação da razão células epiteliais intestinais (CEI) / leucócitos intraepiteliais (LIE) (B), ambos os segmentos duodeno e jejuno apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

O quarto critério usado foi a comparação do número de células epiteliais intestinais (CEI) com o número de leucócitos intraepiteliais (LIE) e o estabelecimento da razão CEI/LIE. Para este critério, observamos diferenças significativas ($p < 0,05$) em ambos os segmentos intestinais quando comparamos os animais experimentais com os animais controle. No duodeno, a razão CEI/LIE foi $9,09 \pm 1,43$ no grupo experimental e $22,95 \pm 2,93$ no grupo controle, enquanto no jejuno a razão foi $8,52 \pm 2,43$ no grupo experimental e $13,22 \pm 0,80$ no grupo controle. Os animais do grupo controle apresentaram uma relação maior do que dos animais experimentais (Figura 15B).

5.2.4 Padronização do teste da D-xilose sérica

5.2.4.1 Objetivo

Padronizar a técnica de D-xilose para avaliar e comparar a absorção intestinal de carboidratos entre os grupos controle e experimental.

5.2.4.2 Experimento piloto – animais sem manipulação

Após a gavagem, todos os animais foram sangrados a cada hora durante as quatro primeiras horas para determinar a curva de absorção e excreção de D-xilose.

Analisando a curva de absorção individual até a terceira hora pós-gavagem, observamos que não houve diferença estatística nos níveis séricos de D-xilose, mesmo quando foi feita a comparação entre os animais. Assim, passamos a utilizar a sangria da primeira e terceira hora. Analisando as médias dos animais, observamos uma diferença significativa na concentração de D-xilose no sangue entre o período de jejum e após a gavagem, mas não durante as três horas pós-gavagem. A partir da quarta hora inicia-se o *clearance* da D-xilose com uma diferença significativa na concentração deste açúcar, quando comparado com a terceira hora ($p < 0,05$) (Figura 16).

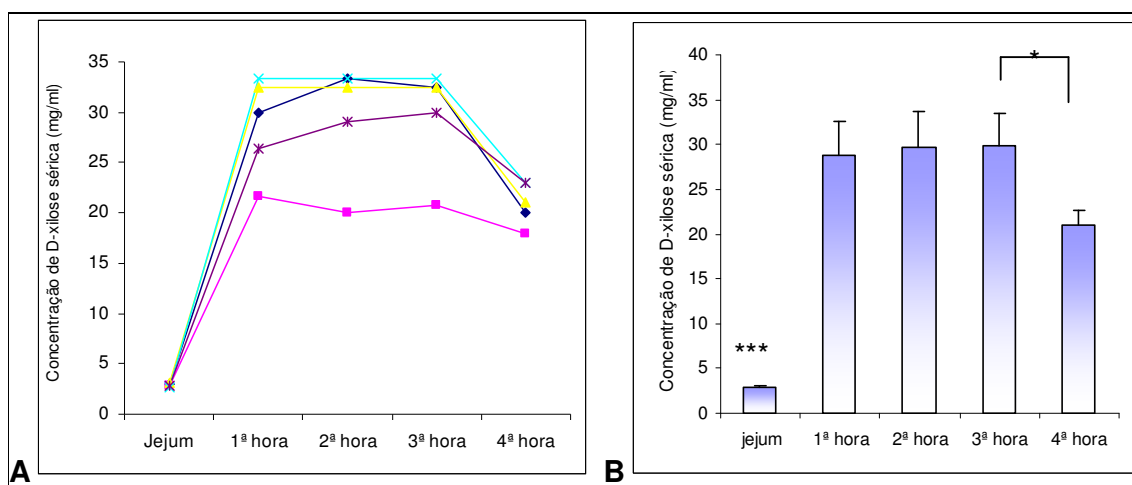


Figura 16. Determinação da curva de absorção e excreção de D-xilose em animais normais. A) valores individuais do tempo zero (jejum) e da 1ª a 4ª hora pós-gavagem com 1,23g de D-xilose. B) Média dos valores dos animais, mostrando uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre o período de jejum e após a gavagem; entre a 1ª e 3ª hora não há diferença significativa, passando a apresentar um *clearance* a partir da 4ª hora ($p < 0,05$ na comparação entre a 3ª e 4ª horas).

5.2.4.3 Teste de absorção nos animais do experimento

Baseado na curva de absorção observada acima, nós determinamos que cada animal do grupo experimental e do grupo controle deveria ser sangrado na primeira e terceira hora após a gavagem. Os valores de absorção foram expressos como média de ambas as sangrias.

Como mostrado na figura 17, os animais pertencentes ao grupo experimental apresentaram uma absorção intestinal de D-xilose ($9,66 \pm 1,79$ mg) significativamente menor do que os animais do grupo controle ($19,63 \pm 2,89$ mg ($p < 0,0001$)).

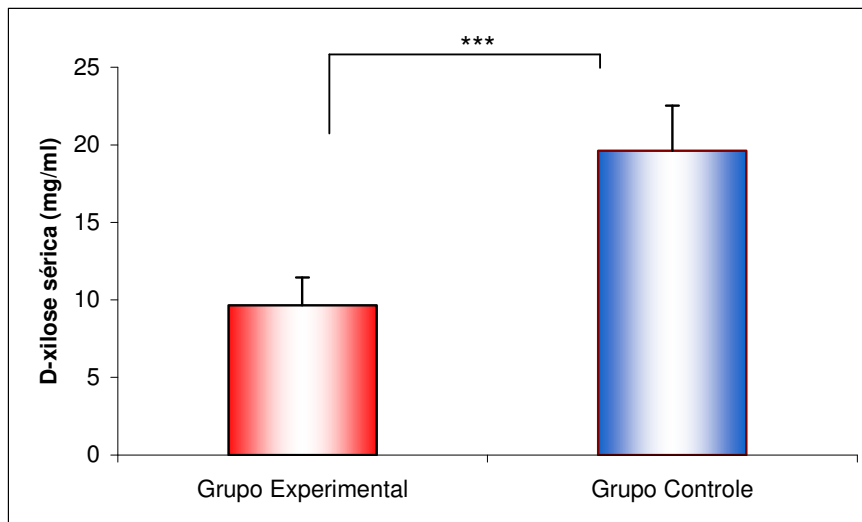


Figura 17. Média de D-xilose sérica (mg/ml) nos ratos do grupo experimental e controle. A diferença de absorção entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

5.2.5 Correlação entre o teste de absorção de D-xilose e os achados sorológicos e histológicos e entre a sorologia e um parâmetro histomorfométrico.

5.2.5.1 Objetivo

Verificar se o teste de absorção de D-xilose, utilizado para avaliação da absorção intestinal, apresenta correlação significativa com os outros parâmetros utilizados para avaliar a inflamação intestinal crônica (razões histomorfométricas e os títulos de IgG específicos).

5.2.5.2 Correlação entre o teste sérico de D-xilose e razão altura/largura da vilosidade

O coeficiente de correlação (r) entre a razão altura/largura da vilosidade, a absorção intestinal de D-xilose foi igual a 0,7645, indicando que, quanto maior esta razão (proximidade com o padrão de normalidade histomorfométrica) maior a absorção intestinal deste açúcar. Portanto, como observado na figura 18, esta correlação foi positiva e significativa ($p < 0,0001$).

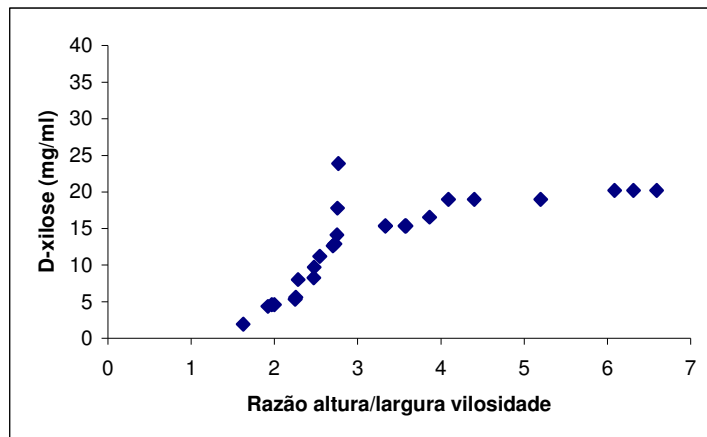


Figura 18. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão altura/largura da vilosidade no duodeno ($p < 0,0001$).

5.2.5.3 Correlação entre o teste sérico de D-xilose e razão altura da célula epitelial/largura da lamina propria

O coeficiente de correlação (r) entre a razão altura da célula epitelial/largura da *lamina propria* (que é um dos indicativos de alteração da lamina propria como, por exemplo, edema e infiltrado celular) e a absorção intestinal de D-xilose foi igual a 0,9001, indicando que quanto menor esta razão (*lamina propria* mais larga ou achatamento de célula epitelial - padrão de inflamação intestinal crônica), menor é a absorção de D-xilose. À medida que esta razão aumenta (proximidade com a normalidade), observamos também um aumento na absorção intestinal deste açúcar. Como observado na figura 19, esta correlação foi positiva e significativa ($p < 0,001$).

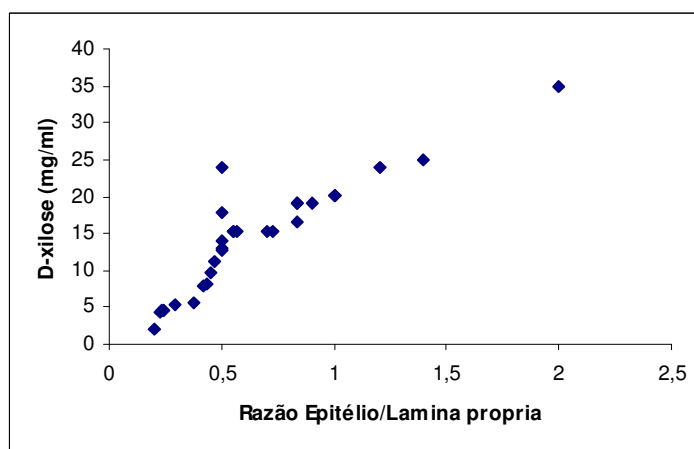


Figura 19. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão altura da célula epitelial/largura da *lamina propria* no jejuno ($p < 0,0001$).

5.2.5.4 *Correlação entre o teste sérico de D-xilose e razão altura da vilosidade/altura da cripta*

O coeficiente de correlação (r) entre a razão altura da vilosidade/altura da cripta e absorção de D-xilose foi igual a 0,9763, indicando que, quanto mais próximo da normalidade, maior a absorção intestinal de D-xilose. À medida que esta razão diminui (típico de um processo inflamatório crônico), a absorção intestinal deste açúcar também diminui. Como observado na figura 20, esta correlação foi positiva e significativa ($p < 0,0001$).

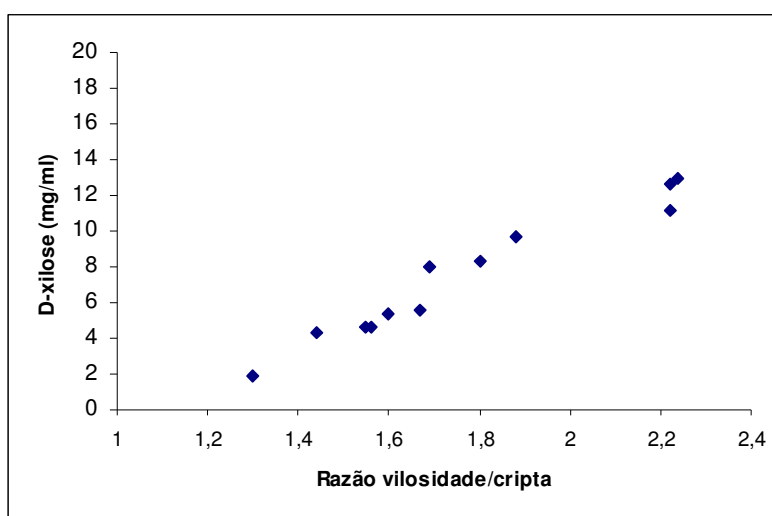


Figura 20. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão altura da vilosidade/altura da cripta no duodeno ($p < 0,0001$).

5.2.5.5 *Correlação entre o teste sérico de D-xilose e razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais*

O coeficiente de correlação (r) entre o teste sérico de D-xilose e a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais foi igual a 0,8628, indicando que, quanto maior o infiltrado celular e portanto, menor a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais, menor a absorção intestinal de D-xilose. À medida que esta razão aumenta, observamos também um aumento na absorção intestinal deste açúcar. Como mostra a figura 21, esta correlação foi positiva e significativa ($p < 0,0001$).

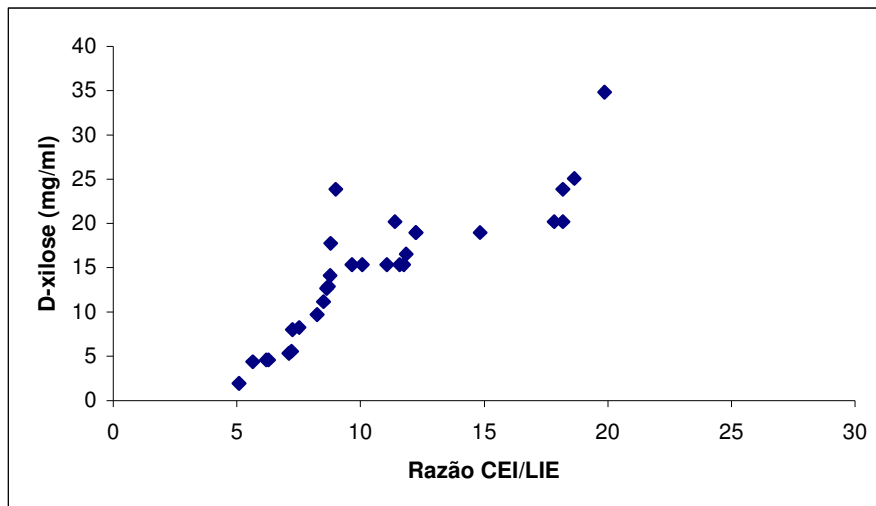


Figura 21. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais no duodeno ($p < 0,0001$).

5.2.5.6 Correlação entre o teste sérico de D-xilose e Sorologia

O coeficiente de correlação (r) entre o teste sérico de D-xilose e a sorologia foi igual a $-0,7773$, indicando que, quanto maior a titulação de IgG anti-amendoim do animal, menor é a sua absorção intestinal de D-xilose. Como observado na figura 22, esta correlação foi negativa e significativa ($p < 0,0001$). Temos que lembrar que neste caso, os títulos de anticorpos anti-amendoim estão sendo mantidos elevados pela estimulação constante com a proteína presente na dieta desafio.

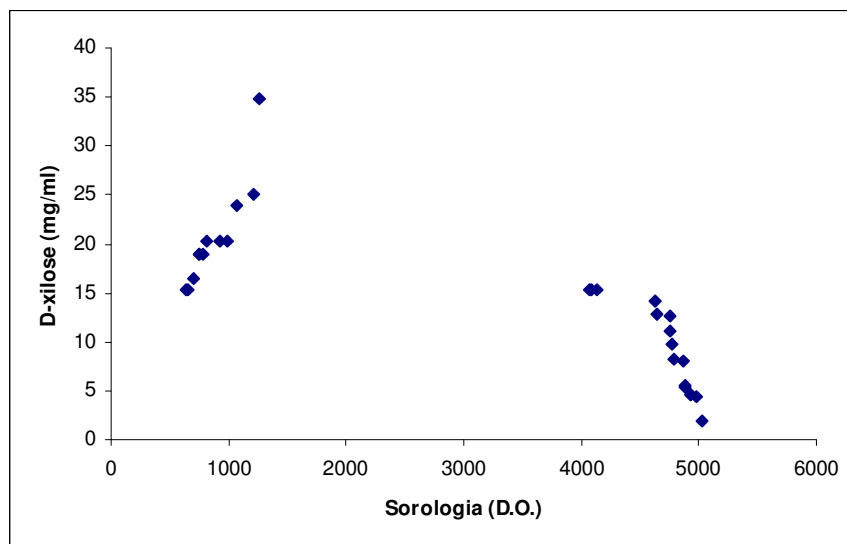


Figura 22. Representação da correlação linear entre D-xilose sérica (mg/ml) e a sorologia ($p < 0,0001$).

5.2.5.7 Correlação entre a Sorologia e a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais

Confirmando os dados da figura 23 quando se estabelece, neste modelo, o coeficiente de correlação (r) entre a sorologia e a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais, o valor encontrado foi igual a -0.7885 , indicando que, quanto maior a titulação de IgG anti-amendoim do animal, menor é a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais, mostrando que a inoculação sistêmica com a presença das respectivas proteínas na dieta interferem na arquitetura histológica do intestino. A figura abaixo mostra que esta correlação foi negativa e significativa ($p < 0,0001$).

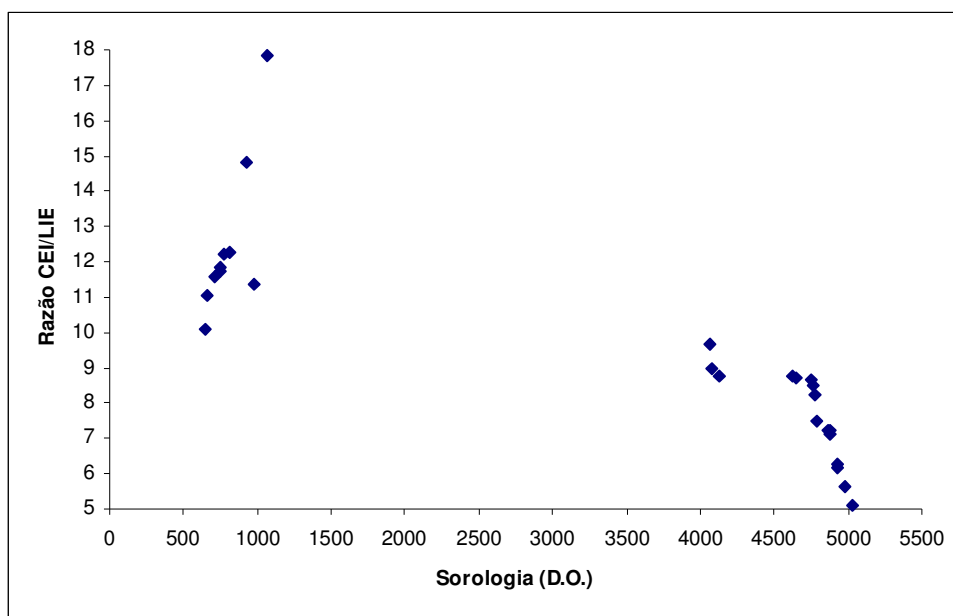


Figura 23. Representação da correlação linear entre a sorologia e a razão células epiteliais intestinais/leucócitos intraepiteliais no duodeno ($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

O intestino não é simplesmente um tubo onde os alimentos entram e o que é soluto é absorvido e o sólido, eliminado – consiste na nossa mais profunda vinculação com o meio ambiente. Dessa intimidade decorre nossa própria sobrevivência: é graças a ela que processamos, registramos e neutralizamos as proteínas estranhas que desde o primeiro dia de vida ingerimos (Madi et al., 2001). Podemos ter um outro olhar para a função do trato digestório a de permitir o acoplamento estrutural com o meio ambiente, ou seja, interagimos com ele, nos integramos de forma mais harmônica possível permitindo a absorção de proteínas estranhas sem que elas nos causem problemas – nos tornamos tolerantes a elas sem a necessidade de neutralizá-las (Teixeira, 2003).

Assim, embora as mucosas entrem em contato diariamente com uma infinidade de antígenos, sua morfofisiologia lhe garante o estado de homeostasia. A quebra desta homeostasia, por diversos fatores, pode levar à ocorrências fisiopatológicas de importância clínica variada, indo desde gastroenterites de resolução rápida até processos mais complexos, como as alergias alimentares e as doenças inflamatórias intestinais crônicas (Mayer, 2000; Nagler-Anderson & Shi, 2001).

As alergias alimentares estão emergindo como um importante problema de saúde devido à severidade da inflamação intestinal resultante destas e do aumento crescente no número de casos nas últimas décadas (Knippels et al., 2004). O aumento na incidência destas alergias pode ser decorrente de uma falha na indução da tolerância oral ou de uma quebra em sua manutenção. O amendoim consiste em uma potente fonte de proteínas alergênicas e a prevalência da alergia a esta semente vem aumentando tanto em crianças quanto em adultos, principalmente nos EUA e Reino Unido (Strid et al., 2004). É também conhecida por persistir durante toda a vida.

Somente de 10-20% dos pacientes alérgicos ao amendoim perdem sua sensibilidade a esta semente (Skolnick et al., 2001), comparado com 85% dos alérgicos ao ovo e ao leite de vaca (Dannaeus & Inganas, 1981; Host et al., 2002). Várias proteínas do amendoim têm sido identificadas como alergênicas, como por exemplo, a Ara h1, Ara h2, Ara h3 (Burks et al., 1998).

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença debilitante que abrange tanto a doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RU) quanto as inflamações não-infecciosas do intestino e têm sido um enigma tanto para os gastroenterologistas como imunologistas desde suas primeiras descrições, no início do século XX (Strober, 2007). Recentemente, estima-se que as DII afetam aproximadamente um milhão de pessoas somente na América do Norte (Bamias et al., 2005). A resposta imunitária inapropriada aos alimentos e às bactérias comensais, que pode ser uma causa da doença celíaca e da DC, decorrem da desregulação de processos cruciais de controle do intestino (Mowat, 2003).

A tolerância imunológica é reconhecida como o estado de reatividade normal do sistema imunitário do trato gastrointestinal frente ao contato com antígenos da alimentação e da flora microbiana. Existe uma ampla variedade de tipos celulares que participam de forma regulada para manter, não só a tolerância imunológica como a integridade da mucosa intestinal (Sands, 2007). Os produtos da orquestração destas células (em particular as citocinas), em um contexto de homeostasia, são fatores tróficos para o crescimento das vilosidades um dos fatores que ajudam na manutenção da relação adequada da altura da vilosidade e da cripta (Ohtsuka & Sanderson, 2000). Estas interações do sistema imunitário das mucosas permitem, ao mesmo tempo, a capacidade de construir uma resposta não inflamatória às proteínas alimentares e uma resposta inflamatória aos microorganismos patogênicos.

Devido à impossibilidade ética de se realizar experimentos em humanos, os cientistas vêm estabelecendo modelos animais para o estudo dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da alergia alimentar, com o objetivo de identificar novas estratégias terapêuticas. Nas últimas duas décadas, o número de modelos experimentais que apresentam diferentes manifestações clínicas semelhantes às aquelas observadas nos humanos tem aumentado (Jurjus et al., 2004). Estes modelos contribuem imensamente para avanços importantes no nosso entendimento dos

mecanismos fundamentais da inflamação e da patogênese da doença. Em geral, um modelo apropriado ou ótimo deve apresentar características similares ou idênticas ao curso das doenças humanas e em particular, no nosso caso, às doenças inflamatórias intestinais tais como: fisiopatologia, sinais e sintomas, bem como inflamação e alterações morfológicas no intestino (Jurjus et al., 2004). Para isso, a maioria dos modelos disponíveis induz à inflamação intestinal através da irritação da superfície mucosa pela sua exposição a produtos e reagentes químicos, como ácido acético, éster forbol e vários polissacarídeos sulfatados (carragenina, sulfato de amilopectina e DSS) ou usam animais geneticamente modificados (Strober et al., 2002).

Neste sentido, Teixeira estabeleceu, em 2003, um modelo de alergia alimentar e, portanto, de inflamação intestinal crônica, em camundongos da linhagem isogênica C57Bl/6J que possui um padrão típico de resposta Th1, reproduzindo o padrão histológico encontrado na doença celíaca em humanos. É importante ressaltar que a doença celíaca é uma reação ao glúten presente no trigo, porém no modelo desenvolvido por Teixeira (2003), o antígeno utilizado foi o amendoim, que é reconhecidamente alergênico (Teixeira, 2003). Embora, a maioria das alergias ao amendoim, tanto em humanos quanto em modelos animais, são mediadas por uma resposta do tipo Th2 e, portanto, dependentes da produção de IgE (Sampson, 1994), no modelo desenvolvido no nosso laboratório este padrão não foi observado, talvez porque utilizamos como via de sensibilização a via subcutânea com altas doses do antígeno (dados ainda não publicados).

A reprodutibilidade deste modelo de alergia ao amendoim desenvolvido em camundongos C57Bl/6J, foi demonstrada em camundongos BALB/c (Castro Junior, 2006; Antunes et al., 2007) e no presente trabalho, em ratos Lou-M (Antunes et al., 2007). As características principais deste modelo de inflamação intestinal são atrofia das vilosidades, hiperplasia da cripta, aumento do infiltrado de leucócitos mononucleares, tanto na *lamina propria* como intraepitelial, e edema na *lamina propria*. Estes são sinais típicos da doença celíaca no humano, podendo também ser observado em outras enteropatias induzidas por alimentos (Marsh, 1995).

Teixeira (2003) demonstrou que os camundongos C57Bl/6J inoculados e expostos a uma dieta exclusiva com o antígeno sensibilizante durante quatro semanas, perdem peso corporal sem, no entanto, apresentar sinais como prostração ou

caquexia. Embora tenham apresentado fezes amolecidas, estes não apresentaram diarreia franca. Estas características também foram observadas nos camundongos BALB/c (Castro Junior, 2006) e em nossos ratos do grupo experimental (grupo IA).

Em nossos resultados mostramos que os animais que consumiram ração durante o período da dieta desafio (grupos NR e IR) apresentaram um ganho de peso constante e significativo, fato que pode ser justificado pela quantidade de calorias ingeridas e por estarmos trabalhando com animais jovens (dois meses no início do protocolo experimental). Após a introdução da semente de amendoim como dieta exclusiva neste mesmo período (dieta desafio), observamos que os animais do grupo NA, apesar de apresentarem uma oscilação no peso durante essas semanas, não apresentaram alteração no peso no final deste período. Essa estabilidade de peso em animais jovens pode ser explicada pelo fato do amendoim conter uma alta concentração de gordura, o que tende a levar a uma saciedade maior e um esvaziamento gástrico mais lento, justificando o consumo discretamente calórico menor do que dos animais que foram alimentados com ração. Este fato não foi observado em camundongos por Teixeira (2003). Os animais do grupo experimental (IA) apresentaram uma perda de peso significativa a partir da primeira semana de introdução da semente de amendoim como dieta desafio, quando comparados aos demais animais. Mas como podemos justificar a perda de peso se não ocorre diarreia nestes animais? Uma justificativa pode ser a presença da inflamação intestinal, o que induz a um desconforto abdominal e tende a levar a uma aversão ao alimento e, portanto, a redução da ingestão, como descrito por Garcia (1974). Outra justificativa pode ser a absorção deficiente dos alimentos como pôde ser comprovado pela absorção de D-xilose neste trabalho.

Teixeira (2003) ainda observou que, logo após a retirada da dieta desafio (amendoim) e retorno para a dieta convencional (ração), todos os animais voltam a ganhar peso, chegando a patamares de normalidade em quatro semanas de recuperação. Por outro lado, observou que se a dieta desafio for composta por ração, além do amendoim, não há perda de peso, uma vez que o processo inflamatório da mucosa intestinal não se estabeleceu de forma tão intensa. A nossa hipótese que ainda não foi testada é de que este comportamento se deve provavelmente pela proteção oferecida pela tolerância oral às proteínas da ração.

O oferecimento de sementes de amendoim *ad libitum* aos animais sensibilizados sistemicamente através da inoculação da respectiva proteína com objetivo de induzir a inflamação intestinal (condição freqüente nas alergias alimentares humanas) é mais próximo a história natural da doença intestinal inflamatória do que sua indução através da utilização de irritantes da mucosa intestinal. Este é o diferencial do nosso modelo.

Existem outros trabalhos, onde os autores têm usado desafio intragástrico com as proteínas alimentares para induzir uma reação alérgica, no entanto estes protocolos utilizam como irritante a toxina colérica, molécula esta que provoca uma grande irritação na mucosa intestinal (Morafo et al., 2003; Adel-Patient et al., 2005). Optamos por uma inoculação subcutânea para simular a fase de sensibilização sistêmica, pois podemos controlar a quantidade de proteína que o animal será exposto. Este protocolo pode não estar tão longe das reais condições de sensibilização primária como demonstrado recentemente por Strid e cols (2005), onde a exposição epicutânea a proteínas de amendoim leva a uma sensibilização alérgica e previne a tolerância oral, sugerindo que a sensibilização epidérmica pode ser uma das formas de se desencadear uma condição alérgica alimentar. Mowat (2003) descreveu que a desregulação da tolerância alimentar em humanos pode provocar a inflamação intestinal crônica, como a doença celíaca ou de Crohn.

Nossos resultados confirmam que a inoculação sistêmica a uma proteína alimentar pode levar a uma doença semelhante a DII no modelo animal. No modelo desenvolvido por Teixeira (2003) nos camundongos C57BL/6J e no que foi reproduzido por Castro Junior (2006) em camundongos BALB/c, foi observado presença de títulos elevados e similares de IgG1, um isotipo de IgG derivado do padrão de resposta Th2. Embora não tenhamos avaliado os subtipos de IgG nos ratos, os resultados obtidos para IgG total específica foram similares aos achados em ambas linhagens de camundongos.

Em contraste ao atual pensamento de que a alergia ao amendoim é primariamente um processo de origem Th2, há vários dados na literatura indicando que a alergia a esta semente é um resultado de uma mistura da resposta imune Th1-Th2. Van Wijk e cols (2004) demonstraram essa mistura de respostas que contém citocinas e anticorpos poli-isotípicos num modelo murino de alergia ao amendoim, específicos aos principais alérgenos desta semente – as proteínas Ara h1, Ara h2, Ara h3 e Ara h6.

Também encontraram produção de IL-4 e IFN- γ (citocinas com efeitos antagônicos Th2/Th1 respectivamente), produção de IgE, IgG1 e IgG2a na fase inicial da resposta ao amendoim. O mesmo grupo também examinou o papel do CTLA-4, um regulador negativo da ativação da célula T, na sensibilização com amendoim e relataram que o uso de anticorpos contra CTLA-4 num modelo murino de alergia ao amendoim impediu a resposta alérgica específica (van Wijk et al., 2005).

Embora Teixeira (2003) e Castro Junior (2006) tenham encontrado anticorpo de isotipo derivado de resposta Th2 (IgG1) nos camundongos, o infiltrado celular do epitélio intestinal não é típico de um perfil anafilático. A ausência de reações sistêmicas anafiláticas no nosso modelo corrobora com a idéia de uma modulação de alergia ao amendoim de perfil misto Th1-Th2. Finalmente, a verificação de uma resposta inflamatória similar no intestino de camundongos com diferentes perfis genéticos e em ratos, valida nosso modelo de alergia ao amendoim, providenciando assim um caminho interessante para o estudo destas respostas imunes mistas às proteínas do amendoim.

Como foi descrito por Teixeira (2003) em camundongos, no presente estudo também observamos que a inoculação com extrato protéico de amendoim induz títulos de anticorpos significativamente maiores (observado no grupo experimental - IA) do que nos ratos que receberam a inoculação com solução salina (grupos NA e NR). Os animais do grupo experimental (IA) que foram alimentados com a dieta desafio contendo amendoim por 30 dias após a inoculação, mantiveram estes altos níveis de anticorpos ao longo de todo o período e apresentaram uma alteração correspondente na morfologia intestinal, típica de reações inflamatórias crônicas intestinais.

Quando comparamos somente os grupos que foram alimentados com o amendoim durante o período de exposição oral, observamos que a ingestão desta semente após a inoculação com a mesma proteína mantém altos títulos de Ac, enquanto a ingestão desta semente após a inoculação com solução salina (grupo NA) não induz à sensibilização sistêmica. Os animais do grupo experimental (IA) que foram alimentados com a dieta desafio contendo amendoim por 30 dias apresentaram uma perda de peso significativa, o que pode ser justificado por um quadro de má absorção em função da inflamação intestinal. Por outro lado, aqueles animais que foram inoculados com extrato de amendoim e receberam como dieta desafio a ração (grupo IR) mantiveram altos títulos de Ac, porém apresentaram um ganho de peso durante o

mesmo período, indicando que a presença de títulos elevados de anticorpos não é indicativo de alterações gastrintestinais a não ser que haja a presença do estímulo antigênico. A partir da observação destes fatos podemos concluir que a inoculação sistêmica com a proteína de amendoim por si só não induz a alterações clínicas que caracterizam um quadro de inflamação intestinal – para que o animal desenvolva este quadro, é necessário que ele se alimente da mesma proteína a qual foi sensibilizado.

Em nosso modelo desenvolvido em ratos, os achados histológicos foram similares aos descritos em experimentos anteriores do nosso grupo (Teixeira, 2003), nos quais se verificou que animais experimentais (inflamados) apresentam, por exemplo, uma relação CEI/LIE menor (3:1) do que a relação dos animais normais (10:1). Esta alteração é devido ao aumento do número de leucócitos infiltrando a camada epitelial dos animais experimentais. De acordo com a literatura, os parâmetros histomorfométricos utilizados em nosso experimento, tais como razão altura vilosidade/cripta, enterócito/*lamina propria* e enterócito/leucócito intraepitelial, são parâmetros de avaliação das alterações intestinais em humanos com inflamação intestinal crônica (Madi et al., 2001). Em nosso experimento, observamos que os ratos do grupo experimental apresentaram razões menores do que os ratos do grupo controle. Essas modificações morfológicas presentes nos animais experimentais são semelhantes àquelas encontradas na doença celíaca, onde o infiltrado leucocitário no epitélio intestinal é um sinal característico da doença (Madi et al., 2001). Baseado na correlação linear de Pearson significativa, concluímos que a sorologia correlaciona-se negativamente com um dos principais achados histomorfométricos; quanto maior a titulação de IgG anti-amendoim do animal, menor é a razão de CEI/LIE. Assim, a partir da análise sorológica e associando às alterações histológicas observadas, nossos resultados indicam que os ratos do grupo experimental estão realmente apresentando uma resposta alérgica ao amendoim. Da mesma forma que para a evolução dos pesos, os animais inoculados com extrato de amendoim e que receberam a dieta desafio contendo apenas ração não apresentaram as mesmas alterações, ou seja, não foi possível estabelecer uma correlação entre títulos de IgG e alterações histomorfométricas neste grupo (dados preliminares não apresentados neste trabalho).

Em qualquer estágio das DII, pode-se observar a ocorrência de uma doença relacionada à má nutrição, perda de peso e condição nutricional subótima. As causas

de má nutrição nestas enfermidades são múltiplas e incluem a baixa ingestão dietética e os prejuízos relacionados à digestão e absorção dos nutrientes (O'sullivan & O'morain, 2006).

Em quadros de inflamação intestinal crônica, os danos aos enterócitos, causados pela ativação de células T e a liberação de citocinas, podem levar a má-absorção de monossacarídeos e ao aumento da permeabilidade duodenal (Sharpstone et al., 1999). Na presença de quadros de inflamação intestinal, observamos alterações importantes na absorção de açúcares e por isso, as investigações não-invasivas da função intestinal são úteis para monitorar as modificações sofridas pelos pacientes. Para avaliação da absorção de carboidratos são utilizados diversos tipos de testes que são poucos invasivos, não só para o diagnóstico como também como acompanhamento em doenças crônicas, como as DII e a Aids (Perin et al. 2001; Thomas et al., 2003).

O teste da D-xilose é um dos testes quantitativos mais confiáveis da função absorptiva intestinal, podendo ser utilizado para a avaliação da má-absorção do intestino delgado em diversas circunstâncias clínicas (Craig & Cebra 1971; Haeney et al., 1978; Craig & Atkinson, 1988; Rolston & Mathan, 1989; Thomas et al., 2003). A D-xilose é uma pentose encontrada naturalmente nas plantas, e sua metabolização incompleta permite seu uso como teste absorptivo (Craig & Ehrenpreis, 1999), sendo um teste simples e barato (Ehrenpreis et al., 2001). A maioria dos estudos é favorável a utilização do teste sérico do que ao teste de excreção urinária para triagem de pacientes adultos e pediátricos em casos de má-absorção intestinal (Craig & Atkinson, 1988) devido à presença relativamente freqüente de falso-positivos (Ehrenpreis et al., 2001).

O objetivo principal deste trabalho foi comparar a absorção intestinal dos ratos com ou sem reação inflamatória intestinal antígeno-específico, usando o teste de absorção da D-xilose sérica. Em pacientes pediátricos, principalmente em bebês e crianças mais novas, o uso do teste sérico ao invés do urinário é mais favorável devido a dificuldades em obter as coletas urinárias no tempo correto (Craig & Atkinson, 1999), problema que também iríamos encontrar na aplicação deste teste em ratos. Ehrenpreis e cols (2001) recomendam o uso das determinações séricas após a primeira e a

terceira hora da ingestão da D-xilose para a triagem de pacientes com sintomas de má-absorção.

Na literatura, há poucos estudos referentes ao uso do teste de D-xilose em ratos, e eles estão relacionados a outros modelos de doenças diferentes das DII, como trauma hemorrágico, sepse (Singh et al., 1991), e anemia por deficiência de ferro (Wayhs et al., 2004). No estudo de Singh, os autores mensuraram a capacidade absorptiva intestinal (CAI) usando o teste de absorção de D-xilose após a primeira hora de administração da solução e encontraram achados significativos no soro destes animais (Singh et al., 1991). Por outro lado, no estudo que envolve anemia (Wayhs et al., 2004), os autores utilizaram o teste de excreção urinária para avaliar a absorção intestinal de D-xilose nos ratos e não encontraram nenhuma diferença entre os grupos com anemia e o controle. Estes resultados confirmam achados anteriores descritos por Sharma e cols (1973) em ratos. Podemos argumentar que as diferenças observadas nestes estudos podem ser derivadas de erros em procedimentos técnicos ou das doenças em questão.

Em relação a estudos utilizando D-xilose em outros roedores, como em camundongos, podemos citar o que foi realizado em nosso grupo por Costa (2005), no nosso laboratório. Esta autora avaliou não só a absorção intestinal de glicídios, como também a absorção de outros nutrientes, como lipídios e proteínas, no modelo de inflamação intestinal crônica em camundongos C57Bl/6J (Costa, 2005).

No presente estudo, foi necessário determinar os melhores tempos de sangria após a gavagem da solução de D-xilose. Baseado na literatura, os animais foram sangrados durante quatro horas, com intervalos de uma hora. Nossos resultados mostraram que durante as primeiras três horas não há diferenças significativas, o que está de acordo com os relatos de Ehrenpreis e cols (2001), que sugerem que os pacientes deveriam ser testados na primeira e na terceira hora após a administração da D-xilose. Nossos achados também concordam com os achados em camundongos que foram descritos por Costa (2005).

De acordo com estudos humanos e baseando-se no tempo de eliminação da D-xilose no sangue, nós definimos como padrão sangrar os animais na primeira e na terceira hora após a gavagem. Assim, observamos que os animais que apresentavam perda de peso e presença de altos títulos de IgG específico ao amendoim (ratos do

grupo experimental), apresentaram uma absorção da solução de D-xilose significativamente inferior à absorção observada nos ratos do grupo controle. Estes resultados sugerem que o teste de absorção de D-xilose em animais expostos a antígenos alimentares após inoculação sistêmica (modelo de inflamação intestinal crônica antígeno-específico desenvolvido pelo nosso grupo) é sensível como teste diagnóstico da atividade absorptiva do intestino em condições fisiopatológicas distintas. Este achado também foi observado por Costa (2005), porém tal estudo se limitou a somente descrever este fato, sem realizar nenhum tipo de correlação entre este e os achados sorológicos e histomorfométricos. Utilizando o teste de correlação de Pearson neste estudo, em ratos, observamos uma correlação negativa entre a absorção de D-xilose e os achados sorológicos, confirmando o fato de que, quanto maiores os títulos de anticorpos anti-amendoim em ratos submetidos à dieta desafio com a respectiva semente, menor a absorção da D-xilose, o que caracteriza a ocorrência de uma má-absorção intestinal. Por outro lado, os animais sensibilizados que não foram submetidos à dieta desafio não apresentaram a mesma correlação significativa (dados não mostrados), indicando que a ingestão da dieta desafio por um período de 30 dias, que induz o processo inflamatório, é essencial para a má absorção e é capaz de manter altos títulos de Ac. Além disso, altos títulos específicos de Ac anti-alimento indicam alergia alimentar, mas não necessariamente inflamação intestinal, sugerindo que tal alimento específico seja um constituinte da dieta do indivíduo que deve ser evitado.

Demonstramos também que a absorção de D-xilose revelou correlação positiva com os parâmetros histomorfométricos estabelecidos, os quais são utilizados para avaliar alterações intestinais na inflamação intestinal crônica em humanos (Madi et al., 2001). Confirmando nossa hipótese, quanto menor as razões histomorfométricas (indicativo de um processo inflamatório crônico, que foram observadas nos ratos do grupo experimental), menor é a absorção de D-xilose, indicando que a inflamação intestinal reduz ou impede a absorção de D-xilose.

Assim, de acordo com os resultados encontrados, podemos confirmar os achados humanos e concluir que o teste da D-xilose sérica é uma ferramenta útil para avaliar a má-absorção intestinal, apresentando uma boa correlação com outros métodos de diagnóstico de doença inflamatória intestinal. Logo, na clínica quando

temos altos títulos de anticorpos e um quadro de má-absorção intestinal, podemos inferir que também há um quadro de inflamação intestinal. Os resultados obtidos neste estudo permitem uma redução na quantidade de animais que serão utilizados em experimentos mais longos para buscar o entendimento dos processos inflamatórios crônicos do intestino, permitindo a realização de um diagnóstico não-invasivo destes animais, sem a necessidade de eutanásia durante o período experimental.

Como perspectivas de trabalho, iremos dar continuidade aos estudos metabólicos neste modelo de inflamação intestinal crônica em ratos, onde pretendemos avaliar os marcadores de leucocitose fecal, como a calprotectina. Estes marcadores possuem grande valor diagnóstico nas DII humanas, pois estão diretamente associados ao processo inflamatório, não são invasivos e são fáceis de serem mensurados.

7 CONCLUSÕES

- O modelo murino de inflamação crônica intestinal antígeno-específico foi desenvolvido com sucesso em ratos;
- Os ratos apresentaram um padrão de alterações similares aos observados nos camundongos, na avaliação do peso corporal, no consumo da dieta desafio, na avaliação de anticorpos específicos e nos aspectos histológicos;
- A inoculação sistêmica dos antígenos alimentares deixa os animais suscetíveis à dieta desafio, provocando alergia;
- O teste sérico de absorção da D-xilose foi padronizado com sucesso;
- Os animais experimentais (inflamados) apresentaram uma absorção da D-xilose significativamente menor do que os animais controle;
- O teste da D-xilose sérica após a 1^a e 3^a hora de gavagem foi útil para identificar a presença de má absorção no nosso modelo em ratos, permitindo análise clínica sem a eutanásia destes animais;
- Foi observada uma correlação positiva entre a presença da má-absorção e a presença de inflamação intestinal, sendo condizente aos estudos em humanos;
- Demonstramos que no quadro de alergia ao amendoim, os animais apresentam má-absorção intestinal, concluído pela correlação negativa entre absorção de D-xilose e os altos títulos de IgG anti-proteína de amendoim;
- Nosso modelo consiste em uma ferramenta eficiente para estudar a evolução das alterações metabólicas no processo crônico antígeno-específico.

8 BIBLIOGRAFIA

Adel-Patient K, Bernard H, Ah-Leung S, Créminon C, Wal JM. Peanut and cow's milk-specific ige, th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy* 2005; 60: 658-64.

Allan CH, Mendrick DL, Trier JS. Rat intestinal m cells contain acidic endossomal-lysossomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* 1993; 104:698-708.

Allan RN. Metabolic problems in inflammatory bowel disease. *Neth J Med.* 1998; 53: S9-12.

Allison MC, Cornwall S, Poulter LW, Dhillon AP, Pounder RE. Macrophage heterogeneity in normal colonic mucosa and in inflammatory bowel disease. *Gut* 1988; 29(11):1531-1538.

Antunes DMF, Castro Júnior AB, Campos SMN, Pedruzzi MMB, Paschoal PO, Costa JP, et al. Induction of an antigen specific gut inflammatory reaction in mice and rats: a model for human inflammatory bowel disease. *Braz Arch Biol Technol.* 2007; in press.

Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Bamba T. Development of dextran sulphate sodium-induced experimental colitis is suppressed in genetically mast cell-deficient ws/ws rats. *Clin Exp Immunol.* 2000; 119(2):264-269.

Armand M. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10:156–164.

Avrameas S, Ternynck T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Rev Immunol.* 1995; 146(4-5): 235-248.

- Baggi F, Andretta F, Caspani E, Milani M, Longhi R, Mantegazza R et al. Oral administration of an immunodominant t-cell epitope downregulates th1/th2 cytokines and prevents experimental myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 1999; 104(9): 1287-1295.
- Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New Concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med*. 2005; 143: 895–904.
- Barboza Jr MS, Silva TM, Guerrant RL, Lima AA. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32: 1499-1504.
- Bass N, Manning J, Ockner R, Gordon JI, Seetharam S, Alpers DH. Regulation of the biosynthesis of two distinct fatty-acid binding proteins in rat liver and intestine. influences of sex differences and of clofibrate. *J Biol Chem*. 1985; 260:1432-6.
- Bazin H, Plateau B. Production of reaginic ige antibodies by oral administration of ovalbumin to rats. *Immunology*. 1976; 30: 679-684.
- Bazin H, Plateau B. Oral feeding can make rats tolerant to intraperitoneal injections of dnp-ovalbumin and B. pertussis vaccine. *Biochem Soc Trans*. 1977; 5: 1571-1573.
- Beresdka A. De Sexième Memoire De L'anaphylaxie Latique. *Ann Inst Pasteur Lille*. 1909; 23: 166.
- Berk PD, Bradbury M, Zhou S, Stump D, Han NI. Characterization of membrane transport processes: lessons from the studies of bsp, bilirubin and fatty acid uptake. *Semin Liver Disease*. 1996; 16: 107-20.
- Bourne FJ, Newby TJ, Chidlow JW. The influence of route of vaccination on the systemic and local immune response in the pig. *Res Vet Sci*. 1975; 18(3): 244-248.
- Brandtzaeg P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev*. 1998; 56: S5–S18.
- Brandtzaeg P. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 964: 13-45.
- Bruce MG, Ferguson A. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. *Immunology*. 1986; 57(4): 627-630.

Bruce MG, Strobel S, Hanson DG, Ferguson A. Irradiated mice lose the capacity to 'process' fed antigen for systemic tolerance of delayed type hypersensitivity. *Clin Exp Immunol.* 1987; 70(3): 611-618.

Burks AW, Cockrell G, Connaughton C, Karpas A, Helm RM. Epitope specificity of the major peanut allergen, Ara H2 . *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 95(2): 607-11.

Burks AW, Sampson HA, Bannon GA. Peanut allergens. *Allergy.* 1998; 53:725-730.

Camerini V, Panwala C, Kronenberg M. Regional specialization of the mucosal immune system. - intraepithelial lymphocytes of the large intestine have a different phenotype and function than those of the small intestine. *J Immunol.* 1993; 151:1765-1776.

Cantor HM, Dumont AE. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature.* 1967; 245:744-745.

Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. ii. tgf-beta-transgenic th3 cells rescue il-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol.* 2007; 178(1): 172-8.

Casellas F, De Torres I, Malagelada JR. Improved screening for intestinal villous atrophy by d-xylose breath test. *Dig Dis Sci.* 2000; 45(1):18-22.

Castro Junior AB. Comparação do padrão inflamatório intestinal antígeno específico entre camundongos C57Bl/6J e Balb/C. (Dissertação). Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2006.

Challacombe SJ, Tomasi TB. Salivary antibodies and systemic tolerance in mice after oral immunization with bacterial antigens. *Ann NY Acad Sci.* 1983; 409: 177-193.

Chase MW. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitized agent. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1946; 61: 257-259.

Costa JP. Avaliação das alterações relacionadas a disabsorção em animais com inflamação intestinal crônica. (Dissertação). Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2005.

Coutinho A, Coutinho G, Grandien A, Marcos MA, Bandeira A. Some reasons why deletion and anergy do not satisfactorily account for natural tolerance. *Res Immunol.* 1992; 143: 345-354.

- Craig SW, Cebra JJ. Peyer's patches : an enriched source of precursors for iga-producing immunocytes in the rabbit. *J Exp Med.* 1971; 134: 188-200.
- Craig RM, Atkinson AJ Jr. D-xylose testing: a review. *Gastroenterology.* 1988; 95: 223-31.
- Craig RM, Ehrenpreis ED. D-xylose testing [clinical review: the small intestine, nutrition, and malabsorption]. *J Clin Gastroenterol.* 1999; 29(2):143-150.
- Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo a gordura. Manole: São Paulo; 2002.
- Dannaeus A, Inganas M. A Follow-up study of children with food allergy. Clinical course in relation to serum IgE- and IgG-antibody levels to milk, egg and fish. *Clin Allergy.* 1981; 11:533-539.
- De Monchy JG. Consensus food hypersensitivity. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 1991; 135(34): 1538-41.
- Drozdowski LA, Thomson ABR. Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(11):1657-1670.
- Eberts TJ, Sample RH, Glick MR, Ellis GH. A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. *Clin Chemist.* 1979; 25:1440-1443.
- Ehrenpreis ED, Salvino M, Craig RM. Improving the serum d-xylose test for the identification of patients with small intestinal malabsorption. *J Clin Gastroenterol.* 2001; 33(1): 36-40.
- Elson CO, Cong Y, Brandwein S, Weaver CT, McCabe RP, Mahler M, et al. Experimental models to study molecular mechanisms underlying intestinal inflammation. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 859: 85-95.
- Faria AMC, Garcia G, Rios MJ, Michalaros CL, Vaz NM. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38 week old mice. the effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology.* 1993; 78(1):147-151.
- Franco G. Nutrição - tabela de composição química dos alimentos. São Paulo: Edições Ateneu, 1982.

Frenhani PB, Burini RC. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arq Gastroenterol.* 1999; 36:227-237.

Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 1994; 91(14): 6688-6692.

Fujihashi K, Kiyono H, Aicher WK, Green DR, Singh B, Eldridge JH, et al. Immunoregulatory function of CD3+, CD4, and CD8 T cells. Gamma Delta T cell receptor positive T cells from nude mice abrogate oral tolerance. *J Immunol.* 1989; 143(11): 3415-3422.

Fujihashi K, Taguchi T, McGhee JR, Eldridge JH, Bruce MG, Green DR, et al. Regulatory function for murine intraepithelial lymphocytes. Two subsets of CD3+, T cell receptor 1+ intraepithelial lymphocyte T cells abrogate oral tolerance. *J Immunol.* 1990; 145(7): 2010-2019.

Fujihashi K, Taguchi T, Aicher WK, McGhee JR, Bluestone JA, Eldridge JH, et al. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: Gamma/Delta T cell receptor positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance, while alpha/beta TCR+ T cells provide B cell help. *J Exp Med.* 1992; 175(3):695-707.

Fujihashi K, McGhee JR, Yamamoto M, Hiroi T, Kiyono H. Role of gamma delta T cells in the regulation of mucosal IgA response and oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 1996; 778: 55-63.

Garcia J, Hamkins WG, Rusiniak KW. Behavior regulation of the milieu interne in man and rat. *Science* 1974; 185: 831-834.

Gebbers JO, Laissue JA. Immunologic structures and functions of the gut. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1989; 131(5): 221-238.

Groux H. An overview of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2001; 3(11): 883-889.

Gu Y, Wu ZH, Xie JX, Jin DY, Zhuo HC. Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. *Clin Nutr.* 2001; 20(2): 159-166.

Guerra R. Specific antibodies in mouse milk after ovalbumin ingestion. *Braz J Med Biol Res.* 1991; 24(1): 107-109.

Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P. The mouse T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host condition. *J Exp Med.* 1978; 148: 1661-1677.

Haeney M, Culank LS, Montgomery RD, Sammons HG. Evaluation of xylose absorption as measured in blood and urine : a one-hour blood xylose screening test in malabsorption. *Gastroenterology.* 1978; 75(3): 393-400.

Hanson D, Vaz NM, Maia LC, Hornbrook MM, Lynch JM, Roy CA. Inhibition of specific immune response by feeding protein antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1977; 55: 526-532.

Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(1): 79–94.

Helm RM. Food allergy animal models: an overview. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 964: 139-50.

Heppell LM, Kilshaw PJ. Immune responses in guinea pigs to dietary protein. I. Induction of tolerance by feeding with ovalbumin. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1982; 68(1): 54-59.

Hirschhorn N, Greenough WB. Progress in oral rehydration therapy. *Sci Am.* 1991; 264: 50–56.

Hooijkaas H, Benner R, Pleasants JR, Wostmann BS. Isotypes and specificities of immunoglobulin produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered antigen-free diet. *Eur J Immunol.* 1984; 14: 1127-1130.

Host A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 13, 2002; Suppl 15:23-28.

Howden CW, Robertson C, Duncan A, Morris AJ, Russell RI. Comparison of different measurements of intestinal permeability in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1991; 86(10): 1445-1449.

Huby RDJ, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicol Scienc.* 2000; 55: 235-246.

Hyun JG, Barrett TA. Oral tolerance therapy in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101: 569–571.

Inobe J, Slavin AJ, Komagata Y, Chen Y, Liu L, Weiner HL. Il-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of Il-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1998; 28(9): 2780-2790.

James SP, Kiyono H. Gastrointestinal lamina propria T cells. In: *Mucosal Immunology.* San Diego: Academic Press; 1999. 381-396.

Johansson SG. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the nomenclature review committee of the world allergy organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(5): 832-836.

Johnson CD, Kudsk KA. Nutrition and intestinal mucosal immunity. *Clin Nutr.* 1999; 18(6): 337-344.

Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 2004; 50: 81-92.

Kaiselien P, Vidal Z, Revillard JP. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1989; 19: 1513-1516.

Kanamori YI, Ishimaru K, Nanno M, Maki K, Ikuta K, Nariuchi H, et al. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ Il-7r+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J Exp Med.* 1996; 184(4): 1449-1459.

Kao YS, Liu FJ, Alexander DR. Diagnóstico laboratorial dos distúrbios do trato gastrintestinal e pancreáticos exócrinos. In: Henry JB. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.* 19ª Ed. São Paulo: Manole; 1999.

Kato T, Owen RL. Structure and function of intestinal epithelium. In: *Mucosal immunology.* San Diego: Academic Press; 1999. 115-132.

King BK, Li J, Kudsk KA. A temporal study of Tpn-induced changes in gut-associated lymphoid tissue and mucosal immunity. *Arch Surg.* 1997; 132(12): 1303-1309.

- Kitamura K, Kiyono H, Fujihashi K, Eldrige JH, Beagley KW, McGhee JR. Isotype-specific immunoregulation. Systemic antigen induces splenic T contrasuppressor cells which support IgM and IgG subclass but not IgA responses. *J Immunol.* 1988; 140: 1385-1394.
- Klinman DM, Ishigatsubo Y, Steinberg AD. Studies on the influence of the internal environment on autoantibody production by B cells. *Cell Immunol.* 1988; 117: 360-368.
- Knippels LM, Van Wijk F, Penninks AH. Food allergy: what do we learn from animal models? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004; 4(3): 205-209.
- Kraus TA, Toy L, Chan L, Childs J, Mayer L. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2004; 126(7): 1771-1778.
- Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol.* 2001; 159(6): 2001-2009.
- Lamont JT. Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 664: 190-201.
- Liao TH, Hamosh PE, Hamosh M. Fat digestion by lingual lipase: mechanism of lipolysis in the stomach and the upper small intestine. *Pediatr Res.* 1984; 18: 402-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
- Lügering A, Kucharzik T. Induction of intestinal lymphoid tissue: the role of cryptopatches. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1072: 210-217.
- Madara JL, Nash S, Parkos C. Neutrophil-epithelial cell interactions in the intestine. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 314: 329-334.
- Madi K, Zaltman C, Takiya CM. Arquitetura da mucosa intestinal e sua plasticidade. In: Elia CS, Souza HSP. *Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito.* São Paulo: Editora Atheneu; 2001. 11-39.
- Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; (1): 21-33.

Marsh MN. Intestinal immunology and food allergy: intestinal manifestations of food hypersensitivity. New York: Raven Press Ltd. 1995; 34: 57-71.

Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut* 1997; 40(6): 782-789.

Mayer L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003; 30(Suppl): S4-12.

Mayer L. Mucosal immunity. *Pediatrics* 2003; 111: 1595-1600.

Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev.* 2004; 4: 1-14.

Mayer L. Mucosal immunity. *Immunol Rev.* 2005; 206: 5-21.

McDermott MR, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immune system. I Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory and genital tissue. *J Immunol.* 1978; 122: 1892-1898.

McDermott MR, Clark DA, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immune system. II. Influence of the estrous cycle on B immunoblasts migration into genital and intestinal tissue. *J Immunol.* 1980; 124: 2536-2539.

McIntyre TM, Strober W. Gut-associated lymphoid tissue: regulation of IgA B-cell development. In: *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. 319-356.

Menezes JS, Mucida DS, Cara DC, Alvarez-Leite JI, Russo M, Vaz NM, et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol.* 2003; 15(3): 447-455.

Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Kleiner G, Lee SY, Sampson HA, et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential Th2-Th1 responses in C3h/HeJ and Balb/C mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111: 1122-1128.

Mowat AM. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today* 1987; 8: 93-97.

Mowat AM, Weiner HL. Oral tolerance: physiological basis and clinical applications. In: *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. 587-618.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 331-341.

- Nagler-Anderson C. Tolerance and immunity in the intestinal immune system. *Crit Rev Immunol*. 2000; 20(2): 103-120.
- Nagler-Anderson C, Shi HN. Peripheral nonresponsiveness to orally administered soluble protein antigens. *Crit Rev Immunol*. 2001; 21(1-3): 121-131.
- Neutra MR, Kraehenbuhl JP. Transepithelial transport and mucosal defense I: the role of M cells. *Trends Cell Biol*. 1992; 2: 134-138.
- Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*. 2001; 2(11): 1004-1009.
- Newberry RD, Stenson WF, Lorenz RG. Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nat Med*. 1999; 5(8): 900-906.
- Newby TJ, Stokes CR, Bourne FJ. Effects of feeding bacterial lipopolysaccharide and dextran sulphate on the development of oral tolerance to contact sensitizing agents. *Immunology* 1980; 41(3): 617-621.
- Newby TJ, Stokes CR. *Local immune responses of the gut*. Florida: CRC Press; 1984.
- Nicholas DB, Otley A, Smith C, Avolio J, Munk M, Griffiths AM. Challenges and strategies of children and adolescents with inflammatory bowel disease: a qualitative examination. *Health Qual Life Outcomes* 2007; 5:28-41.
- Ockner RK, Manning JA. Fatty acid binding protein : role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine. *J Clin Invest*. 1976, 58: 632-41.
- Ohtsuka Y, Sanderson IR. Transforming growth factor-beta: an important cytokine in the mucosal immune response. *Curr Opin Gastroenterol*. 2000; 16: 541-5.
- Ortolani C, Pastorello EA. Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006; 20(3): 467-483.
- O'sullivan M, O'morain C. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006; 20: 561-573.
- Owen RL. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* 1977; 72: 440-451.

Palmer K, Burks W. Current developments in peanut allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006; 6(3): 202-206.

Pappo J, Steger HJ, Owen RL. Differential adherence of epithelial overlying gut associated lymphoid tissue. An ultrastructural study. *Lab Invest*. 1988; 58: 692-697.

Peakman M, Vergani D. *Imunologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. 205.

Peng HJ, Turner MW, Strobel S. Failure to induce oral tolerance to protein antigens in neonatal mice can be corrected by transfer of adult spleen cells. *Pediatr Res*. 1989; 26(5): 486-490.

Perin NM, Pires MMS, Nassar SM. Absorção intestinal de D-xilose em crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. *Gastroenterol Ped*. 2001; 38(4): 261-267.

Prieto RM, Stremmel W, Sales C, Tur JA. Oleic acid uptake by jejunal and ileal rat brush border membrane vesicles. *Eur J Med Res*. 1996; 1(4):199-203.

Podolsky DK. Healing after inflammatory injury-coordination of a regulatory peptide network. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000; 14(Suppl 1): 87-93.

Poussier P, Ning T, Banerjee D, Julius M. A unique subset of self-specific intrainestinal t cells maintains gut integrity. *J Exp Med*. 2002; 195(11): 1491-1497.

Qian JH, Hashimoto T, Fujiwara H, Hamaoka T. Studies on the induction of tolerance to alloantigens II. The abrogation of potentials for delayed-type hypersensitivity responses to alloantigens by portal venous inoculation with allogenic cells. *J Immunol*. 1985; 134: 3656-3661.

Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 15(2): 109-120.

Rana SV, Thapa BR, Pal R. Comparison of D-xylose hydrogen breath test with urinary D-xylose test in indian children with celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2007; 52(3): 681-4.

Raybould HE, Glatzle J, Freeman SL, Whited K, Darcel N, Liou A, et al. Detection of macronutrients in the intestinal wall. *Auton Neurosci*. 2006; 125: 28 – 33.

- Resnick MB, Colgan SP, Patapoff TW, Mrsny RJ, Awtrey CS, Delp-Archer C, et al. Activated eosinophils evoke chloride secretion in model intestinal epithelia primarily via regulated release of 5'-Amp. *J Immunol.* 1993; 151(10): 5716-5723.
- Restani P, Ballabio C, Corsini E, Fiocchi A, Isoardi P, Magni C, et al. Identification of the basic subunit of ara h 3 as the major allergen in a group of children allergic to peanuts. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 94(2): 262-266.
- Roe JH, Rice EW. A photometric method for the determination of free pentoses in animal tissues. *J Biol Chem.* 1948; 173: 507-512.
- Rolston DDK, Mathan VI. Xylose transport in human jejunum. *Dig Dis Sci.* 1989; 34(4): 553-558.
- Sampson HA. Food allergy. In: Company UAW. *Modern nutrition in health and disease*; 1994.1391-1398.
- Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol.* 2007; 42:16–25.
- Sharma DC, Singh PP, Simlot MM. Small intestinal absorptive functions in iron deficient rats. *Dig Dis.* 1973; 18: 73-74.
- Sharpstone D, Neild P, Crane R, Taylor C, Hodgson C, Sherwood R, et al. Small intestinal transit, absorption and permeability in patients with aids with and without diarrhoea. *Gut* 1999; 45:70–76.
- Shub MD, Pang KY, Swann DA, Walker WA. Age-related changes in chemical composition and physical properties of mucus glycoproteins from rat small intestine. *Biochem J.* 1983; 215(2): 405-411.
- Singh G, Chaudry KI, Chudler LC, O'Neill PJ, Chaudry H. Measurement of D-xylose gut absorptive capacity in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1991; 261: R1313-1320.
- Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 470-475.
- Skolnick HS, Conover-Walker MK, Koerner CB, Sampson HA, Burks W, Wood RA. The natural history of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107:367-374.

Slavin AJ, Maron R, Weiner HL. Mucosal administration of Il-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *Jap Society Immunol.* 2001; 13: 825-833.

Stremmel W. uptake of fatty acid by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein. *J Clin Invest.* 1988; 88: 2001-10.

Strid J, Thomson M, Hourihane J, Kimber I, Strobel S. A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. *Immunology* 2004; 113(3): 293-303.

Strid J, Hourihane J, Kimber I, Callard R, Strobel S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(6): 757-66.

Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 495-549.

Strober W, Fuss IJ, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2007; 117:514–521.

Suzuki I, Kitamura K, Kiyono H, Kurita T, Green DR, McGhee JR. Isotype-specific immunoregulation evidence for a distinct subset of contrasuppressor cells for IgA responses in murine peyer's patches. *J Exp Med.* 1986; 164: 501-516.

Swarbrick ET, Stokes CR, Soothill JF. Absorption of antigens after oral immunization and the simultaneous induction of specific systemic tolerance. *Gut* 1979; 20(2): 121-125.

Teixeira GAPB. Seleção de dietas por camundongos normais, imunes e tolerantes a amendoim e castanha de caju. (Dissertação). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1995.

Teixeira GAPB. Um modelo murino de inflamação intestinal crônica - tolerância e imunização oral: antigenicidade versus temporalidade. (Tese). Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2003.

Teixeira GAPB, Paschoal PO, Oliveira VL, Pedruzzi MMB, Campos SMN, Andrade L, et al. Diet selection in immunologically manipulated mice. *Immunobiology* 2007; in press.

Thomas PD, Forbes A, Green J, Howdle P, Long R, Playford R, et al. Guidelines for the investigation of chronic diarrhoea. *Gut* 2003; 52 (Suppl 5): V1-15.

Thomson ABR, Wild G. Adaptation of intestinal nutrient transport in health and disease - part II. *Dig Dis Sci.* 1997; 42(3): 470 – 488.

Tibble J, Bjarnason A. Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2001; 7(4): 460-405.

Titus RG, Chiller JM. Orally induced tolerance. Definition at the cellular level. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1981; 65(3): 323-338.

Trotter PJ, Ho SY, Storch J. Fatty acid uptake by caco-2 human intestinal cells. *Lipid Res.* 1996; 37: 336-46.

van Der Heijden PJ, Stok W, Bianchi AT. Mucosal suppression by oral pre-treatment with ovalbumin and its conversion into stimulation when ovalbumin was conjugated to cholera toxin or its B subunit. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 371b: 1251-1255.

van Wijk F, Hartgring S, Koppelman SJ, Pieters R, Knippels LM. Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara H 1, Ara H 2, Ara H 3 and Ara H 6 in an oral sensitization model. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(9): 1422-8.

van Wijk F, Nierkens S, Hassing I, Feijen M, Koppelman SJ, de Jong GA, et al. The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens. *Toxicol Sci.* 2005; 86:333-341.

Vaz NM, LC Maia, DG Hanson, JM Lynch. Cross-suppression of specific immune responses after oral tolerance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1981; 76(1): 83-91.

Verbrugghe P, Waelput W, Dieriks B, Waeytens A, Vandesompele J, Cuvelier CA. Murine M cells express annexin V specifically. *J Pathol.* 2006; 209(2): 240-9.

Waitzberg DL, Mester M. Significance of bacterial translocation in nutrition. *Arch Gastroenterol.* 1998; 35(2): 110-115.

Walker AW, Isselbacher KJ. Uptake and transport of macromolecules by the intestine. *Gastroenterology* 1974; 67: 531-550.

Wayhs ML, Patrício FS, Amancio OM, Pedroso MZ, Neto UF, Morais MB. Morphological and functional alterations of the intestine of rats with iron-deficiency anemia. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(11): 1631-1635.

Weber CR, Turner JR. Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut* 2007; 56(1):6-8.

Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997; 18(7):335-43.

Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001; 182: 207-214.

Wells HG. Studies on the chemistry of anaphylaxis. III - Experiments with isolated proteins, experimentally those of Hen's egg. *J Infect Dis.* 1911; 8: 147-156.

Wright EM, Hager KM, Turk E. Intestinal sugar transport. In: Johnson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 3rded. New York: Raven Press; 1994.1751–1772.

Wright EM, MartýN GM, Turk E. Intestinal absorption in health and disease—sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17(6): 943–956.

ANEXOS

1. Extração de proteínas do amendoim

Preparo dos reagentes

a) Tampão borato 0,1M pH 10:

- Adicionar 38,12g de borato a 900 mL de água (H₂O) destilada;
- Acertar o pH com hidróxido de sódio (NaOH) para 10;
- Adicionar água qsp 1000mL;
- Foi utilizado o pHmetro QUIMIS[®], modelo Q.400.A.

Borato de sódio =	38,12g
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	
H ₂ O destilada	qsp 1000mL

b) Salina fisiológica, pH 7.2:

- Adicionar o NaCl à 900 mL de água destilada;
- Ajustar o pH entre 7.0 e 7.2;
- Foi utilizado o pHmetro QUIMIS[®], modelo Q.400.

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5g
H ₂ O destilada	qsp 1000mL

2. Dosagem de proteína obtida nos extratos de amendoim

a) Preparo dos reagentes

Reativo 1

Sulfato de cobre (CuSO ₄) 1%	0,5 mL
Tartarato de sódio (C ₄ H ₂ Na ₂ O ₆ · H ₂ O) 2%	0,5 mL
Carbonato de sódio (NaCO ₃) 2%.	50 mL

Reativo de Folin -Diluição

Reativo de Folin	400 μ L
H ₂ O destilada	6000 μ L

b) Elaboração da curva-padrão

- Diluição dos extratos salino e borato.

Tipo de extrato	Diluição
Extrato amendoim salino	Diluição 1:5
Extrato amendoim borato	Diluição 1:10

- Diluição das amostras e fases da dosagem de proteína.

Tubos	Volume (mL)	H ₂ O destilada (mL)	Reativo 1 (mL)	Reativo de Folin (mL)
Amd borato 1	0,05	0,55	4	0,4
Amd borato 2	0,10	0,50	4	0,4
Amd borato 3	0,20	0,40	4	0,4
Amd salino 1	0,05	0,55	4	0,4
Amd salino 2	0,10	0,50	4	0,4
Amd salino 3	0,20	0,40	4	0,4

Esperar 10 minutos

Esperar 50 minutos

4. Preparo dos reagentes – ELISA

- Solução PBS 1X pH 7.2 para *coating*

Cloreto de sódio (NaCl)	8g
Cloreto de potássio (KCl)	0,2g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,15g

Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	0,2g
Água (H_2O)	1000mL

- PBS-gelatina

Gelatina em pó	10g
PBS	1000mL

- Tampão Citrato Fosfato pH 5.0

Ácido cítrico anidro	9,6g
Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)	17,04
H_2O qsp	1000mL

- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 2N

Normalidade =	Peso molecular
	Nº de hidrogênios
$N = 98/2 \rightarrow N = 49\text{N/litro}$	$N_i \times V_i = N_f \times V_f$
$2\text{N} = 4 \text{ mols}$	$98 \times V_i = 4 \times 1$
	$V_i = 0,04 \times 1000$
	$V_i = 41 \text{ mL de } \text{H}_2\text{SO}_4$
Ácido sulfúrico	41 mL
H_2O destilada qsp	1000mL