

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA



ATIVIDADE IMUNO-INFLAMATÓRIA DE OVALBUMINA:
PAPEL DE CÉLULAS E MEDIADORES DO SISTEMA IMUNE
INTESTINAL NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS

Regina Fátima Gonçalves Feitosa

TESE
616.0473
F536a
2003

FORTALEZA-CE

2003

REGINA FÁTIMA GONÇALVES FEITOSA

**ATIVIDADE IMUNO-INFLAMATÓRIA DE OVALBUMINA:
PAPEL DE CÉLULAS E MEDIADORES DO SISTEMA IMUNE
INTESTINAL NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

FORTALEZA - CE

2003

F336a FEITOSA, Regina Fátima Gonçalves

Atividade imuno-inflamatória de ovalbumina: Papel de células e mediadores do sistema imune intestinal na migração de eosinófilos. / Regina Fátima Gonçalves Feitosa. Fortaleza, 2003.

203fs.: 37il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Ovalbumina 2. Cultura de células 3. Mucosa intestinal 4. Migração de leucócitos 5. Edema 6. Mediadores da inflamação I. Lima, Aldo Ângelo Moreira (Orient.). II. Título.

CDD 616.0473

REGINA FÁTIMA GONÇALVES FEITOSA

**ATIVIDADE IMUNO-INFLAMATÓRIA DE OVALBUMINA:
PAPEL DE CÉLULAS E MEDIADORES DO SISTEMA IMUNE
INTESTINAL NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS**

Tese submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

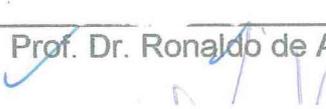
**Aprovada com Louvor em:
11 de fevereiro de 2003**

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Aldo ~~Angelo~~ Moreira Lima - UFC
(Orientador)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha - UECE
(Co-Orientador) 



Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro - UFC

Prof. Dr. Talapala Govindaswamy Naidu - UFC



Prof. Dr. Edgar Carvalho Marcelino - UFBA

Dedico

A DEUS

“Senhor,
Fazei-me instrumento da Tua paz,
Onde houver ódio, que eu leve o amor;
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;
Onde houver discórdia, que eu leve a união;
Onde houver dúvida, que eu leve a fé;
Onde houver erro, que eu leve a verdade;
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;
Onde houver trevas, que eu leve a luz.

Ó mestre,
Fazei que eu procure mais
Consolar que ser consolado,
Compreender que ser compreendido,
Amar que ser amado,
Pois,
É dando que se recebe,
É perdoando que se é perdoado,
E é morrendo que se vive para a vida eterna”.

(São Francisco de Assis)

Meu racionalismo renitente me impedia de dar o braço a torcer, por isso, seguiu-se um poderoso combate no interior de minha alma, entre a vontade que almejava em me entregar a Deus e a razão que resistia em me submeter. Essa batalha interior, entre o meu intelecto apegado a planos ou projetos pessoais e a minha alma sedenta de Deus, iniciou-se em 1999 e foi progressivamente se tornando cada vez mais acirrada até o final do ano de 2002. Isso me levou a intensa inquietação, ansiedade, divisão psicológica, desordens em várias áreas do meu ser e aparecimento de várias doenças psicossomáticas. Nesse período, sofri grandes tribulações interiores e exteriores e até forças misteriosas aproveitando-se das minhas fraquezas momentâneas, tentavam me desanimar com sentimentos de desamor e desesperança. Desânimo, cansaço e stress me sufocavam, mas Deus permitia todas essas provas até um certo limite que eu pudesse suportar e vinha sempre em meu socorro para me consolar com seu amor e sua misericórdia.

Regina Fátima G. Feitosa

Havia em mim duas vontades, uma velha, outra nova; uma carnal e outra espiritual, lutando entre si, e essa rivalidade dilacerava meu espírito.

S. Agostinho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, porque neste período, decidi interferir na minha vida a fim de que me aproximasse mais dEle, mas para tanto tive que ser provada como quem prova ouro no fogo. Foi muito difícil cumprir com minhas obrigações diante de tantas provas interiores e exteriores, acompanhadas de várias doenças psicossomáticas, a que fui submetida no período de 1999-2002, sendo mais intensas nos últimos dois anos (ver REFLEXÕES).

Ao Professor Aldo Ângelo Moreira Lima, pela orientação, paciência, amizade, confiança e compreensão.

Ao Professor Marcos Fábio Gadelha Rocha, pelo seu empenho, disponibilidade, companheirismo e colaboração na realização desse trabalho.

A Professora Ana Maria Sampaio Assreury pela amizade e colaboração nesta produção.

Ao Professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pela colaboração no uso de seu laboratório nos experimentos no modelo de edema de pata.

Aos colegas de pós-graduação, Raimundo Bezerra, George Jimenez, Werlames Landim, Antonio Teles, Sandra Nunes e Graça Fonteles pela amizade e colaboração mútua nos momentos de trabalho e nas reuniões do grupo Pietà. À Graça Fonteles, em especial, pelo apoio espiritual.

Aos bolsistas de iniciação científica, Gilson Melquíades e Eduardo Carubbi pela colaboração na parte experimental.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas/IBIMED, Terezinha Freire, Conceição de Maria, Maria do Carmo Nunes (Carminha), Verônica M^a Oliveira, Kátia M^a Lima, Fabiana M^a Silva, Jociê Andrade, José Amadeus, Manuel Serra Azul, Domingos Barreto e Bento F^{co} de Oliveira, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores, demais colegas de pós-graduação e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta produção.

A meus familiares, em especial, a minha irmã Regiane Gonçalves Feitosa Leal Nunes, que nesse período turbulento me deu bastante apoio, através de incentivos e orações, e a meus pais que sempre tiveram presentes em minhas realizações. À Socorro Maria Barbosa (prima), pelo apoio e colaboração em algumas etapas dessa produção.

A FUNCAP, pelo apoio financeiro.

REFLEXÕES

- Deus não é um ópio que nos atordoa, que nos perturba, que causa desordens em nosso ser, mas, às vezes, permite que nossa vida seja desordenada para que possa ordená-la da maneira dEle.
- O Senhor repreende e educa aqueles que ama. Está sempre a bater a porta de nosso coração (Ap 3, 19-20) e adiamos as coisas de Deus para amanhã, privando-as assim de toda eficácia, porque queremos fazer em primeiro lugar a nossa vontade. Ele na sua infinita misericórdia faz tudo ao seu tempo.
- De algumas almas, o Senhor exige uma grande pureza, por isso exorta: “Aqueles que vem da grande tribulação, lavaram e alvejaram suas roupas no sangue do Cordeiro (Ap 7, 14)”. Também nos ensina que a purificação deve começar pelo coração do homem (Mc 7, 1-23). No Sermão da Montanha diz: “Bem aventurados os puros de coração porque verão a Deus (Mt 5, 8)”.
- É preferível à dor da purificação do que a dor da condenação. O Senhor querendo purificar uma alma, utiliza vários instrumentos. As provações mesmo sendo amargas e dolorosas Deus as permite, sendo importante aceitá-las porque nos levam a maturação e crescimento espiritual. Através do sofrimento nos tornamos mais semelhantes ao Salvador, que passou primeiro pela cruz para ressuscitar. Através da cruz, ressuscitamos para uma vida nova.
- O sofrimento é condição necessária para o conhecimento. Que pode dizer de si ou dos outros quem nunca conheceu a dor? Através do sofrimento, Deus quer sempre nos mostrar algo, que ainda precisamos enxergar e, assim, vamos amadurecendo, nos conhecendo melhor e trilhando o caminho da perfeição, da santidade. É sinal de maturidade humana aceitar o desafio do sofrimento.
- Após uma “noite escura” virá a luz do dia com a aurora da alegria. Essa verdade foi revelada várias vezes por Jesus: Eu vim como a luz do mundo para que todo aquele que crê em mim não permaneça nas trevas (Jo 12, 46). Ficareis tristes, mas vossa tristeza se converterá em alegria (Jo 16, 20). Vós estais tristes agora, mas eu vos verei outra vez e vosso coração se alegrará e ninguém poderá tirar-vos a alegria (Jo 16, 22). No mundo tereis aflições, mas coragem eu venci o mundo (Jo 16, 33).
- A porta de entrada para o Reino do Senhor é a misericórdia. Misericórdia é ligar-se com o coração à miséria do próximo: do pecador, do pobre e do excluído. O “próximo” é essa porta pela qual precisamos passar para encontrar e amar a Deus.
- As causas de muitos sofrimentos corporais encontram-se nas profundezas da alma, sem que a pessoa tenha clara consciência disso. Por isso no período de provas, muitas doenças psicossomáticas tendem a aparecer, e várias recaídas podem ocorrer enquanto as raízes de todos os males não tiverem sido removidas.
- As provas interiores e exteriores tentam nos dominar no período de tribulações. A

pessoa fica presa a si mesma sem saber como sair dessa situação, fica presa dando voltas como em círculos em torno de si mesma ou dos problemas que surgem.

- A pior prisão é a do coração. As feridas e traumas do passado constituem a algema que prende os seres humanos e não os deixa seguir o caminho da perfeição. Carregamos em nosso coração o peso das situações mal resolvidas; das mágoas que não foram perdoadas e isto constitui uma brecha para as trevas penetrarem em áreas do nosso ser e tentarem nos dominar, aproveitando-se da fraqueza humana, procuram escravizar e deprimir progressivamente a pessoa.
- Durante as provações, sente-se vontade de chorar copiosamente, como se as lágrimas lavassem a alma para a libertação e purificação. Quem confia em Deus pela fé em Jesus Cristo, acredita no amor e acredita no poder das lágrimas. Onde há fé existe amor, onde há amor existe paz, onde há paz ali está Deus e onde Deus está nada falta. Os sofrimentos da vida presente não têm comparação alguma com a glória futura que se manifestará em nós (Rm 8, 18).
- Só quem já passou por grandes tribulações sabe como é pesado e difícil cumprir com nossas obrigações quando a alma se encontra nesse estado de tormentos interiores. Desânimo, stress e cansaço nos sufocam. As forças físicas diminuem, a mente se obscurece e a pessoa simplesmente passa a descuidar-se de si mesma, de seu físico, de sua aparência, de suas obrigações, de suas atividades, muitos não compreendem essa situação e acham que a pessoa é descuidada ou relaxada.
- O ser humano não nasce pronto, nasce inacabado. Se investirmos em nosso eu interior, em nossa alma, poderemos ser seres humanos plenos. O sinal de que a nossa experiência de Luz é verdadeira, é quando nos permite descobrir nossa sombra. Cada situação de sombra em nosso ser esconde uma chama divina.
- A vida é curta demais, por isso não devemos fazer dela um campo de batalha contra os nossos irmãos. Com o juízo com que julgardes, sereis também julgados; e com a medida com que tiverdes medido, também vós sereis medidos (Mt 7, 2). Falar bem dos outros é uma virtude, uma nobreza de caráter. Deve-se elogiar uma pessoa na sua presença apenas parcialmente, mas na sua ausência se deve fazê-lo plenamente.
- A palavra falada é como uma abelha: tem mel e tem ferrão. Que nossas palavras sejam doces como o mel e não ardentes e dolorosas como um ferrão. Que as palavras que saem da nossa boca sejam sempre construtivas. Torna-te modelo para os fiéis no modo de falar e de viver, na caridade, na fé, na castidade (I Tm 4, 12).
- No mundo de hoje, precisamos mais do que nunca reavaliar a nossa capacidade de amar. Nunca o mundo comportou tanta depressão, tanta angústia, como nos dias atuais. Quando amamos nos encontramos. Tudo é feito para se completar, para estar junto, para conviver. A essência do verdadeiro amor está em aceitar os lapsos

do outro. A essência de Deus é o Amor e a Vida.

- Nas turbulências da vida, não se deve caminhar sozinho. Caminhar sozinho não é caminhar é desandar. Não se vive bem, não se vive feliz quando nos isolamos e evitamos os relacionamentos. Somos feitos para o encontro. A amizade é uma necessidade do coração humano.
- A oração é a melhor auto-medicação para as nossas angústias e sofrimentos. Sem oração, é fácil escorregar e cair. A oração é a quietude, onde se encontra a luz, o amor e a realização maior. Aprender a orar ou orar melhor, consiste, fundamentalmente, em redescobrir o caminho que leva ao coração. Devemos orar sobretudo por aqueles que nos incomodam ou que não conseguimos perdoá-los verdadeiramente.
- Oração e tribulação são ações quase antagônicas e, portanto, se manifestam de formas diferentes, enquanto a primeira nos conduz a paz, fraternidade e serenidade, a última, nos leva a inquietação, irritação, por vezes, egocentrismo, murmuração e dureza de coração, pois a palavra tribulação vem de tribologia que significa o estudo dos atritos. No entanto, como diz o Santo Padre (Papa), o sofrimento adquire um sentido misteriosamente positivo quando é vivido à luz dos planos de Deus. Nessa perspectiva, no livro de Tobias, essa mensagem é clara: “Todo aquele que vos honra tem a certeza de que sua vida, se for provada, será coroada; que depois da tribulação haverá a libertação... Após a tempestade, mandais a bonança; depois das lágrimas, derramais a alegria” (Tb 3, 21,22).
- O Senhor nos pede que sejamos pacientes e perseverantes nos períodos turbulentos. Através de Sua Palavra, nos exorta: Endireita o coração e sê constante; não tenhas pressa no momento da adversidade (Eclo 2,2). E Deus não fará justiça aos eleitos que clamam por Ele dia e noite, mesmo quando os fizer esperar? (Lc 18, 7). Pela paciência salvareis vossas vidas (Lc 21, 19).
- Assim como as provações tendem a surgir gradativamente, as graças também tendem a acontecer paulatinamente nos anos subseqüentes às provações. As pessoas não suportariam muitas tribulações ou muitas graças de uma só vez. Após um período de provações, podemos renascer para uma vida nova, sarar de todas as feridas, mesmo as mais profundas.

Regina Fátima G. Feitosa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xx
RESUMO	xxiv
ABSTRACT	xxvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância da alergia alimentar	2
1.1.1. O trato gastrointestinal e o desenvolvimento da alergia alimentar	2
1.2. Principais alérgenos alimentares	4
1.3. O sistema imune gastrointestinal	5
1.3.1. Células do sistema imune intestinal	6
Mastócitos	7
Macrófagos	11
Linfócitos	12
Eosinófilos	16
Neutrófilos	17
1.3.2. Células ou agregados do epitélio gastrointestinal	17
Enterócitos	17
Placas de Peyer	18
Células M	19
Células de Paneth	21
1.3.3. Células musculares lisas	22
1.3.4. Neurônios (nervos e fibras nervosas)	23
1.3.5. Mediadores celulares da inflamação	23
Prostaglandinas	24
Leucotrienos	25
Fator de agregação plaquetária (PAF)	26
Aminas biogênicas (serotonina e histamina)	27
Citocinas e quimiocinas	29
1.4. Células e mediadores na imunofisiopatologia de enterotoxinas bacterianas: dados do Laboratório de Doenças Infecciosas, UPC & IBIMED/UFC	35

1.5. Hipersensibilidade intestinal: imunofisiopatologia em animais experimentais	37
1.5.1. Hipersensibilidade intestinal induzida por ovalbumina	38
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	41
2.1. Justificativa	42
2.2. Objetivos	44
2.2.1. Objetivo Geral	44
2.2.2. Objetivos Específicos	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Animais experimentais	46
3.2. Anticorpos, drogas, reagentes e corantes	46
3.2.1. Anticorpos	46
3.2.2. Drogas	46
3.2.3. Reagentes e corantes	47
3.3. Composição das soluções e dos meios de cultura de células do sistema imune gastrointestinal	48
3.4. Protocolo de sensibilização dos animais com ovalbumina	50
3.5. Modelo do edema imune de pata induzido por ovalbumina	50
3.5.1. Avaliação do edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados	50
3.5.2. Determinação das curvas dose-resposta e tempo de sensibilização do edema de pata induzido por ovalbumina	52
3.5.3. Protocolos experimentais para a investigação dos mediadores envolvidos no edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados	52
3.5.4. Estudo histopatológico	52
3.6. Isolamento de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina	53

3.7. Modelo da migração de leucócitos em cavidade peritoneal: avaliação do efeito do sobrenadante da cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina	57
3.7.1. Avaliação da atividade do sobrenadante da cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos não sensibilizados, pseudo-sensibilizados e sensibilizados sobre a migração de leucócitos	59
3.7.2. Protocolo experimental da incubação com ovalbumina na cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	59
3.7.3. Curso temporal do efeito de sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos	60
3.8. Protocolos experimentais para a investigação dos mediadores envolvidos na migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante da cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	60
3.8.1. Aumento da população de macrófagos residentes pelo pré-tratamento com tioglicolato	61
3.8.2. Depleção da população de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80	61
3.8.3. Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com moduladores farmacológicos (drogas anti-inflamatórias, anti-histamínicas e anti-alérgicas) sobre a atividade do sobrenadante das células da lâmina própria intestinal na migração eosinofílica para a cavidade peritoneal	62
3.8.4. Avaliação do envolvimento de citocinas sobre a atividade de sobrenadante das células da lâmina própria intestinal na migração eosinofílica para a cavidade peritoneal	62
3.9. Isolamento de macrófagos, linfócitos, mastócitos eosinófilos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina	63
3.9.1. Isolamento de macrófagos intestinais de ratos sensibilizados e atividade do sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com ovalbumina e pré-incubados com moduladores farmacológicos sobre a migração de eosinófilos	63
3.9.2. Isolamento e cultura de linfócitos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	67
3.9.3. Avaliação <i>in vivo</i> da atividade do sobrenadante obtido da cultura de linfócitos sobre a atividade do sobrenadante de macrófagos	70
3.9.4. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do sobrenadante da cultura de macrófagos quando pré-incubada com o sobrenadante da cultura de linfócitos	70

3.9.5. Isolamento e cultura de mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	71
3.9.6. Avaliação <i>in vivo</i> da atividade do sobrenadante obtido da cultura de mastócitos ou eosinófilos sobre a atividade do sobrenadante de macrófagos	74
3.9.7. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade do sobrenadante da cultura macrófagos quando pré-incubados com sobrenadante da cultura mastócitos ou eosinófilos	74
3.10. Dosagens de citocinas	76
3.10.1. Ensaio para detecção de TNF- α	76
3.10.2. Ensaio para detecção de IL-1 β	78
3.11. Análise da viabilidade celular	80
3.12. Análise estatística	80
4. RESULTADOS	81
4.1. Avaliação farmacológica do edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados	82
4.1.1. Curva dose-efeito do edema de pata induzido por ovalbumina	82
4.1.2. Curva temporal do edema de pata induzido por ovalbumina	82
4.1.3. Efeito dos bloqueadores de derivados do ácido araquidônico no edema induzido por ovalbumina	85
4.1.4. Papel de aminas endógenas sobre o edema induzido por ovalbumina	85
4.1.5. Efeito do composto 48/80 e estabilizadores de mastócitos no edema induzido por ovalbumina	85
4.1.6. Efeito de bloqueadores de síntese de TNF- α no edema induzido por ovalbumina	86
4.1.7. Estudo histopatológico do edema de pata induzido por ovalbumina	93
4.2. Avaliação da atividade do sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sobre a migração celular	95
4.2.1. Avaliação da atividade de sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos normais, sham-sensibilizados e sensibilizados sobre a migração de leucócitos	95

4.2.2. Curso temporal do efeito de sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos	98
4.2.3. Curso temporal de incubação com ovalbumina da cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos	100
4.2.4. Avaliação da participação de células peritoneais residentes no recrutamento de eosinófilos induzido pelo sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	103
4.2.4.1. Avaliação da participação de macrófagos residentes na infiltração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	103
4.2.4.2. Papel de mastócitos na migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	103
4.2.5. Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com moduladores farmacológicos sobre a atividade de sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados no modelo de migração eosinofílica em cavidade peritoneal	107
4.2.5.1. Avaliação de drogas anti-inflamatórias na migração eosinofílica induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	107
4.2.5.2. Avaliação do efeito de anti-histamínicos, anti-serotoninérgicos e estabilizadores de mastócitos sobre a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	109
4.2.5.3. Efeitos de drogas anti-TNF α e anti-IL-1 β sobre a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	111
4.2.5.4. Anticorpo anti-TNF- α <i>in vivo</i> inibe parcialmente a atividade quimiotática para eosinófilos induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados	111
4.3. Avaliação farmacológica da atividade dos sobrenadantes de células isoladas da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados na migração de eosinófilos	114
4.3.1. Resposta migratória utilizando-se sobrenadante de células (macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos) isoladas da lâmina própria intestinal	114

4.3.1.1. Macrófagos e linfócitos, mas não mastócitos e eosinófilos, da lâmina própria em cultura estimulados com ovalbumina liberam uma substância quimiotática para eosinófilos	114
4.3.2. Modulação farmacológica da cultura de macrófagos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina	116
4.3.3. Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com moduladores farmacológicos sobre a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos da lâmina própria de ratos sensibilizados	117
4.3.4. O pré-tratamento dos animais com os sobrenadantes de mastócitos ou eosinófilos da lâmina própria de ratos sensibilizados, mas não de linfócitos, estimulados com ovalbumina inibiu a atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos	119
4.3.5. Efeito da incubação da cultura de macrófagos estimulados por ovalbumina com o sobrenadante de linfócitos, mastócitos ou eosinófilos de culturas também estimuladas com ovalbumina	119
4.4. Análise dos sobrenadantes de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos estimulados com ovalbumina, para investigação da presença de TNF- α e IL-1 β por meio de ELISA	123
5. DISCUSSÃO	125
5.1. Discussão dos resultados referentes a atividade pró-inflamatória de ovalbumina em ratos sensibilizados no modelo de edema de pata	126
5.2. Discussão dos resultados referentes aos efeitos dos sobrenadantes de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina sobre a migração de eosinófilos	130
6. CONCLUSÕES	149
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regulação da imunidade mediada por anticorpos e hipersensibilidade retardada	15
Figura 2	Trajetos que permitem que alterações no lúmen intestinal sejam retransmitidas para o sistema imunológico da mucosa	21
Figura 3	Produção de citocinas e vias de diferenciação e proliferação de linfócitos T (CT) em resposta a antígenos	34
Figura 4	Modelo do edema de pata	51
Figura 5A	Isolamento de células da lâmina própria intestinal (CLPI)	55
Figura 5B	Microfotografia de células da lâmina própria intestinal	56
Figura 6	Modelo de migração celular em cavidade peritoneal de ratos	58
Figura 7	Isolamento de macrófagos da lâmina própria intestinal, estimulação da cultura de macrófagos e obtenção do sobrenadante	65
Figura 8	Microfotografia de macrófagos da lâmina própria intestinal de ratos	66
Figura 9	Isolamento de linfócitos da lâmina própria intestinal	68
Figura 10	Microfotografia de linfócito da lâmina própria intestinal de ratos	69
Figura 11	Isolamento de mastócitos ou eosinófilos da lâmina própria intestinal	72
Figura 12	Microfotografias de mastócitos e eosinófilo isolados da lâmina própria intestinal de rato	73
Figura 13	Manuseio dos sobrenadantes de macrófagos, linfócitos, mastócitos ou eosinófilos intestinais <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>	75
Figura 14	Ensaio para detecção de TNF- α	77
Figura 15	Ensaio para detecção de interleucina-1 β	79
Figura 16	Curva dose-efeito da sensibilização dos ratos antes da indução do edema de pata induzido por ovalbumina (ova)	83
Figura 17	Curva temporal de sensibilização de ratos antes da indução do edema de pata induzido por ovalbumina	84
Figura 18	Inibição por difenidramina (difen; anti-H1) de edema de pata induzido por injeção intraplantar de ovalbumina (ova; 10 μ g/pata) em ratos sensibilizados	91

Figura 19	Inibição por ciproheptadina (cipro; anti-H1/5-HT2) de edema de pata induzido por injeção intraplantar de ovalbumina (ova; 10 µg/pata)	92
Figura 20	Estudo histopatológico de patas de ratos com infiltrado leucocitário no local do edema induzido por ovalbumina.	94
Figura 21	Efeito do sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas ou não com ovalbumina, de ratos não sensibilizados, pseudo-sensibilizados ou sensibilizados com ovalbumina (ova) sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos não sensibilizados	96
Figura 22	Curva do tempo de estímulo na cavidade peritoneal com o sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos	99
Figura 23	Efeito do sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal (SobCLPI) estimuladas ou não com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados com ovalbumina sozinha ou com ova+hidróxido de alumínio sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos normais ou sensibilizados	101
Figura 24	Curva tempo de incubação com ovalbumina na cultura de células da lâmina própria intestinal cujos sobrenadantes foram avaliados sobre a migração eosinofílica na cavidade peritoneal de ratos normais	102
Figura 25	Avaliação do aumento da população de macrófagos peritoneais sobre a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova), de ratos pseudo-sensibilizados ou sensibilizados	105
Figura 26	Avaliação da depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 sobre a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal (CLPI) estimuladas com ovalbumina (ova), de ratos pseudo-sensibilizados ou sensibilizados	106
Figura 27	Atividade moduladora de drogas anti-inflamatórias na migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados	108
Figura 28	Atividade moduladora de drogas antialérgicas e anti-histamínicas na migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados	110
Figura 29	Talidomida, mas não pentoxifilina, inibe a migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados	112

Figura 30	Anticorpo anti-TNF- α <i>in vivo</i> , mas não anti-IL-1 β ou anti-IL1 β , inibe a atividade quimiotática para eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados	113
Figura 31	Efeito dos sobrenadantes de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina (ova), de ratos sensibilizados, sobre a migração de eosinófilos	115
Figura 32	O sobrenadante de macrófagos de ratos sensibilizados isolados da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina (ova) induziu migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos. Essa resposta migratória foi inibida por dexametasona, indometacina, ciproheptadina, metisergida, difenidramina, mas não por cetotifeno	118
Figura 33	O sobrenadante de mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina (ova), mas não de linfócitos, inibem a atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com ova	121
Figura 34	O sobrenadante de mastócitos ou eosinófilos intestinais estimulados com ovalbumina (ova), mas não de linfócitos, reduz a atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com ova	122
Figura 35	Análise do sobrenadante de macrófagos intestinais de ratos normais (SobM Φ s-RN) ou sensibilizados (SobM Φ s-RS) estimulados com ovalbumina, para avaliar os níveis de TNF- α e IL-1 β por ELISA, liberados para o sobrenadante	124
Figura 36	Mecanismo proposto para a modulação da migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Meio de cultura Dulbecco	48
Tabela 2	Solução de Hank	48
Tabela 3	Solução de Tioglicolato 3%	48
Tabela 4	Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	49
Tabela 5	Líquido (ou corante) de Turk	49
Tabela 6	Solução de Albumina 3%	49
Tabela 7	Soluções de Percoll para Isolamento de Eosinófilos	50
Tabela 8	Anti-inflamatórios clássicos não inibiram o edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.	87
Tabela 9	Efeito de drogas anti-histamínicas e anti-alérgicas sobre o curso temporal do edema induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.	88
Tabela 10	Efeito do estabilizador de mastócitos (cromolina) sobre o curso temporal do edema induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.	89
Tabela 11	Drogas anti-TNF- α não inibiram o edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados	89
Tabela 12	Efeito de clorpromazina (anti-TNF/anti-5HT ₂) sobre o curso temporal do edema induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados	90
Tabela 13	O sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal não induziu migração de neutrófilos, mononucleares e mastócitos na cavidade peritoneal de ratos, quando foram comparados os grupos estimulados ou não, com ovalbumina	97
Tabela 14	Efeito de drogas anti-inflamatórias sobre a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos intestinais, estimulados com ovalbumina, de ratos sensibilizados	117

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μl	Microlitro
AINEs	Antiinflamatórios não-esteróides
$\text{Al}(\text{OH})_3$	Hidróxido de Alumínio
Anti-5-HT	Anti-serotoninérgico
Anti-H	Anti-histamínico
Anti-IL-1 β	Anticorpo monoclonal anti-interleucina-1 beta
Anti-TNF- α	Anticorpo monoclonal anti-fator de necrose tumoral- α
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASTBN	Ácido sulfônico trinitrobenzeno
5-HT	5-Hidroxitriptamina ou serotonina
Ceto	Cetotifeno
Cipro	Ciproheptadina
Cis-LT	Cisteinil-leucotrieno
CLPI	Células da lâmina própria intestinal
COX-1 e COX-2	Cicloxigenases 1 e 2
CromoS	Cromoglicato de sódio ou cromolina
Dexa	Dexametasona
Difen	Difenidramina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Eosinófilos

EAF	Epitélio associado ao folículo
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito
H	Histamina
HEPES	(N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N`-[2-ethane-sulfonic acid])
HTR	Hipersensibilidade do tipo retardada
i.p.	Via intraperitoneal
i.pl.	Via intraplantar
ICAM-1	Moléculas de adesão intercelular 1
IgA, IgE, IgG	Imunoglobulinas A, E e G
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 beta
Indo	Indometacina
L	Linfócito
LIE	Linfócitos intra-epiteliais
LLPI	Linfócitos da lâmina própria intestinal
Lora	Loratadina
LTB4, LTC4, LTD4, LTE4	Leucotrienos B4, C4, D4, E4
M	Molar
M (nos gráficos)	Mastócito
M ϕ	Macrófago

MCP-1	Proteína quimioatraente para monócitos 1
ME	Migração de eosinófilos
Melox	Meloxicam
Meter	Metergoline
Metis	Metisergida
µl	Microlitro
mg/kg	Miligrama/quilograma
MK-886	<i>L-663,536 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 dimethylpropanoic acid</i>
ml	Mililitros
MMI	Mastócitos da mucosa intestinal
MTC	Mastócitos do tecido conjuntivo
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
NK	Células matadoras naturais
N.Sens.	Não sensibilizado
OVA ou ova	Ovalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Pentox	Pentoxifilina
PGD2	Prostaglandina da série D2
P.Sens.	Pseudo-sensibilizado
Quina	Quinacrina
RMCP-II	Protease II de mastócitos de rato
RN	Ratos normais ou não sensibilizados
RS	Ratos sensibilizados
s.c.	Via subcutânea

Sens.	Sensibilizado
SIMC	Sistema imune das mucosas comum
Sob	Sobrenadante
SobCLPI	Sobrenadante de células da lâmina própria intestinal
SobM ϕ s	Sobrenadante de macrófagos
Talidom	Talidomida
Sob (L+M ϕ)	Sobrenadante de macrófagos pré-incubados em cultura com sobrenadante de linfócitos
Sob (M+M ϕ)	Sobrenadante de macrófagos pré-incubados em cultura com sobrenadante de mastócitos
Sob (E+M ϕ)	Sobrenadante de macrófagos pré-incubados em cultura com sobrenadante de eosinófilos
Tg	Tioglicolato
TGF- β	Fator de transformação do crescimento-beta.
TGI	Trato gastrointestinal
Th	Linfócito T auxiliar
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Moléculas de adesão de célula vascular 1
v.o.	Via oral
WEB 2086	Triazolobenzodiazepina

RESUMO

ATIVIDADE IMUNO-INFLAMATÓRIA DE OVALBUMINA: PAPEL DE CÉLULAS E MEDIADORES DO SISTEMA IMUNE INTESTINAL NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS – REGINA FÁTIMA GONÇALVES FEITOSA. Tese apresentada ao Curso de pós-graduação em Farmacologia do Depto de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Farmacologia. Data da defesa: 11 de fevereiro de 2003. Orientador: Aldo Ângelo Moreira Lima.

Ratos são comumente usados em modelos de anafilaxia, principalmente em anafilaxia intestinal. Os mecanismos de hipersensibilidade são complexos e não estão completamente esclarecidos. Os objetivos deste estudo foram: a) investigar o efeito pró-inflamatório da ovalbumina no modelo de edema de pata em ratos sensibilizados; b) identificar os mediadores envolvidos nesta imuno-inflamação e, c) investigar o envolvimento de células do sistema imune intestinal e seus mediadores na fisiopatologia da hipersensibilidade intestinal induzida por ovalbumina (ova). O edema de pata foi induzido por ova e sua modulação farmacológica foi estudada. Ratos Wistar previamente sensibilizados (14 a 18 dias) com ova (30mg, i.p.) ou pseudo-sensibilizados com hidróxido de alumínio (controle). Os volumes das patas foram mensurados antes dos estímulos antigênicos e 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de ova (10 µg/pata). O pré-tratamento s.c. com dexametasona, difenidramina, ciproheptadina, clorpromazina, ou metisergida inibiram significativamente ($p < 0,05$) o edema de pata. NDGA, indometacina, MK-886, WEB 2086, cetotifeno e meclizina não inibiram este edema. A talidomida e pentoxifilina foram ineficazes no controle do edema induzido por ovalbumina. As células totais da lâmina própria intestinal (CLPI) foram isoladas de ratos Wistar pré-sensibilizados com ova (30µg/rato) + $Al(OH)_3$. O intestino delgado foi lavado e seccionado em pequenos fragmentos. As CLPI foram isoladas, através de um método enzimático, e incubadas por 1 h com ova (10µg/ml). Em seguida, foram lavadas e incubadas, por 2 h, no meio de cultura Dulbecco. O sobrenadante (Sob) oriundo de 10^7 células/ml foi testado no modelo de migração celular, em cavidade peritoneal. Os moduladores farmacológicos ou PBS foram injetados 30 min. antes do estímulo e os anticorpos monoclonais foram incubados com o sobrenadante 30 min. antes da administração. Os animais foram sacrificados 4h depois do estímulo, sendo o exsudato peritoneal coletado para a contagem celular total e diferencial. Os dados estão apresentados como média (eosinófilos $\times 10^6$ /ml) \pm EPM. Dexametasona (0,5mg/kg; $0,429 \pm 0,07$), quinacrina (20mg/kg; $0,395 \pm 0,05$), indometacina (2mg/kg; $0,30 \pm 0,05$), WEB 2086 (20mg/kg; $0,213 \pm 0,01$), ciproheptadina (2 mg/kg; $0,354 \pm 0,10$), metergoline (5mg/kg; $0,411 \pm 0,04$), difenidramina (10mg/kg; $0,49 \pm 0,07$), loratadina (10mg/kg; $0,617 \pm 0,06$), montelucaste sódico (10mg/kg; $0,374 \pm 0,02$), talidomida (90mg/kg; $0,64 \pm 0,03$); cetotifeno (10mg/kg; $0,375 \pm 0,06$); e anticorpo anti-TNF- α (50mg/kg) inibiram ($p < 0,05$) a migração de eosinófilos induzida por Sob de CLPI ($1,062 \pm 0,15$). A cromolina (20mg/kg), pentoxifilina (90mg/kg), NDGA (50mg/kg); meloxicam (10mg/kg) e anticorpo anti-IL-1 β (100µg/kg) não inibiram esse efeito. Macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos intestinais foram isolados de ratos sensibilizados e estimulados com ovalbumina (10µg/ml). Em seguida, os sobrenadantes destas células foram testados no modelo de migração celular em cavidades peritoneais de ratos e dosagens de IL-1 β e TNF- α , por ELISA. Observou-se que o Sob de macrófagos ou linfócitos induz uma potente migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal. Investigou-se, então, o papel de macrófagos

(Mφs) intestinais e seus mediadores na migração de eosinófilos em cavidades peritoneais de ratos. Estas células foram incubadas *in vitro*, por 30 min, com vários bloqueadores farmacológicos na concentração de 10^{-5} M ou 10^{-6} M antes do estímulo, com exceção de montelucaste e WEB 2086 que foram injetados *in vivo* 30 min antes do Sob. O Sob de Mφs foi coletado e usado na migração celular e dosagens de citocinas. Dexametasona ($0,43 \pm 0,11$), indometacina ($0,46 \pm 0,07$), montelucaste sódico ($0,57 \pm 0,01$), metisergida ($0,31 \pm 0,02$), ciproheptadina ($0,57 \pm 0,04$) e difenidramina inibiram ($p < 0,05$) a migração de eosinófilos induzida por Sob de Mφs ($1,45 \pm 0,14$), enquanto cetotifeno e WEB 2086 não inibiram este processo. Os resultados da migração celular sugerem que TNF- α e leucotrienos são importantes fatores quimiotáticos para eosinófilos neste modelo experimental. Prostaglandinas, PAF, histamina e 5-HT também participam na migração de eosinófilos induzida pelo Sob de CLPI e, mais especificamente, IL-1 β , prostaglandinas e 5-HT, na resposta migratória induzida por Sob de Mφs. Ademais, também testou-se a combinação de Sob de Mφs, *in vitro* e *in vivo*, com os sobrenadantes de mastócitos, eosinófilos ou linfócitos. Os resultados demonstraram que mastócitos e eosinófilos intestinais modulam negativamente a migração eosinofílica induzida pelo Sob de macrófagos intestinais. Em síntese, sugeriu-se que o edema alérgico é mais sensível às drogas anti-5-HT, principalmente anti-5-HT₂, sugerindo que o mediador principal desta resposta inflamatória é 5-HT. E que macrófagos, linfócitos, mastócitos, eosinófilos e seus respectivos mediadores participam na modulação da hipersensibilidade intestinal induzida por ovalbumina.

ABSTRACT

IMMUNOINFLAMMATORY ACTIVITY OF OVALBUMIN: THE ROLE OF CELLS AND MEDIATORS OF THE INTESTINAL IMMUNE SYSTEM IN EOSINOPHIL MIGRATION – REGINA FÁTIMA GONÇALVES FEITOSA. Thesis submitted to the Post-Graduate Course in Pharmacology of the Department of Physiology and Pharmacology of the Faculty of Medicine – Federal University of Ceará, Brazil; in partial fulfillment for the Doctorate degree in Pharmacology. Date of Thesis Defense: 11 February, 2003. Supervisor: Aldo Ângelo Moreira Lima.

Rats are commonly used in anaphylaxis models, mainly in the intestinal anaphylaxis; whose mechanisms are very complex and are not clearly defined. The objectives of this study were: a) to investigate the pro-inflammatory effect of ovalbumin (OVA) by the hind paw edema model in sensitized rats; b) to identify the mediators involved in this immune-inflammatory reaction; and c) to evaluate the involvement of the cells and mediators of the intestinal immune system, in the pathophysiology of the intestinal hypersensitivity induced by OVA. The pharmacological modulation of hind paw edema was studied in Wistar rats immunized with OVA (30 μ g, with Al(OH)₃; i.p), 14 to 18 days prior to the evaluation; using animals sham-sensitized with aluminum hydroxide as controls. The paw volumes were measured prior to the antigenic stimuli and at 1, 2, 3 and 4 hours after the intraplantar injection of 10 μ g/paw of OVA. The subcutaneous applications of dexamethasone, diphenhydramine, cyproheptadine, chlorpromazine or methysergide significantly inhibited ($p < 0.05$) the allergic paw reaction. NDGA, indomethacin, MK-886, WEB 2086, ketotifen and meclizine failed to block this reaction; as also thalidomide and pentoxifylline. The intestinal lamina propria cells (LPIC) were isolated from rats pre-sensitized as described, by enzymatically digesting cut and washed small intestine. The isolated cells were washed and incubated with 10 μ g of OVA for 60 min; followed by a subsequent incubation for 2 hours in Dulbecco medium. The supernatant (Sup) from 10⁷ cells/mL was tested in the protocol for peritoneal cellular migration. Pharmacological mediators, or PBS, were injected 30 min before stimulus. The Sup was incubated with the monoclonal antibodies (MoAB) for 30 min before the administration. The animals were sacrificed 4 hr after stimulation, the peritoneal fluid was collected for total and differential countings of cells and the results were expressed as means of 10⁶ eosinophils \pm SE. Dexamethasone (0.5mg/kg, 0.429 \pm 0.07); quinacrine (20mg/kg, 0.395 \pm 0.05); indomethacin (2mg/kg, 0.30 \pm 0.05); WEB 2086 (20mg/kg, 0.213 \pm 0.01); cyproheptadine (2mg/kg, 0.354 \pm 0.10); metergoline (5mg/kg, 0.411 \pm 0.04); diphenhydramine (10mg/kg, 0.49 \pm 0.07); loratadine (10mg/kg, 0.617 \pm 0.06); montelukaste sodium (10mg/kg, 0.374 \pm 0.02); thalidomide (90mg/kg, 0.64 \pm 0.03); ketotifen (10mg/kg, 0.375 \pm 0.06) and anti- IL-1 β antibody (50mg/kg) inhibited ($p < 0.05$) eosinophil migration evoked by the Sup of LPIC; compared to the control (1.062 \pm 0.15). Cromolin (20mg/kg); pentoxifylline (90mg/kg); NDGA (50mg/kg); meloxicam (10mg/kg) and anti – IL-1 β (100mg/kg) failed to inhibit the edema. The supernatants of the macrophages, lymphocytes, mast cells and eosinophils from intestinal lamina propria of sensitized rats were individually tested for their eosinophil migration induction, and for their IL-1 β and TNF- α contents by ELISA. The supernatants of macrophages and lymphocytes were found to induce a potent eosinophil migration. In order to investigate the roles of macrophage and its mediators in eosinophil migration induction, the cells were incubated, prior to stimulation, for 30 min with pharmacological blockers, at the concentrations of 10⁻⁵M or 10⁻⁶M; with the exception of montelukaste (10mg/kg) and WEB 2086 (20mg/kg), which were injected *in vivo* 30 min before the Sup. The macrophage supernatants were then collected for cell migration studies in the

peritoneal cavity, and for the evaluation of their cytokine contents. Dexamethasone (0.43 ± 0.11); indomethacin (0.46 ± 0.07); montelukaste (0.57 ± 0.01); methylsergide (0.31 ± 0.02); cyproheptadine (0.57 ± 0.04) and diphenhydramine inhibited ($p < 0.05$) eosinophil migration induced by Sups from macrophages (1.45 ± 0.14); as against ketotifen and WEB 2086 which failed to do so. Analyses of macrophage Sups for IL-1 β and TNF- α showed that the stimulus induced their release into the supernatants. These data suggest that TNF- α and leukotrienes are the chemotactic factors for eosinophils, in the experimental model employed. In addition, prostaglandins; PAF; histamine and 5-HT also appear to be important for the eosinophil migration induction by the supernatants of LPIC from sensitized rat; in particular, IL-1 β ; prostaglandins and 5-HT in the eosinophil migration induced by macrophage Sups. In addition, combinations of Sup from macrophages with that of mast cells, eosinophils or lymphocytes were also tested, both *in vivo* and *in vitro*. These evaluations demonstrated that intestinal mast cells and eosinophils modulate negatively the eosinophil migration induced by the intestinal macrophage supernatants. In conclusion, these studies reveal that allergic edema reaction is more sensitive to anti-5-HT drugs, in particular to the anti-5-HT₂; suggesting that the principal mediator of this inflammatory response is serotonin; and that macrophages, lymphocytes, mast cells, eosinophils and their respective mediators are also involved in the modulation of intestinal hypersensitive reaction induced by ovalbumin.

1. INTRODUÇÃO

A fé humana é absolutamente necessária à vida. A ciência e a cultura, mais do que em suas próprias experiências e demonstrações, baseiam-se na fé que temos nos livros e nos mestres, mas é a fé divina que fortalece e ilumina a inteligência.

Alejandro F. Diaz

(Livro: COMO VIVER EM PAZ)

1. Introdução

1.1. Importância da alergia alimentar

A avaliação de reações adversas a alimentos, envolvendo uma resposta imune anormal a antígenos alimentares, permanece como importante parte do estudo da alergia e imunologia. A alergia alimentar é uma forma de intolerância em que existe evidência de reação imunológica anormal aos alimentos.

As reações adversas a alimentos constituem um problema particular em infantes e crianças jovens (incidência de 2-8% comparado com 1-2% em adultos). Aproximadamente 5% das crianças com menos de 3 anos e 1,5% da população em geral, experimentam desordens alérgicas a alimentos (SUDO *et al.*, 1997; SAMPSON, 1997). Podendo apresentar um grande espectro de reações clínicas, incluindo sintomas gastrointestinais e cutâneos (SUDO *et al.*, 1997). Podem também causar sintomas do trato respiratório, incluindo obstrução brônquica e rinite (BJORKSTEN, 1996), bem como asma (CHANDRA, 1997; PEARL, 1997). Algumas vezes, podem causar sintomas anafiláticos sistêmicos (SUDO *et al.*, 1997; HELM; BURKS, 2000). Os sintomas são mais freqüentes em indivíduos atópicos que freqüentemente apresentam alergias a antígenos não alimentares, tais como: pólen e poeira (CROWE; PERDUE, 1992).

Vários estudos têm confirmado a existência de reações alérgicas no intestino em casos de alergia alimentar. Contudo, os métodos usados para confirmar o diagnóstico de alergia intestinal são ainda insuficientes. Além disso, vários aspectos precisam ser melhores elucidados, como os mecanismos alérgicos independentes de IgE na alergia intestinal, o impacto de reações cruzadas com outros alérgenos e a relação com as doenças inflamatórias intestinais, tais como: doença de Crohn, colite ulcerativa, doença celíaca e síndrome do intestino irritável (BISCHOFF *et al.*, 2000).

Atualmente, as pesquisas têm focalizado, em especial, a identificação e a caracterização de proteínas alergênicas, bem como, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratar essas desordens.

1.1.1. O trato gastrointestinal e o desenvolvimento da alergia alimentar

O trato gastrointestinal (TGI) é um dos grandes sítios de exposição a antígenos ambientais. Ele sozinho compreende quase 400 m² de superfície, aproximadamente

200 vezes maior do que a da pele (MOWAT; VINEY, 1997). O TGI é o maior órgão linfóide do organismo, abriga linfócitos e macrófagos ativados, estando exposto a uma grande carga antigênica, como: bactérias, vírus, protozoários e antígenos de alimentos ingeridos.

A função do trato gastrointestinal relacionada à monitoração e proteção do interior do hospedeiro, contra invasores é denominada de barreira intestinal. Uma variedade de mecanismos específicos ou não específicos entram em operação para estabelecer a barreira do hospedeiro, esses incluem mecanismos luminais e enzimas digestivas, as células epiteliais unidas com as junções firmes ou “tight junctions” e a ligação entre estas e o sistema imune intestinal (DE MEO *et al.*, 2002).

A ingestão de alérgenos alimentares, geralmente, leva a um estado de não resposta imunológica, isto é, tolerância oral, apesar de ocorrer absorção intestinal de pequena quantidade de macromoléculas imunologicamente intactas em adultos normais. Por outro lado, em crianças e animais jovens a relativa deficiência de células T supressoras na baixa idade pode contribuir para a incidência aumentada de hipersensibilidade (CROWE; PERDUE, 1992), visto que a imaturidade imunológica ou intestinal está associada com captação aumentada de macromoléculas (SAMPSON, 1997).

Em adição, as infecções entéricas podem causar ruptura na barreira epitelial, resultando na absorção de antígeno luminal intacto (macromolécula), formação de IgE e desenvolvimento de uma reação alérgica após exposição antigênica secundária. A IgE circulante produzida pode se ligar a receptores sobre mastócitos ou basófilos, e possivelmente outras células, que após ativados liberam mediadores (HERZ *et al.*, 2000; FASANO, 2001). Em geral, a ruptura da barreira epitelial após injúrias de várias causas, incluindo drogas antiinflamatórias e stress oxidativo, envolve mecanismos tais como depleção de trifosfato de adenosina e lesão do citoesqueleto da célula epitelial que regula as junções firmes. Várias evidências ligam a disfunção da barreira intestinal à características de um sistema que envolve multiórgãos como ocorre na sepse e na desregulação imune (DE MEO *et al.*, 2002), pois a macromolécula antigênica atravessando a barreira intestinal e atingindo a circulação sistêmica poderá desencadear reações alérgicas em muitos órgãos (pele, pulmões olhos e ouvidos)

Em geral, somente proteínas com peso molecular de 10.000 a 60.000 daltons são capazes de agir como antígenos (SAMPSON, 1997). Essas substâncias podem atravessar o epitélio através do espaço intercelular (transporte paracelular, via

junções firmes ou “tight junctions”), das células epiteliais (transporte transcelular) ou de células epiteliais especializadas (células M) que recobrem as placas de Peyer (MCKAY; PERDUE, 1993; NEUTRA; KRAEHENBUHL, 1994).

O epitélio apresenta importante papel protetor, age como uma barreira passiva para evitar captação de grandes moléculas e patógenos. Embora já seja evidente que as funções do epitélio intestinal, como a secreção iônica, constituem uma resposta de defesa do hospedeiro na presença de antígenos, micróbios, e outras substâncias nocivas, tais respostas são mediadas pela ativação de células imunes na mucosa causando a liberação de mediadores químicos que agem direta ou indiretamente sobre o epitélio. A produção local de imunoglobulina A (IgA) também apresenta importância na prevenção de alergias alimentares por bloquear a captação antigênica (NEUTRA; KRAEHENBUHL, 1994). Outros fatores protetores envolvem as células imunocompetentes da mucosa, em especial, eosinófilos e linfócitos citotóxicos (HIRSCHBRUCH; TORRES, 1997).

Em síntese, o epitélio apresenta importante papel na resposta imunológica à exposição luminal antigênica que pode resultar em tolerância, imunidade protetora ou reações de hipersensibilidade. Muitos estudos têm investigado o papel de alguns mediadores inflamatórios individuais ou em associação no controle da função epitelial. No entanto, o impacto da liberação sequencial ou simultânea de múltiplos mediadores de diversas células do sistema imune intestinal sobre a função epitelial ainda não é bem compreendido.

1.2. Principais alérgenos alimentares

Várias proteínas já foram relacionadas como causa de alergia alimentar, destacando-se, entre elas, as do leite de vaca, soja, trigo, frango, arroz, peixe, ovo, batata, cenoura e frutos do mar (SABRÁ *et al.*, 1995).

Poucos antígenos são responsáveis pela maioria das reações alérgicas associadas aos alimentos. A maioria dos pacientes é alérgico a um tipo específico de alimento. A alergia a muitos tipos de alimentos é geralmente incomum. Em lactentes e crianças maiores, a maioria das reações alérgicas é associada com proteínas do leite de vaca, ovo, amendoim e trigo (BURKS; SAMPSON, 1993; RUNSAENG; METCALFE, 1998). Nos adultos, as reações alérgicas são associadas com proteínas do amendoim, castanhas, peixe, mariscos e ovo (RUNSAENG; METCALFE, 1996; METCALFE, 1998). As proteínas alérgicas provenientes dos alimentos que

apresentam pesos moleculares variando entre 10.000 e 60.000 daltons, apresentam resistência à elevada temperatura, a pH ácido ou a degradação por proteases.

1.3. O sistema imune gastrointestinal

O sistema imune das mucosas consiste de tecido linfóide associado com os tratos gastrointestinal, respiratório e urogenital, bem como, as glândulas que são ligadas a esses órgãos, tais como: glândulas lacrimais, salivares, mamárias e o pâncreas. Quantitativamente, os tecidos linfóides associados a esses sítios, em particular ao trato gastrointestinal, contêm a maioria dos tecidos linfóides do organismo (SIGAL; RON, 1994). O fato de que a resposta imune gerada em um sítio, tal como o trato gastrointestinal, leva a geração de células linfóides que migram para outros sítios das mucosas a fim de gerar uma resposta imune protetora a todas as mucosas, leva à noção de um sistema imune das mucosas único (SIGAL; RON, 1994; DUNKLEY *et al.*, 1995; NEUTRA *et al.*, 1996).

O sistema imune do intestino apresenta importante papel na resistência do hospedeiro aos antígenos da microbiota local e na interação do hospedeiro com os antígenos ambientais, como antígenos de alimentos. O tecido linfóide que forma o sistema imune da mucosa intestinal pode ser categorizado com base anatômica e funcional em três populações principais: placas de Peyer, células linfóides da lâmina própria intestinal (LLPI) e linfócitos intra-epiteliais (LIE).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) exhibe diferentes compartimentos funcionais, com um ramo aferente representado por folículos linfóides agregados e dispersos (placas de Peyer) e um ramo eferente representado pelos tecidos linfóides difusos na lâmina própria (GALPERIN; GERSHWIN, 1997) e no próprio epitélio intestinal (MOWAT; VINEY, 1997). Após a ativação induzida por antígeno, ocorre proliferação e diferenciação dos folículos linfóides, então, os linfócitos ativados e memória migram da placa de Peyer para os linfonodos mesentéricos através dos tecidos linfóides difusos, em seguida, atingem a corrente sanguínea via linfa e finalmente chegam à lâmina própria intestinal através de vasos sanguíneos especializados que expressam moléculas de adesão (GALPERIN; GERSHWIN, 1997; MOWAT; VINEY, 1997).

O tecido que constitui a mucosa intestinal contém uma ampla variedade de células, como: endoteliais, do estroma, neuroendócrinas e imunológicas. O sistema imune das mucosas é a primeira linha de defesa contra antígenos estranhos,

incluindo antígenos da dieta e microbianos. Em condições normais, o sistema imune das mucosas consiste de sítios indutivos e efetores para manter a homeostase imunológica apropriada entre os ambientes da mucosa e do hospedeiro (KIYONO *et al.*, 2001).

A lâmina própria intestinal consiste de um tecido conjuntivo disperso entre a camada muscular da mucosa e a camada epitelial. Normalmente, contém grande número de células, sobretudo linfócitos, plasmócitos e macrófagos, em adição, mastócitos e eosinófilos são também normalmente encontrados neste espaço (SIGAL; RON, 1993). A lâmina própria também contém muitos folículos linfóides isolados, sendo que agregados maiores são encontrados nas placas de Peyer (LESSOF, 1988). Os linfócitos T e B recirculam entre três compartimentos no trato gastrointestinal (lâmina própria, placas de Peyer e regiões interepiteliais). Em contraste aos linfócitos, os eosinófilos gastrointestinais, em condições normais, são encontrados somente na lâmina própria (ROTHENBERG *et al.*, 2001).

A camada epitelial apresenta, além dos enterócitos convencionais, muitas células linfóides de todos os tipos, bem como, uma única população de células epiteliais especializadas (células M) cuja função parece ser a captação e o transporte de antígeno para os tecidos linfóides associados (MOWAT; VINEY, 1997). Dentre os vários tipos celulares, estão presentes as células goblet, células enteroendócrinas, leucócitos intraepiteliais e as células de Paneth na cripta.

Os estudos atuais referentes ao sistema imune do intestino visam fornecer uma base para aprimorar a compreensão dos mecanismos e funções relacionados às células intestinais no desenvolvimento da imunidade das mucosas e suas possíveis implicações imunoproliféricas e/ou imunoterápicas, bem como, os mecanismos de hipersensibilidade.

1.3.1. Células do sistema imune intestinal

Células como mastócitos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos e leucócitos polimorfonucleares apresentam um importante papel na imunofisiologia intestinal, através da liberação de mediadores como aminas biogênicas, citocinas, metabólitos do ácido araquidônico, substâncias oxidantes dentre outros, que alteram o transporte intestinal, sobretudo de eletrólitos (PERDUE; MCKAY, 1994).

Mastócitos

Os mastócitos encontram-se largamente distribuídos na mucosa intestinal, pele, tecido conjuntivo e em muitos outros tecidos e órgãos. Essas células sintetizam, por ativação, muitos mediadores químicos importantes, sendo parte deles estocados (aminas, proteases), outros rapidamente sintetizados (óxido nítrico e leucotrienos) e alguns lentamente formados (várias citocinas) (CALDERÓN *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 1997). Podem ser ativados pela liberação de mediadores inflamatórios, por mecanismos dependentes ou não de IgE. Dentre os mecanismos independentes de IgE, podem ser ativados por ionóforo de cálcio, composto 48/80, substância P e determinados produtos microbianos (CALDERÓN *et al.*, 1998). Em adição, vale salientar que certas subclasses de IgG (IgG4 em humanos, IgG2A em roedores e IgG1 em cobaias) podem também se ligar e ativar mastócitos (SAMPSON, 1997).

Dois tipos principais de mastócitos têm sido caracterizados em ratos: a) mastócitos do tecido conjuntivo (MTC), que predominam na cavidade peritoneal, pele e nas camadas musculares do intestino, principalmente na submucosa e muscular própria (BEFUS *et al.*, 1988) e b) mastócitos da mucosa intestinal (MMI), que têm sido isolados do intestino delgado de ratos, seguida de infestação com o nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis* (LEE *et al.*, 1985; RIOUX; WALLACE, 1996), e que encontram-se distribuídos em todas as camadas do trato gastrointestinal, especialmente na lâmina própria e submucosa (GORDON *et al.*, 1990, YU; PERDUE, 2001).

Os MMI têm apresentado propriedades diferentes daqueles MTC isolados da cavidade peritoneal (STOK *et al.*, 1994). Esses dois tipos de mastócitos diferem estruturalmente e funcionalmente em muitos aspectos, dentre os quais, destacam-se: tamanho, tipo de mediadores e propriedades histoquímicas (ENERBACK, 1986; MARSHALL, 1993). Neste sentido, os MMIs sintetizam uma protease solúvel, denominada protease tipo II, que é um bom marcador de ativação, pois é liberada no líquido intersticial e soro, podendo ser mensurada por imunoenensaio (MILLER *et al.*, 1983). Especialmente em relação ao tamanho, os MMI são menores (5-10µm) do que MTC (10-20µm) (METCALFE *et al.*, 1997).

Os mastócitos também têm apresentado propriedades diferentes em resposta a vários agentes. Por exemplo, MMI apresenta sensibilidade bem menor, quando comparado com MTC, à estimulação por vários ativadores, como: composto 48/80, veneno de abelha e alguns neuropeptídeos (SHANAHAN *et al.*, 1985; CROWE;

PERDUE, 1992). Em adição, os MMI's podem ser ativados por estímulos não imunológicos, incluindo neurotransmissores do tipo substância P e acetilcolina (SHANAHAN *et al.*, 1985; RAITHEL *et al.*, 1999).

Os compostos antialérgicos também mostram especificidade na ação estabilizadora de mastócitos. Por exemplo, o cromoglicato de sódio é efetivo em prevenir a liberação de histamina de MTC, mas não estabiliza os MMI, enquanto doxantrazole previne liberação de histamina de ambas as categorias (CROWE; PERDUE, 1992; PEARCE *et al.*, 1982). Ambas as populações de mastócitos degranulam em resposta a sensibilização antigênica mediada por IgE ou quando expostas a doses relativamente altas do neurotransmissor substância P (MARSHALL, 1993).

A liberação de mediadores também difere para cada subpopulação de mastócitos e depende da forma de estimulação. Os mediadores tradicionalmente liberados por MMI ativados são os seguintes: histamina, serotonina, protease tipo II (mastócitos de ratos) e triptase (mastócitos humanos), prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (METCALFE *et al.*, 1997).

Várias citocinas e quimiocinas são também sintetizadas por mastócitos, tais como: interleucina-1 (IL-1), IL -3, IL -4, IL -5, IL -6, IL -10, IL-13, IL-14, IL-16, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , GM-CSF e MCP-1 (GORDON *et al.*, 1990; COSTA *et al.*, 1997; STENTON *et al.*, 1998; MEKORI; METCALFE, 2000; YU; PERDUE, 2001), que recrutam outras células imunes e inflamatórias envolvidas na modulação da resposta imune. Os linfócitos, eosinófilos e neutrófilos recrutados, por sua vez, liberam seus mediadores, que agem modulando uma série de alterações funcionais e estruturais do trato gastrointestinal (CROWE; PERDUE, 1992; MCKAY; BAIRD, 1999). Algumas destas citocinas, particularmente TNF- α e IL-10, que antes eram reconhecidas somente por seus efeitos pró-inflamatórios, apresentam também propriedades anti-inflamatórias (STENTON *et al.*, 1998).

Os mastócitos encontram-se claramente envolvidos na patogenia de muitas doenças inflamatórias. Não obstante, crescem as evidências, sugerindo o papel destas células na proteção de injúrias inflamatórias e na maturação intestinal (STENTON *et al.*, 1998). Por exemplo, a função dos mastócitos pode ser regulada de forma autócrina, por óxido nítrico, que possui tanto efeito protetor como efeitos deletérios intestinais (STENTON *et al.*, 1998).

Estudos em roedores têm demonstrado que determinadas alterações no transporte de água e eletrólitos intestinais, após um estímulo local, encontram-se associadas com a liberação de histamina na mucosa, indicando que os mastócitos intestinais são importantes células efetoras em reações alérgicas a alimentos (VAN HALTEREN *et al.*, 1997). Várias evidências indicam que os mastócitos intestinais regulam o transporte epitelial de íons (CROWE; PERDUE, 1992). Contudo, há poucas informações sobre a participação dessas células na regulação da permeabilidade intestinal.

Estudos evidenciaram que a administração sistêmica de agentes degranuladores de mastócitos, como composto 48/80, podem induzir a hiperplasia destas células no intestino de ratos (ENERBACK *et al.*, 1981; ENERBACK, 1986). Baseados nessas informações, alguns pesquisadores passaram a investigar se estímulos antigênicos repetidos ou prolongados induzem aumento do número de mastócitos. Nesta perspectiva, Marshall (1993) demonstrou que exposições repetidas com baixas doses de um determinado antígeno resultam em aumento do número de mastócitos da mucosa intestinal, sem, contudo, alterar o número de mastócitos do tecido conjuntivo. Ademais, neste mesmo protocolo experimental, foi evidenciada uma diminuição na produção de IgE antígeno-específica.

Rioux; Wallace (1996) investigaram os efeitos da exposição repetida e prolongada ao antígeno ovalbumina, sobre a reatividade dos mastócitos da mucosa, e demonstraram que a ativação repetida dessas células resulta em uma diminuição progressiva de protease II de mastócitos de rato (RMCP-II) no soro, não relacionada com a depleção desse mediador. Essa diminuição na degranulação de mastócitos pode representar uma resposta adaptativa, objetivando minimizar os efeitos deletéricos da exposição repetida ao antígeno. Os autores referem que infelizmente não existe ainda um marcador específico de degranulação de mastócitos do tecido conjuntivo para se monitorar a degranulação dessas células em estudos *in vivo*.

Levi-Schaffer *et al.* (1990) investigaram os efeitos de repetidas ou contínuas exposições de mastócitos peritoneais a antígenos, *in vitro*. Por conseguinte, observaram que embora estas células permaneçam responsivas durante exposição contínua ao antígeno, a percentagem de liberação de histamina diminui progressivamente. Estes autores sugeriram que isto pode ser causado por uma redução do número de receptores para IgE sobre os mastócitos.

A IgE além de participar nas reações de hipersensibilidade tipo imediata pode estar envolvida em outros mecanismos indiretos fundamentais na patogênese das doenças alérgicas. Com a ativação do sistema imune, a população de células Th2 se expande e induz a produção de mais células B ligadas à produção de IgE (RUDDE *et al.*, 1996).

Em adição, foi sugerido que os mastócitos podem estar diretamente envolvidos na regulação da produção de IgE, independentemente de células T (VAN HALTEREN *et al.*, 1997). Os mastócitos, quando estimulados, expressam ligantes CD40 e produzem IL-4, os sinais mínimos requeridos para induzir a diferenciação de células B em plasmócitos para produção de IgE (BRADDING *et al.*, 1992). Além disso, tem sido demonstrado que a IL-4 é um ótimo agonista na ativação de mastócitos (BISCHOFF *et al.*, 2000).

Os mastócitos intestinais são também importantes mediadores de interações neuro-imunes. Em síntese, os principais neurotransmissores liberados das terminações de nervos entéricos, relacionados com mastócitos são os seguintes: acetilcolina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), substância P e muitos neuropeptídeos, tais como polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), neuropeptídeo Y e somatostatina. Estes neurotransmissores têm sido caracterizados como pró-secretórios (substância P, VIP, acetilcolina e 5-HT) ou pró-absortivos (neuropeptídeo Y e somatostatina) (COOKE, 1986). Em resposta a certos neuropeptídeos, os mastócitos liberam seus mediadores, que, por sua vez, modulam determinadas alterações neuronais entéricas, podendo assim desempenhar um importante papel na hipersensibilidade imediata em reações alimentares (COLLINS, 1996).

É também possível que mastócitos possam regular a permeabilidade das junções firmes nos enterócitos indiretamente através dos nervos (MCKAY; BIENENSTOCK, 1994). Estudos demonstraram que os nervos são ativados por mastócitos ou por mediadores de mastócitos e podem agir na amplificação da resposta a hipersensibilidade (BERIN *et al.*, 1997; PERDUE; MCKAY, 1994). Em adição, tem sido demonstrado que mastócitos e eosinófilos intestinais estão envolvidos na enteropatia relacionada a alergia alimentar (BISCHOFF *et al.*, 2000).

Em suma, os mastócitos intestinais tanto podem apresentar efeitos regulatórios fisiológicos, como efeitos deletérios sobre o trato gastrointestinal. Contudo, são pouco conhecidos os mecanismos desses efeitos regulatórios. Especula-se que

determinados fatores podem criar um desequilíbrio na atividade regulatória destas células, favorecendo o surgimento de patologias (STENTON *et al.*, 1998).

Macrófagos

Os macrófagos, além de seu papel fundamental nos processos inflamatórios, já bem descrito na literatura, apresentam uma importante influência sobre o funcionamento do sistema imunológico e fisiologia do trato gastrointestinal (LASKIN; PENDINO, 1995; FOSS; MURTAUGH, 1999). Além disso, apresentam um papel crucial no sistema imune; são importantes no desenvolvimento, na homeostase normal, na regulação imune e durante várias condições patológicas, tais como: infecção, inflamação autoimune, aterosclerose, rejeição de transplante e câncer. Suas principais funções incluem a fagocitose, o estabelecimento de interações célula-célula e a produção de mediadores inflamatórios (BERG *et al.*, 2001). Também estão envolvidos na secreção e participação em certas respostas imunes humoral ou mediada por células, incluindo atividade anti-tumoral. Algumas dessas funções, como fagocitose de bactérias e debris celulares, são importantes para manter a integridade do tecido intestinal (LEFEVRE *et al.*, 1979).

Os macrófagos são encontrados praticamente em todos os tecidos e fluidos do organismo (LEFEVRE *et al.*, 1979; JOHNSTON, 1988). Embora apresentem a mesma origem, os macrófagos residentes em diferentes locais podem apresentar características bioquímicas e estruturais distintas, dependendo de seu microambiente (JOHNSTON, 1988; OGLE *et al.*, 1994). Por microscopia eletrônica, os macrófagos intestinais de cobaias, ratos e humanos aparecem como células granulares, que ocorrem com maior frequência nas regiões apicais dos vilos absortivos. Estão frequentemente localizados próximo aos vasos sangüíneos ou em associação com plasmócitos na lâmina própria (LEFEVRE *et al.*, 1979).

Os macrófagos e linfócitos T, que desempenham importante papel nas respostas mediadas por células, têm sido encontrados em número significativo na lâmina própria, nas placas de Peyer e em outros folículos linfóides organizados no intestino (ABRAHAM; OGRA, 1994).

Sendo uma fonte significativa de vários mediadores inflamatórios, dentre os quais citocinas (IL-1, IL-8, IL-12 e TNF- α), que participam da ativação de células (RIBEIRO *et al.*, 1991, KUBENA; MCMURRAY, 1996), associadas a sua capacidade de apresentar antígenos, os macrófagos apresentam um ótimo potencial para

influenciar o epitélio. Estes fagócitos quando ativados liberam seus mediadores, sobretudo IL-1 β , que altera indiretamente a contractilidade muscular da mucosa, por suprimir a liberação de importantes neurotransmissores, tais como: acetilcolina e norepinefrina (COLLINS, 1996).

Os macrófagos, por exposição a endotoxinas bacterianas ou citocinas (IL-1, IFN- γ e TNF- α), podem ser estimulados a produzir óxido nítrico, que, por sua vez, causa relaxamento da musculatura lisa endotelial, sendo considerado um neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico. Estudos em ratos sugerem que óxido nítrico pode afetar a permeabilidade epitelial por modular a atividade de mastócitos (KANWAR *et al.*, 1992). Em altas concentrações, o óxido nítrico apresenta propriedades citostáticas e/ou citotóxicas importantes para a eliminação de microorganismos, mas podem também causar injúria celular, como, por exemplo, nas células epiteliais.

Dessa forma, fica evidente que os macrófagos, além de exercerem um papel fundamental na fase crônica do processo inflamatório, participam ativamente na modulação de vários eventos da inflamação aguda. Além disso, apresentam uma importante influência sobre o sistema imunológico (OGLE *et al.*, 1994).

Linfócitos

Linfócitos T

O trato gastrointestinal é um grande órgão imune e representa um considerável compartimento de células T, onde são descritas como células T da lâmina própria e linfócitos intraepiteliais (LIE). Essas células quando ativadas nas placas de Peyer podem migrar e se domiciliar preferencialmente na lâmina própria intestinal (ABRAHAM; OGRA, 1994). É estimado que a população de células T, encontradas no epitélio do intestino delgado, pode sozinha atingir quase 60% do total de células T do corpo. Assim, os linfócitos da mucosa são numericamente as mais significantes células do sistema imune (MOWAT; VINEY, 1997). Os linfócitos têm sido encontrados em grande número na lâmina própria, nas placas de Peyer e em outros folículos linfóides organizados no intestino (ABRAHAM; OGRA, 1994).

Os linfócitos intra-epiteliais ficam localizados entre as células epiteliais adjacentes à membrana basal, sendo uma importante fonte de citocinas, que, por sua vez, podem estar envolvidas diretamente na resposta imunes antígenos-específica (IL-5), ou no crescimento epitelial (TGF- β) (CROITORU; ERNST, 1992). Ademais, a

liberação de várias citocinas pelas células T auxiliares é um fator importante na coordenação dos eventos imunes humoral e celular da mucosa do trato gastrointestinal.

Os linfócitos intraepiteliais encontrados nos intestinos delgado e grosso apresentam diferenças funcionais e fenotípicas nas duas regiões intestinais. Camerini *et al.* (1993) estudando duas populações de linfócitos intraepiteliais isolados de intestino de camundongos demonstraram que os do intestino grosso apresentam atividade citolítica bem inferior aos do intestino delgado e sugeriram que essas duas populações de linfócitos apresentam distintas funções imunológicas.

Os subconjuntos específicos de linfócitos T CD4⁺ apresentam um papel principal em mediar e em regular as funções efetoras *in vivo* por isso são chamados células T auxiliares ou “helper” (Th). Com base nos padrões da produção de citocinas as células Th humanas e murinas podem ser divididas em diversos subconjuntos adicionais denominados Th0, Th1, Th2, Th3, Thp, e as células Tr1 (SEDER; MOSMANN, 1999) descritas a seguir.

Um estudo recente por Groux *et al.* (1997) caracterizou uma nova subsérie de células de T CD4⁺ que diferem substancialmente das clássicas Th1 e Th2. Estas células são geradas por uma repetitiva estimulação antigênica de células T CD4⁺ de camundongos ou humanas na presença de IL-10 e são denominadas T regulatórias-1 (Tr1) (GROUX *et al.*, 1997). Estas células regulatórias são imunossupressoras em diferentes modelos de inflamação imuno-mediada. As células Tr1 parecem ser capazes de atenuar a colite já estabelecida (GROUX *et al.*, 1997). Se essas células Tr1 agem inibindo a ativação, o recrutamento, e/ou as funções efetoras de leucócitos patogênicos ainda permanece incerto.

As células Th1 ativadas secretam IL-2, IFN- γ e linfotóxina- α , enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, e IL-13. As células Th0 sintetizam e liberam tanto citocinas Th1 como Th2 (**Figura 1**), enquanto as células Th3 liberam grandes quantidades do fator de transformação do crescimento (TGF)- β e estão associadas com o processo de tolerância. Evidências se acumulam para sugerir que as células Th1 e Th2 são derivadas de um precursor comum T – Thp, denominada célula secretora de IL-2. Há também boas evidências que demonstram que IL-12 derivada de célula apresentadora de antígeno, geralmente macrófago, é importante para induzir a diferenciação Th1, enquanto IL-4 é requerida para promover a diferenciação de células Thp em Th2 (ABBAS *et al.*, 2000).

Vários estudos mostram que as células Th1 estão envolvidas em uma resposta imuno-inflamatória denominada hipersensibilidade do tipo retardada (HTR) tipo IV. Esta resposta imune protetora envolve não somente a ativação das células Th1 e da liberação subsequente de suas citocinas, mas envolve também a ativação de macrófagos e outros leucócitos fagocíticos, mediada por citocinas liberadas por Th1. Após ativadas essas células passam a liberar citocinas pró-inflamatórias adicionais, tais como: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18. Por outro lado, uma resposta do tipo Th2 é requerida para respostas imunes humorais, isto é, produção de anticorpos (SORENSEN; PORCH, 2001; SARTOR, 2002).

Polarização de Th1 e Th2

O papel de células Th2 na alergia alimentar tem sido recentemente revisado por Romagnani (2000, 2001). A predominância da resposta de células Th2 CD4 tem sido frequentemente associada com alergia alimentar. Este tipo de interação (Th1 e Th2) ocorre na reação inflamatória induzida por eosinófilos nas vias respiratórias, mas ainda é pouco evidente na alergia alimentar (COHN *et al.*, 1998; HERRICK *et al.*, 2000). A citocina IL-12 tem sido relacionada como a possível via de comunicação entre células Th1 e Th2, e o melhor conhecimento nesta via de cooperação na hipersensibilidade intestinal será de grande interesse no futuro próximo (**Figuras 1 e 3**).

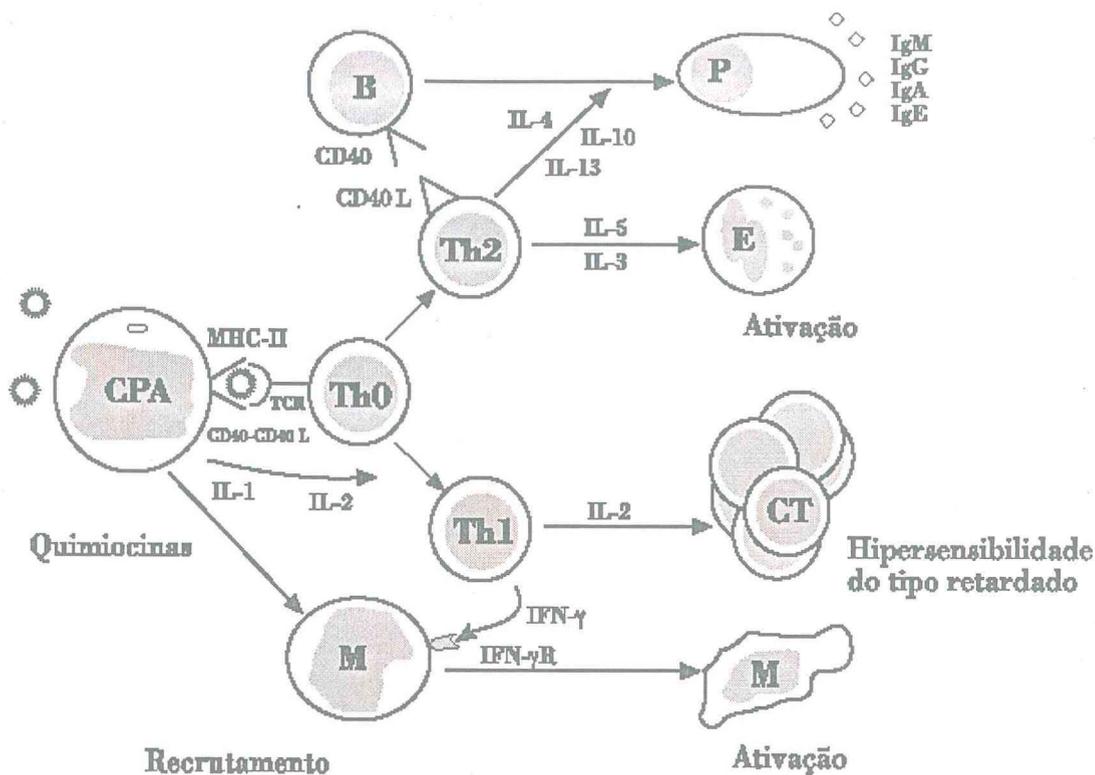


Figura 1 – Regulação da imunidade mediada por anticorpos e da hipersensibilidade retardada. Com participação das células T auxiliares ou “helper” (Th) 1 e 2. CPA, célula apresentadora de antígeno; B, linfócitos B; E, eosinófilos; IFN γ , interferon γ ; IL, interleucina; M, macrófagos; P, plasmócitos; Th0, células auxiliares T inexperientes (Fonte: SORENSEN; PORCH, 2001).

Linfócitos B

Uma das características mais importantes do sistema imune das mucosas é a quantidade de células B para secreção de IgA. A grande maioria (80%) das células produtora de imunoglobulina do corpo está localizada na mucosa intestinal.

Existem evidências experimentais mostrando que células T e macrófagos ou células dendríticas das placas de Peyer produzem fatores que aumentam a diferenciação de células B, para células B produtoras de IgA. Dentre esses fatores solúveis, produzidos por células T e macrófagos, que têm importância no desenvolvimento de linfócitos B produtores de IgA, destacam-se: IL-1, IL-5 e IL-6. Essa diferenciação de células B para plasmócitos, que produzem imunoglobulinas, não ocorre no interior das placas de Peyer e, sim, nos sítios difusos da lâmina própria, onde ocorre a liberação de IgA (SIGAL; RON, 1994).

A ativação de linfócito B, dependente de células T, requer interação entre numerosos pares de receptores ligantes sobre os dois tipos de células. Recentemente, avanços têm ocorrido no entendimento como esses vários sinais regulam as funções efetoras de células B e na identificação de muitos novos pares de receptores ligantes que contribuem para a regulação da função efetora de células B por linfócitos T (BISHOP; HOSTAGER, 2001).

O sistema imune das mucosas comum (SIMC) que faz a interconexão entre tecidos indutivos (por ex. placas de Peyer) e efetores (por ex. lâmina própria intestinal) para a indução da resposta IgA, já é bem caracterizado. Recentes resultados fornecem fortes evidências para a presença de uma via para a indução de IgA independente de SIMC. Duas subséries distintas de células B da mucosa para produção de IgA, denominadas B-1 e B-2, estão associadas com as cascatas dependente e independente de SIMC, respectivamente (KIYONO *et al.*, 2001).

Eosinófilos

Estes leucócitos pró-inflamatórios têm sido implicados na patogênese de vários processos inflamatórios, especialmente nas desordens alérgicas (WELLER, 1991). Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o foco inflamatório, onde podem modular a resposta imune através de vários mecanismos. Pode iniciar a resposta imune antígeno-específica por agir como células apresentadoras de antígenos. Além disso, podem secretar citocinas (IL-2, -4, -6, -10, -12), capazes de estimular linfócitos (LUCEY *et al.*, 1989; Kita, 1996); assim como, expressar moléculas classe II do complexo principal de histocompatibilidade – CPH (LUCEY *et al.*, 1989).

Os eosinófilos representam cerca de 2 a 5% dos leucócitos polimorfonucleares em indivíduos não-alérgicos (MCKAY; PERDUE, 1993). O acúmulo de eosinófilos ocorre em grande número de doenças e envolve a interação entre eosinófilos e células endoteliais, quimiotaxia e ativação celular. Os eosinófilos são importantes não somente nas doenças alérgicas, assim como, possuem também efeitos antiparasitários. Algumas vezes, seus produtos podem ser prejudiciais, causando dano tecidual (MENDES *et al.*, 2000).

De forma similar aos neutrófilos, os eosinófilos contêm enzimas proteolíticas estocadas e quando estimulados podem sintetizar metabólitos reativos do oxigênio (MRO), metabólitos do ácido araquidônico e citocinas. Além disso, a liberação de

A ativação de linfócito B, dependente de células T, requer interação entre numerosos pares de receptores ligantes sobre os dois tipos de células. Recentemente, avanços têm ocorrido no entendimento como esses vários sinais regulam as funções efetoras de células B e na identificação de muitos novos pares de receptores ligantes que contribuem para a regulação da função efetora de células B por linfócitos T (BISHOP; HOSTAGER, 2001).

O sistema imune das mucosas comum (SIMC) que faz a interconexão entre tecidos indutivos (por ex. placas de Peyer) e efetores (por ex. lâmina própria intestinal) para a indução da resposta IgA, já é bem caracterizado. Recentes resultados fornecem fortes evidências para a presença de uma via para a indução de IgA independente de SIMC. Duas subséries distintas de células B da mucosa para produção de IgA, denominadas B-1 e B-2, estão associadas com as cascatas dependente e independente de SIMC, respectivamente (KIYONO *et al.*, 2001).

Eosinófilos

Estes leucócitos pró-inflamatórios têm sido implicados na patogênese de vários processos inflamatórios, especialmente nas desordens alérgicas (WELLER, 1991). Em resposta a diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o foco inflamatório, onde podem modular a resposta imune através de vários mecanismos. Pode iniciar a resposta imune antígeno-específica por agir como células apresentadoras de antígenos. Além disso, podem secretar citocinas (IL-2, -4, -6, -10, -12), capazes de estimular linfócitos (LUCEY *et al.*, 1989; Kita, 1996); assim como, expressar moléculas classe II do complexo principal de histocompatibilidade – CPH (LUCEY *et al.*, 1989).

Os eosinófilos representam cerca de 2 a 5% dos leucócitos polimorfonucleares em indivíduos não-alérgicos (MCKAY; PERDUE, 1993). O acúmulo de eosinófilos ocorre em grande número de doenças e envolve a interação entre eosinófilos e células endoteliais, quimiotaxia e ativação celular. Os eosinófilos são importantes não somente nas doenças alérgicas, assim como, possuem também efeitos antiparasitários. Algumas vezes, seus produtos podem ser prejudiciais, causando dano tecidual (MENDES *et al.*, 2000).

De forma similar aos neutrófilos, os eosinófilos contêm enzimas proteolíticas estocadas e quando estimulados podem sintetizar metabólitos reativos do oxigênio (MRO), metabólitos do ácido araquidônico e citocinas. Além disso, a liberação de

proteína catiônica eosinófilica tem sido demonstrada em resposta a alérgenos, em indivíduos com alergia alimentar e em resposta a gliadina em pacientes com doença celíaca (PERDUE; MCKAY, 1994). Os eosinófilos podem também participar diretamente na resposta a antígenos alimentares, pois apresentam receptores de baixa afinidade para IgE. Possuem, ainda, importante papel na gastroenterite eosinofílica, que freqüentemente encontra-se associada com alergia alimentar.

Neutrófilos

Esses leucócitos polimorfonucleares são os efetores fundamentais na defesa do organismo. Após a sua maturação, entram na corrente sanguínea e se mantêm circulantes em torno de 6-7 dias. Também podem migrar para os tecidos.

Os neutrófilos têm sido implicado na regulação da função epitelial intestinal (PERDUE; MCKAY, 1994). Esses fagócitos apresentam algumas propriedades em comum, quando ativados liberam substâncias como espécies reativas oxidantes, proteases e metabólitos do ácido araquidônico. Além disso, sintetizam e reagem a várias citocinas (MALAVIYA *et al.*, 1996).

A ativação dessas células em doenças crônicas pode ser responsável pelo prolongamento e/ou manutenção da inflamação intestinal nessas doenças. Existem algumas evidências mostrando que monócitos são ativados por endotoxinas bacterianas (LPS) na doença de Crohn sendo responsáveis pela acentuada liberação de metabólitos reativos do oxigênio (MRO) (PERDUE; MCKAY, 1994). Esses metabólitos podem estimular a secreção intestinal, aumentar a permeabilidade e afetar a viabilidade dos enterócitos (GRISHAM *et al.*, 1990).

1.3.2. Células ou agregados do epitélio gastrointestinal

Enterócitos

A noção da função epitelial apenas como barreira física tem sido modificada nos últimos anos. Neste sentido, estudos recentes têm mostrado que as células epiteliais intestinais (CEI) apresentam um papel ativo na regulação de sua própria permeabilidade, pois secretam e respondem a múltiplas citocinas e outras moléculas, que atraem e ativam células imunes (PERDUE; MCKAY, 1994; STADNYK; WATERHOUSE, 1997). Por conseguinte, aumentam as evidências mostrando que as CEI, além de participar da homeostase intestinal, são também importantes

reguladores no desenvolvimento da imunidade das mucosas (REINECKER *et al.*, 1996).

Os enterócitos expressam moléculas do tipo complexo principal de histocompatibilidade (CPH) do tipo classe I e/ou II, constitutivamente ou em resposta a citocinas. Sabe-se que os enterócitos são capazes de apresentar antígenos, *in vitro*, porém, o papel dessas células na apresentação de antígenos, *in vivo*, ainda não foi elucidado (NEUTRA *et al.*, 1996).

Por outro lado, alguns pesquisadores têm investigado o processamento e apresentação de antígenos em células isoladas do epitélio intestinal (BLAND, 1998; HERSHBERG *et al.*, 1997; MAYER, 1998). A descoberta da expressão de antígenos MHC sobre os enterócitos absorptivos, dá alguma indicação de que os antígenos são processados pelo enterócito, porém a análise prolongada de enterócitos isolados em cultura primária é praticamente impossível. O papel de moléculas CPH tipo classe II nos enterócitos, que são expressas constitutivamente em epitélio intestinal de roedores e humanos normais, tem sido investigado pela análise de peptídeos da dieta, que se ligam a proteínas CPH classe II epiteliais (BLAND, 1998). PERDUE; MCKAY (1994) apresentaram evidências de que os enterócitos podem expressar um fenótipo ativado e assim participar diretamente da resposta imune das mucosas.

Além disso, quando da estimulação, as células epiteliais intestinais produzem várias citocinas, quimiocinas e moléculas superficiais, que podem atuar como potentes fatores de atração para células inflamatórias. Portanto, acredita-se que o epitélio intestinal não é uma estrutura inocente, passivamente modulado pelos mediadores de células imunológicas. Ao contrário, a interação intensiva entre as células epiteliais intestinais e as células imunológicas competentes tem importância crítica na manutenção do processo inflamatório crônico característico das doenças inflamatórias intestinais (DIONNE *et al.*, 1999).

Placas de Peyer

As placas de Peyer são coleções organizadas de folículos linfóides agregados e dispersos no intestino delgado, que funcionam como sítios de apresentação de antígenos intestinais. Os antígenos que têm acesso às placas de Peyer ativam células T e B deste sítio (MOWAT; VINEY, 1997). Após a sensibilização nas placas de Peyer, os linfócitos migram através dos vasos linfáticos, para a corrente sangüínea e, a partir daí, se estabelecem preferencialmente na lâmina própria intestinal, como células

predominantemente produtoras de IgA. Assim, as placas de Peyer apresentam importante papel na iniciação da resposta imune das mucosas e como fonte de linfócitos T e B, que depois de ativados por antígenos, saem deste sítio e migram para a lâmina própria e região intra-epitelial.

Os agregados linfóides das placas de Peyer se estendem através da mucosa e submucosa do intestino delgado. Estes folículos contêm um centro germinativo circundado por uma área cortical, sendo que as células T preenchem as áreas interfoliculares e estão presentes na cortical e no epitélio, enquanto os linfócitos B estão presentes nos centros germinativos e áreas corticais (LESSOF, 1988; MOWAT; VINEY, 1997). As placas de Peyer aparecem no feto humano em torno de 24 semanas de gestação, são mais proeminentes no íleo, aumentam em número e tamanho até a idade de 12 a 14 anos, e diminuem após essa idade (LESSOF, 1988).

Os linfócitos da circulação entram nas placas de Peyer através de células endoteliais especializadas, denominadas vênulas endoteliais altas. Os linfócitos B e T que migram para as placas de Peyer expressam uma molécula “residente” sobre a sua superfície (integrina $\alpha_4\beta_7$), que interage com a molécula de adesão vascular da mucosa (adressina) (MOWAT; VINEY, 1997). Dentro das placas de Peyer, os linfócitos da mucosa são compartimentalizados em regiões distintas. Assim, os folículos linfóides contêm mais células B.

O epitélio associado ao folículo (EAF) que reveste as placas de Peyer difere do epitélio associado aos vilos em dois aspectos: 1) contém células especializadas de origem epitelial denominada células M, que se localizam entre os enterócitos colunares e formam pontes citoplasmáticas que separam as células das placas de Peyer do lúmen intestinal; 2) possuem pequena quantidade de células “goblet” produtoras de mucina. Bactérias, vírus e partículas antigênicas podem entrar nas placas de Peyer através das células M do epitélio associado ao folículo especializado (NEUTRA *et al.*, 1996; KELLERMANN; MCEVOY, 2001).

Células M

São células epiteliais especializadas encontradas sobre as placas de Peyer, que transportam macromoléculas, partículas e alguns microrganismos por transcitose para os folículos linfóides da mucosa. Elas captam antígenos do lúmen intestinais para dentro de suas vesículas pinocíticas, que são transportados através do corpo celular e liberados na área subepitelial das placas de Peyer. Representam uma falha

na função de barreira, mas provavelmente são também importantes por processar e apresentar antígenos ao sistema imune das mucosas (NEUTRA; KRAEHENBUHL, 1994; NEUTRA *et al.*, 1996).

Vários patógenos entéricos invadem as células M e são transportados para as placas de Peyer, isto provoca uma forte resposta imune na mucosa, incluindo a produção de IgA contra toxinas microbianas ou antígenos de superfície. O *Vibrio cholerae*, patógeno não invasivo, adere à superfície das células M e através destas atinge as placas de Peyer. Estudos demonstraram que a superfície das células M é particularmente acessível a ligação de estruturas com partículas coloidais, como holotoxina da cólera ou sua subunidade B, moléculas que são altamente imunogênicas no sistema de mucosas e que podem atuar como adjuvantes (NEUTRA; KRAEHENBUHL, 1994).

Embora várias citocinas tenham apresentado efeitos marcantes sobre a resistência da barreira epitelial, o impacto desses mediadores sobre a via transcitótica por células M não está bem caracterizado (BERIN *et al.*, 1997). Sabe-se que fatores solúveis e o contato célula epitelial-célula imune são requeridos para a formação de células M, que recobrem as placas de Peyer, criando uma porta de entrada para antígenos e bactérias (KERNEIS *et al.*, 1997; NEUTRA *et al.*, 1996). Vale salientar, que antígenos intactos podem atravessar os enterócitos, que são mais abundantes do que as células M.

A **Figura 2** mostra o trajeto que permite que alterações no lúmen intestinal sejam retransmitidas para o sistema imunológico da mucosa. Tradicionalmente, a imunossupervisão do trato gastrointestinal tem sido a função das moléculas que passam através do epitélio, seja entre as células epiteliais ou através das células especializadas M (**Figura 2A**). Portanto, o epitélio atua como um mecanismo de transdução na imunossupervisão (**Figura 2B**) (SANDERSON, 1999).

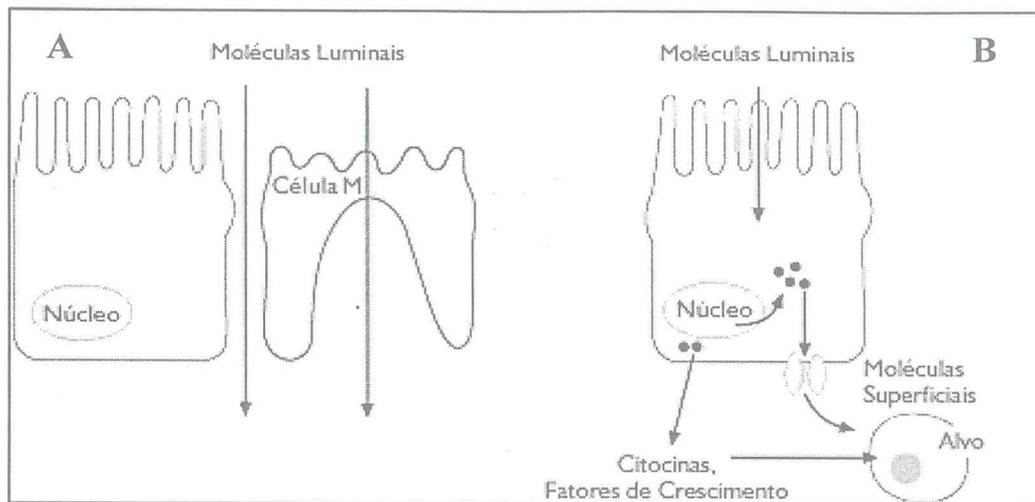


Figura 2 – Trajeto que permite que alterações no lúmen intestinal sejam retransmitidas para o sistema imunológico da mucosa. As moléculas luminárias atravessam o epitélio intestinal por vias paracelular ou transcelular. A transcitose de moléculas pode ocorrer através das células M atingindo as placas de Peyer ou pelos enterócitos. A) Transferência epitelial; B) Sinalização epitelial (Fonte: SANDERSON, 1997, 1999).

Células de Paneth

As células Paneth liberam grânulos dentro do lúmen da cripta, no intestino delgado, onde seus componentes protéicos participam na imunidade das mucosas. Essas células foram implicadas como efetoras na função da barreira das mucosas, em virtude da presença de lisozima, em seu interior, cuja secreção ocorre apicalmente dentro do lúmen intestinal. Estudos dos produtos secretados por células Paneth têm facilitado o entendimento sobre a biologia da cripta e seu microambiente. Porque essas secreções incluem várias moléculas bioativas, tais como: α -defensinas, fosfolipase A2 secretória, lisozima, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e matrilisina, que são lançadas no lúmen intestinal. Peptídeos e proteínas presentes nos grânulos das células de Paneth estão provavelmente envolvidos na inibição da colonização microbiana, pois suas proteínas apresentam atividade antimicrobiana contra vários microrganismos (HARWIG *et al.*, 1995; QUELETTE, 1997). Em adição,

estas células podem estar envolvidas no mecanismo de “clearance” luminal, por interagir com as superfícies apicais da camada de células epiteliais da cripta e estimular a liberação de íon cloreto, sais e água (QUELETTE, 1997).

Além da atividade microbicida, também têm sido especuladas outras funções para células de Paneth. Por exemplo, a α -defensina tem sido implicada na atividade quimiotática para monócitos e para linfócitos T, possui ação mitogênica, inibe a atividade de células matadoras naturais ou “natural killer” (NK), *in vitro*, modulam o volume celular do epitélio intestinal e renal, inibe a biossíntese de corticosteróides, em células adrenais cultivadas, entre outras funções (QUELETTE, 1997).

1.3.3. Células musculares lisas

Estudos sugerem que a interação entre as células T e a musculatura lisa intestinal pode ser bidirecional. Após exposição ao interferon δ , as células musculares lisas intestinais expressam moléculas de superfície CPH-II e moléculas de adesão intercelular 1, que são pré-requisitos para apresentação de antígenos a células T. Em adição, as células musculares lisas produzem citocinas: como: IL-6 e IL-1 β (COLLINS, 1996). Após exposição a IL-1 β recombinante humana, as células expressam RNA mensageiro e proteínas para IL-6, através de um evento mediado por receptor, indicando que as células musculares lisas são ao mesmo tempo fonte e alvo de citocinas (KHAN *et al.*, 1995).

As citocinas derivadas de células musculares lisas podem agir como sinais co-estimulatórios durante a apresentação de antígenos. Em estudos com camundongos sensibilizados com ovalbumina, Hogaboam *et al.* (1996) mostraram que as células musculares lisas apresentam antígenos estritamente do tipo CPH-II para linfócitos T isolados de linfonodos mesentéricos, causando ativação e proliferação de células T. Assim, a musculatura lisa tem a capacidade de funcionar como uma célula apresentadora de antígenos não especializada.

Como a permeabilidade intestinal encontra-se aumentada durante a inflamação e como existem evidências do aumento da permeabilidade e atividade endotelial dos vasos sangüíneos, que irrigam as camadas musculares durante a inflamação é provável que as células musculares sejam expostas a antígenos derivados de parasitas e do lúmen (COLLINS, 1996). Portanto, existe a possibilidade das células

musculares estarem envolvidas na imunorregulação da inflamação intestinal, através da atração de células T via apresentação de antígenos.

1.3.4. Neurônios (nervos e fibras nervosas)

O sistema nervoso entérico (SNE) é constituído de 10^8 células nervosas ou neurônios no trato gastrointestinal que pode funcionar independentemente do controle central (YU; PERDUE, 2001). O SNE é como um cérebro no intestino com muitas das propriedades neurofisiológicas do sistema nervoso central. No entanto, a função do nervo entérico é influenciada pelo cérebro via conexões com nervos simpáticos e parassimpáticos. A conexão cérebro-intestino será descrita de forma sucinta mais adiante na descrição sobre o papel da serotonina no intestino.

O trato gastrointestinal é inervado por nervos e fibras nervosas do sistema nervoso simpático, parassimpático e entérico. As funções intestinais, como motilidade, secreção e fluxo sanguíneo são controlados e integrados pelo sistema nervoso entérico.

1.3.5. Mediadores celulares na inflamação

Atualmente, tem aumentado muito o interesse pelos mecanismos de controle da imunofisiopatologia intestinal, em particular o envolvimento de células imunes e seus respectivos mediadores. Há muito tempo se sabe que o epitélio intestinal atua como uma barreira no controle de patógenos intestinais. Contudo, só recentemente tem se tornado evidente a participação das células do sistema imunológico no seu funcionamento (MCKAY; PERDUE, 1993; PERDUE; MCKAY, 1994; STACK *et al.*, 1995; THEODOROU *et al.*, 1996).

A mucosa intestinal contém grande número de células imunocompetentes (macrófagos, linfócitos, mastócitos, neutrófilos, etc), localizadas próximo ao epitélio e geralmente associadas a estruturas nervosas. Portanto, a contigüidade destas estruturas pode explicar a interrelação funcional do sistema imune com sistema nervoso entérico e trato digestivo (SCHREIBER *et al.*, 1992; CIANCIO; CHANG, 1992; PERDUE; MCKAY, 1994).

Existem muitos trabalhos demonstrando que as células imunes da lâmina própria intestinal são aptas para sintetizar determinados mensageiros químicos, do

tipo metabólitos do ácido araquidônico, fator de agregação plaquetária, aminas biogênicas, oxidantes e citocinas que, por sua vez, podem alterar as funções do epitélio intestinal de forma direta ou até mesmo indiretamente, através da ativação de outros tipos celulares e/ou sistema nervoso entérico (MCKAY; PERDUE, 1993; PERDUE; MCKAY, 1994; EBERHART; DUBOIS, 1995; STACK *et al.*, 1995; THEODOROU *et al.*, 1996).

Prostaglandinas

Os metabólitos do ácido araquidônico, em especial as prostaglandinas, desempenham um papel relevante na fisiopatologia intestinal. Essas moléculas lipídicas potentes afetam vários aspectos fundamentais da imunidade. A princípio tinha-se uma visão de que as prostaglandinas eram simplesmente moléculas imunoinibitórias. Hoje se sabe que elas regulam a imunidade e a inflamação (HARRIS *et al.*, 2002). Apresentam um papel importante na modulação de vários processos fisiológicos no intestino delgado. Tais como, em várias funções do intestino delgado que incluem secreção intestinal, motilidade, proteção da mucosa e do epitélio e função de barreira endotelial (BABAK; THOMAS, 2000; MOHAJER; MA, 2000).

Existem alguns trabalhos relatando o fato de que muitos destes mediadores inflamatórios estimulam a secreção de cloreto e água no intestino, bem como, têm sido relatados altos níveis desses eicosanóides, tanto nas diarréias de ocorrência natural como naquelas produzidas em animais experimentais (MCKAY; PERDUE, 1993; EBERHART; DUBOIS, 1995; STACK *et al.*, 1995).

As prostaglandinas presentes na mucosa gastrointestinal constituem importante fator de proteção contra injúrias, por estimularem a secreção de muco e bicarbonato e aumentarem o fluxo sanguíneo na mucosa (WALLACE, 1993; CRYER, 2000). As prostaglandinas endógenas reduzem os danos à mucosa duodenal induzidos por ácido clorídrico em ratos (NYLANDER *et al.*, 1995). Em adição, esses mediadores inibem a participação de linfócitos nas reações de hipersensibilidade tardia (LESSOF, 1988).

Alguns estudos evidenciaram que macrófagos e mastócitos da região subepitelial constituem a principal fonte de prostaglandinas no intestino e que são particularmente reconhecidos como grandes produtores de eicosanóides. Esses mediadores, em especial as prostaglandinas, têm sido implicados na fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais, visto que além de induzirem secreção

diretamente, podem intermediar ainda as ações de outros agentes sobre a fisiologia do enterócito (MCKAY; PERDUE, 1993; PERDUE; MCKAY, 1993; EBERHART; DUBOIS, 1995). Portanto, as diversas atividades das prostaglandinas são importantes para o desenvolvimento de terapias novas objetivando a modulação imune (HARRIS *et al.*, 2002; SARAH *et al.*, 2002).

Leucotrienos

Não só os prostanóides como também outros mediadores lipídicos têm participação na inflamação intestinal. O principal produto da 5-lipoxigenase, o leucotrieno B₄ é um potente quimiotático de neutrófilo, tendo sua expressão aumentada na inflamação da mucosa.

O termo *leucotrieno* (LT) foi proposto porque a sua síntese ocorre nos *leucócitos* e sua estrutura química apresenta três ligações alternadas (*trieno*) de um total de quatro ligações duplas (daí o número 4, por exemplo, LTD₄). Diferentes do LTB₄, os leucotrienos C₄, D₄ e E₄ contêm o aminoácido cisteína em sua molécula e, por isto, eles são chamados de cisteinil-leucotrienos (cisLT).

Os leucotrienos atuam ligando e ativando receptores específicos da superfície das células-alvo. Até o momento já foram identificados três tipos de receptores em pulmões humanos: um receptor para LTB₄ e dois receptores para cisteinil-receptores receptores cisLT1 e cisLT2 (LYNCH *et al.*, 1999). Em seres humanos, o principal receptor para cisteinil-leucotrienos é o cisLT1.

Os cisteinil-leucotrienos (ou peptidoleucotrienos), LTC₄, LTD₄ e LTE₄, são mediadores lipídicos que têm sido implicados na patogênese da asma, geram uma intensa vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular (LYNCH *et al.*, 1999; BORGES, 2001).

Thivierge *et al.* (2001) demonstraram que IL-4 e IL-13 (citocinas Th₂), mas não IFN-gama, aumentam os níveis de RNAm de cisLT1 com conseqüente aumento de expressão do receptor proteico e função em monócitos e macrófagos humanos. O efeito foi observado após 4 h, foi máximo por 8 h e mantido por 24 h. Eles também demonstraram aumento da resposta a LTD₄, mas não a LTB₄, em termos de mobilização de Ca⁺⁺, bem como atividade quimiotática aumentada. Os autores sugeriram um possível mecanismo pelo qual IL-13 e IL-4 podem modular a expressão de receptor cisLT1 em monócitos e macrófagos e conseqüentemente sua resposta a

LTD4, e assim contribui para a patogênese da asma e de doenças alérgicas. Portanto, os cisteinil-leucotrienos são potentes mediadores pró-inflamatórios na asma e alergias (HENDERSON, 1994) e grandes quantidades desses leucotrienos são sintetizadas por eosinófilos e mastócitos (SMITH, 1999).

Os cisteinil leucotrienos apresentam um importante papel nas reações inflamatórias, tal como nas doenças inflamatórias intestinais e parecem regular a resposta celular envolvida na inflamação alérgica. Nagata *et al.* (2002) mostraram que leucotrieno D4 aumenta a adesão de eosinófilos por via receptor cisLT1, porque aumentam a expressão de CD11b e CD18 sobre a superfície dos eosinófilos.

A literatura relata que há um aumento na síntese de leucotrienos intestinais, tanto em animais com inflamação intestinal induzida experimentalmente como em indivíduos com colite ulcerativa. Portanto, essas evidências têm sugerido a participação desses agentes na patogênese das doenças imuno-inflamatórias do intestino (SCHREIBER *et al.*, 1992; SMITH, 1992; MCKAY; PERDUE, 1993). Westerholm-Ormio *et al.* (2002) avaliaram a capacidade da mucosa intestinal do intestino delgado de produzir LTB4 e LTC4 em crianças com doença celíaca. A pesquisa de LTB4 e LTC4 foi realizada através de biopsias intestinais após estimulação com ionóforo de cálcio A23187. Em adição, também foi examinada a relação entre a produção desses leucotrienos e os sintomas de diarreia. Os resultados demonstraram que a produção LTB4 e LTC4 foi significativamente maior nas biopsias de pacientes com doença celíaca ativa do que nos controles ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), sendo o aumento maior para LTC4. Contudo, nenhuma diferença foi encontrada entre os pacientes com e sem diarreia. Não obstante, o papel dos leucotrienos na fisiopatologia intestinal ainda precisa ser mais bem esclarecido.

Por fim, no tocante ao LTB4 tem sido relatado que esse leucotrieno não participa diretamente no transporte iônico do intestino. Contudo, age como potente quimioatraente como citado acima, estimulando, dessa forma, a migração de neutrófilos para o intestino, com conseqüente lesão da mucosa intestinal (ELTON *et al.*, 1989; SMITH, 1992; MCKAY; PERDUE, 1993).

Fator de agregação plaquetária (PAF)

O PAF é um mediador derivado de fosfolípidios da membrana, por ativação da fosfolipase A2, sintetizado por macrófagos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas. Além

de estimular plaquetas, o PAF causa aumento da permeabilidade vascular, agregação e adesão de leucócitos, quimiotaxia e estimulação de outros mediadores (BRAQUET *et al.*, 1987). Além disso, o PAF também aumenta a secreção epitelial de cloreto, a agregação plaquetária e a contração de músculo liso.

Dentre as células da lâmina própria intestinal tem sido referido que os macrófagos, mastócitos e células endoteliais são fontes importantes do fator de agregação plaquetária (SNYDER, 1990). Existe uma série de evidências clínicas, experimentais e histopatológicas, correlacionando o PAF com doenças inflamatórias do intestino (MCKAY; PERDUE, 1993; MORTEAU *et al.*, 1993; FONTELES *et al.*, 1995; MEENAM *et al.*, 1996).

Aminas biogênicas (serotonina e histamina)

A serotonina (5-HT) apresenta diversos papéis fisiológicos, atuando como: neurotransmissor no sistema nervoso central; regulador na função do músculo liso nos sistemas cardiovascular e gastrointestinal; e, regulador da função plaquetária. As concentrações mais altas da 5-HT são observadas na mucosa gastrointestinal, seguida das plaquetas e sistema nervoso central.

Recentes estudos têm mostrado que a serotonina (ou 5-HT) apresenta um importante papel como substância sinalizadora na conexão cérebro-intestino, pois medeia a transferência química de informações dentro do circuito neuronal em muitos dos níveis integrativos da hierarquia. Em torno de 95% da serotonina está localizada no intestino. As duas principais fontes parácrinas dessa substância no trato gastrointestinal são as células enterocromafins e as células imuno-inflamatórias (GERSHON, 1999; WOOD, 2001). A quantidade de 5-HT liberada no intestino aumenta após uma refeição. Ela ativa os nervos aferentes esplanquínicos, que em seguida transmitem os sinais para o SNC.

O efeito da serotonina sobre o transporte iônico epitelial foi demonstrado em tecidos intestinais de rato (BEUBLER *et al.*, 1986). Neste estudo os autores demonstraram que, após a infusão intra-arterial de serotonina, houve secreção líquida, sendo esta inibida por indometacina, sugerindo, assim, que serotonina induz secreção iônica via produção de prostaglandinas (BEUBLER *et al.*, 1986).

Os receptores 5-HT_{1P} e 5-HT₄ modulam reações de hipersensibilidade do intestino humano, tais como hipersecreção e eventos motores propulsivos (GERSHON, 1999; WOOD, 2001), enquanto em cólon de cobaias, os receptores 5-

HTIP, 5-HT₃ (encontrados em neurônios motores e interneurônios) e 5-HT₄ (predominantes em neurônios sensoriais) estão envolvidos na motilidade intestinal (SPILLER, 2001). A resposta rápida na ativação por serotonina é mediada por receptores do subtipo 5-HT₃ (WOOD, 2001), enquanto a resposta lenta por 5-HTIP (GERSHON, 1999). Os receptores 5-HT₄ parecem estar localizados em terminações nervosas colinérgicas que quando estimuladas aumentam a secreção de acetilcolina. Acetilcolina e substância P são provavelmente os estimulantes finais que agem sobre as fibras musculares (SPILLER, 2001).

Em geral, estímulos com alérgenos alimentares aumentam a motilidade intestinal, pela liberação dos mediadores de mastócitos como histamina, prostaglandinas, leucotrienos e 5-HT. Entretanto, em ratos sensíveis a ovalbumina, o antagonista de receptor 5-HT₁, metisergida, e o inibidor de ciclooxigenase, indometacina, bloquearam o aumento de motilidade mediada por alérgeno, enquanto antagonistas de receptores H₁ e H₂ não tiveram nenhum efeito sobre a motilidade intestinal no mesmo estudo, sugerindo que histamina não tem um papel importante na motilidade aumentada (STENTON *et al.*, 1998).

A serotonina apresenta tanto efeitos inibitórios como excitatórios sobre a motilidade intestinal, agindo diretamente sobre os músculos e indiretamente via neurônios sensoriais, motores e inter-neurônios (SPILLER, 2001).

A histamina apresenta uma atividade ampla nos tecidos e órgãos através da ação em pelo menos três classes distintas de receptores, denominados H₁ (ASH; SCHILD, 1966), H₂ (BLACK *et al.*, 1972) e H₃ (ARRANG *et al.*, 1983). É um mediador multifuncional que regula a contração de músculo liso nas vias aéreas, a secreção ácida no intestino e a liberação de neurotransmissores no SNC através desses três bem caracterizados receptores H₁, H₂, H₃, respectivamente. Uma vez liberada, a histamina pode exercer efeito local ou disseminado sobre os músculos lisos e glândulas (WASSERMAN *et al.*, 1988).

Em adição, recentemente, um quarto subtipo de receptor para histamina (H₄) foi caracterizado e pode ser um alvo terapêutico para a regulação da função imune, particularmente no que diz respeito à alergia e a asma. Enquanto o receptor H₃ se expressa quase que exclusivamente no tecido nervoso, H₄ se expressa primariamente na medula óssea e eosinófilos (LIU *et al.*, 2001).

A histamina liberada por células efectoras (mastócitos e basófilos) durante as reações inflamatórias pode influenciar a resposta imune. Jutel *et al.* (2001) enfoca o

papel de histamina na regulação imune. Utilizando camundongos mutantes deficientes de receptores H1 e H2 os autores demonstraram que a histamina aumenta a resposta do tipo Th1 através do receptor H1 (H1R), que é o receptor predominante sobre as células Th1. Enquanto, as respostas Th1 e Th2 são negativamente reguladas por receptor tipo H2 (H2R), ou seja, os camundongos desprovidos de H2R mostraram aumento na secreção de citocinas tanto Th1 como Th2. Os autores mostraram ainda que a deleção de H1R em camundongos suprime a produção de IFN- γ , aumenta a secreção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) e a resposta anticorpo específica é aumentada, com altos níveis de IgE e IgG1, IgG2b e IgG3 comparada com camundongos sem H2R. Esses dados mostram uma importante função regulatória no controle dos mecanismos envolvidos na inflamação através da histamina derivada de células efectoras.

Citocinas e quimiocinas

Em geral, a hipersensibilidade intestinal está associada com um aumento de citocinas Th2, particularmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (HEUSSER; JARDIEU, 1997; KUWABARA *et al*, 1995; VAN HALTEREN *et al*, 1997) (**Figura 3**). Estudos demonstram que IL-4 e IL-10 são requeridas para o aumento da produção de IgE após estímulo intragástrico. Van Halteren *et al*. (1997) mostraram uma importante correlação entre citocinas de células Th2, produção de IgE e liberação de histamina, utilizando um modelo murino de sensibilização sistêmica com baixas doses de ovalbumina precipitada em hidróxido de alumínio.

A entrega de antígenos protéicos para o GALT pode resultar em hipersensibilidade ou tolerância oral dependendo das circunstâncias. Um dos mecanismos pelo qual os adjuvantes da mucosa podem afetar essas circunstâncias é pela indução de citocinas de macrófagos, incluindo IL-1 e IL-12. Essas citocinas podem diretamente afetar a resposta imune por seus efeitos sobre células T antígeno-específicas e pela indução de IFN- γ por células T ou NK. O IFN- γ também ativa macrófagos a aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras ou CPH e a indução de IL-1 e IL-12 (FOSS; MURTAUGH, 1999).

Embora várias citocinas tenham apresentado efeitos marcantes sobre a resistência da barreira epitelial, o impacto desses mediadores sobre a via transcitótica não está bem caracterizado (BERIN *et al*, 1997). Sabe-se que fatores solúveis e contato célula epitelial-célula imune são requeridos para a formação de células M que

recobrem as placas de Peyer, criando uma porta de entrada para antígenos e bactérias (KERNEIS *et al.*, 1997; NEUTRA *et al.*, 1996). Vale lembrar, que antígenos intactos podem atravessar os enterócitos, que são mais abundantes do que as células M.

Em modelo de inflamação intestinal induzida por nematódeo, Collins (1996) observou que as alterações pela liberação de neurotransmissores podem ser abolidas pelo pré-tratamento com um antagonista de IL-1, implicando IL-1 como mediadora dessas alterações, em adição, foi observado aumento na imunorreatividade de substância P. Assim, as alterações mediadas por citocina na função nervosa entérica provavelmente refletem uma cascata de eventos envolvendo a indução e liberação de várias citocinas dentro do plexo (COLLINS, 1996).

Existem claras evidências que dão suporte ao papel das citocinas nas manifestações clínicas e imunopatológicas da doença inflamatória intestinal humana. TATEITSHI *et al.* (1997) avaliaram o possível papel de uma série de citocinas no modelo de colite induzida por ácido sulfônico trinitrobenzeno (ASTNB) em ratos, para examinar sua relação com a permeabilidade intestinal. Após rápido aumento da permeabilidade intestinal do azul de Evans no cólon, houve aumento de TNF- α inicialmente e, em seguida, de IL-1 e de IL-6. Foi observado por imunofluorescência que a célula produtora da maioria do TNF- α e IL-1 é o macrófago (**Figura 3**). Os achados sugerem que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos intestinais acompanhado pelo aumento da permeabilidade intestinal pode contribuir para os sintomas sistêmicos e intestinais da colite induzida por ASTNB.

As atividades biológicas de IL-1 são múltiplas e variam tanto em relação ao tipo do efeito, quanto aos sítios celulares envolvidos. Dentre estas: ativação de linfócitos B e T, ativação de macrófagos, formação de prostaglandinas expressão de genes de algumas citocinas, como a IL-1, o TNF e a IL-6, além da ativação de células endoteliais e produção de óxido nítrico. Na reação inflamatória celular, a IL-1 ativa macrófagos a produzir IL-8 e LTB₄, ambos potentes fatores quimiotáticos para neutrófilos.

Hoje já está bem caracterizado que dentre os mediadores inflamatórios as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-8), desempenham papéis fundamentais para a migração celular (DINARELLO, 1993). As citocinas são responsáveis pela ativação celular, amplificando a resposta inflamatória por meio da liberação de vários mediadores químicos. Algumas citocinas quando estão presentes no sítio inflamatório

induzem a migração de neutrófilos para o local (DINARELLO, 1991, 1993), enquanto que quando presentes em altas concentrações na circulação inibem a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares, em especial por macrófagos, linfócitos e mastócitos, que compõem a lâmina própria do intestino. Essa citocina tem sido comumente apontada como um dos mediadores inflamatórios implicados nas alterações da fisiologia epitelial (MCKAY; PERDUE, 1994; SARTOR, 1994). Sua produção é estimulada por IFN, IL-1, IL-2, GM-CSF, substância P, bradicinina, imunocomplexos e PAF e inibida por dexametasona, ciclosporina, PGE₂, IL-6 e antagonistas do PAF dentre outros (TRACEY; CERAMI, 1993).

Dentre outras, algumas ações importantes de TNF no processo inflamatório são: atividade quimiotática, alterações endoteliais e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos (TARTAGLIA *et al.*, 1993; WASERMAN *et al.*, 2000). Em adição, tem sido descrito que o TNF- α pode induzir uma expansão na população de células residentes da lâmina própria e epitélio intestinal, com a conseqüente liberação de outros agentes, tais como citocinas, derivados lipídicos, enzimas, oxidantes e neurotransmissores, muitos dos quais, por sua vez, são capazes de provocar lesão na mucosa intestinal (BERSCHNEIDER; GORALSKA, 1992; MCKAY; PERDUE, 1994). Seno *et al.* (2002) demonstrou que TNF- α liberado de células Paneth degeneradas é responsável, pelo menos em parte, pela proliferação de células intestinais, através da ativação de NF-kappaB (NFkB), sugerindo seu efeito proliferativo também sobre células epiteliais intestinais.

Outra citocina que desempenha papel fundamental na inflamação é a IL-1. Os macrófagos e monócitos contituem a principal fonte de IL-1, produzindo principalmente IL-1 β , enquanto os queratinócitos produzem IL-1 α . Outros tipos celulares podem produzir IL-1, como linfócitos T e B, células endoteliais, fibroblastos, células de Langerhans (DINARELLO; WOLFF, 1993). A síntese de IL-1 pode ser induzida por TNF- α , IFN- α , β e γ , LPS, vírus e antígenos (AREND, 1991; VARELLAL; FORTE, 2001).

As atividades biológicas primordiais da IL-1 incluem a estimulação de células CD4+ para a secreção de IL-2; proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias. Estimula a adesão de leucócitos, aumenta a expressão das moléculas de adesão

pelas células endoteliais, inibe a proliferação das células endoteliais. Em adição, interleucina-1 estimula a síntese e liberação de outros mediadores com propriedades quimioatraentes para leucócitos (SARTOR, 1994).

A IL-1 e TNF- α agem na mobilização e ativação de leucócitos polimorfonucleares, na indução de ciclooxigenase e lipoxigenase, no aumento da expressão de moléculas de adesão, na ativação de células B, células T e células matadoras naturais (NK) e no estímulo à produção de outras citocinas. Além disso, essas citocinas têm ação na expressão de vários genes via ativação de fatores de transcrição como NF κ B (DINARELLO, 1993; WESTERHOLM-ORMIO *et al.*, 2002).

Algumas evidências têm indicado que a interleucina-6 participa da amplificação da resposta inflamatória intestinal. Nesse contexto, têm sido evidenciado elevados níveis de IL-6 no intestino de indivíduos com colite ulcerativa. Observou-se, ainda, que os macrófagos residentes, presentes na lâmina própria intestinal de pacientes com doenças inflamatórias, são aptos a sintetizar grandes quantidades dessa citocina (SCHREIBER *et al.*, 1992; REINECKER *et al.*, 1993). A produção de IL-6 é estimulada por diversos fatores, tais como: IL-1, TNF, IL-2, IL-3, vírus e GM-CSF (ABBAS *et al.*, 1994).

A produção de IL-8, por células epiteliais e macrófagos residentes, é capaz de amplificar o processo inflamatório agudo no intestino, através de seus mecanismos relacionados com atividade quimiotática para neutrófilos (MCCAIN *et al.*, 1993; ECKMANN *et al.*, 1993). Foi também evidenciado experimentalmente que a exposição do intestino a determinadas citocinas, dentre elas a interleucina-8, reproduz muitas características da inflamação intestinal, tais como ativação de células imunes, endoteliais e epiteliais e recrutamento de células inflamatórias circulantes (SARTOR, 1994).

Em adição, Reinecker *et al.* (1996) demonstraram que as células epiteliais intestinais expressam IL-15 e sugeriram que esta interleucina é um importante mediador que pode integrar a função das células epiteliais com o sistema imune intestinal.

Por fim, Varella; Forte (2001) sintetizou as ações das citocinas sobre o sistema imune, descrevendo-as como: INF-gama é um imunomodulador, estimulando o perfil de resposta Th1. IL-1 atua como potente agente inflamatório. TNF tem ações semelhantes a IL-1. IL-2 é o principal agente proliferativo para células T. As interleucinas IL-3, IL-7, IL-9 e IL-11 estimulam células progenitoras. A IL-4, IL-5 e IL-6

atuam nas reações alérgicas e nas parasitoses. A IL-8 agrupa os fatores quimiotáticos. IL-12, IL-16 e IL-20 são também agentes inflamatórios, enquanto que IL-10, IL-13 e IL-19 deprimem a resposta imunológica (MARSHALL *et al.*, 1996; GALLAGHER, 2001).

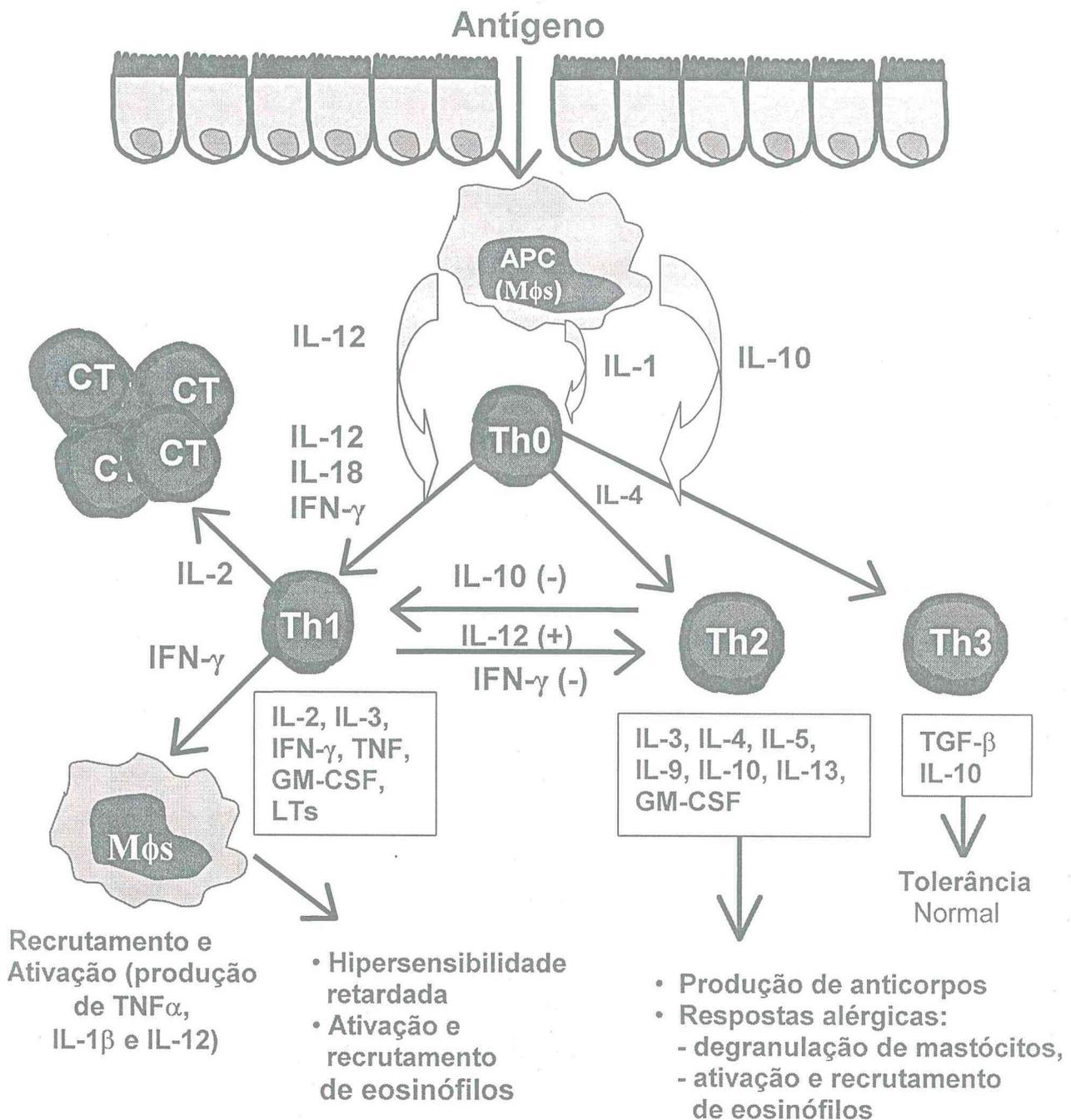


Figura 3 – Produção de citocinas e vias de diferenciação e proliferação de células T (CT) em resposta a antígenos. Antígenos podem ser apresentados a linfócitos T por células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos (Mφs), no sistema imune intestinal. Na presença de citocinas como IL-12, IL-18 (importante para resposta Th1 nas mucosas) e IFN- γ produzidos por APC (Mφs), linfócitos T podem se diferenciar em células efetoras Th1, enquanto IL-4 pode induzir diferenciação em linfócitos Th2. Essas células Th2 produzem grande quantidade de citocinas tais como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que regulam a produção de anticorpos e resposta alérgica, enquanto células Th1 produzem altos níveis de IFN- γ que induz recrutamento e ativação de macrófagos em reações de hipersensibilidade e IL-2 estimula a proliferação de células T (Th = T “helper” ou auxiliar). IL-10 produzida por APC pode estimular a diferenciação de Th0 em Th3 (Fonte: modificado de SARTOR, 2002)

1.4. Células e mediadores na imunofisiopatologia de enteroxinas bacterianas: dados do Laboratório de Doenças Infecciosas, UPC & IBIMED/UFC

Há vários anos um grupo de pesquisadores do nosso laboratório vem investigando o papel de células inflamatórias na imunofisiologia e farmacologia do trato gastrointestinal. Nessa perspectiva, inicialmente, foi demonstrado que a administração de toxina A do *Clostridium difficile*, em alça intestinal de coelho, *in vivo*, provoca uma potente secreção intestinal, semelhante àquela produzida pela toxina do *Vibrio cholerae* (LIMA *et al.*, 1988; LIMA *et al.*, 1989). Evidenciou-se ainda, nestes estudos, um importante infiltrado de células mononucleares nas mucosas e submucosas ileal tratadas com toxina A, sugerindo, assim, o envolvimento destas células, em especial macrófagos, na fisiopatologia da diarreia inflamatória provocada pelo *Clostridium difficile* (LIMA *et al.*, 1989).

Seguindo esta linha de raciocínio, outros pesquisadores, desse mesmo grupo, observaram que a atividade secretória intestinal provocada pela toxina A, vem acompanhada por uma excessiva reação inflamatória, sensível a inibidores de fosfolipase A2 e ciclooxigenase; bem como, a antagonistas do fator de agregação plaquetária (FANG *et al.*, 1994; FONTELES *et al.*, 1995). Ratificando, assim, a participação de células inflamatórias nos efeitos deletérios intestinais desta toxina.

A partir dos dados de Lima *et al.* (1988) evidenciando o envolvimento de células mononucleares nos efeitos enterotóxicos da toxina A, foram delineados outros estudos em modelos clássicos de inflamação aguda, como migração de neutrófilos, por exemplo, no sentido de consolidar o papel de células inflamatórias nas atividades biológicas das toxinas A e B do *Clostridium difficile*. Por conseguinte, evidenciou-se que ambas toxinas são potentes indutoras da migração de neutrófilos em cavidades peritoneais e bolsas de ar subcutâneas de ratos, através da liberação de fatores quimiotáticos, em especial leucotrieno B₄, IL-1 e TNF- α , por macrófagos residentes (ROCHA *et al.*, 1997; SOUZA *et al.*, 1997).

Com a confirmação da relevância dos macrófagos nas atividades biológicas destas toxinas, *in vivo*, resolveu-se investigar o potencial destas células *in vitro*. Dessa forma, foi observado que o sobrenadante de macrófagos estimulados com toxina A, mas não com toxina B (ROCHA *et al.*, 2001), provoca uma intensa secreção intestinal no íleo de coelho, em câmaras de Üssing (ROCHA *et al.*, 1998); bem como, reduz a absorção de água e eletrólitos, *in vivo*, no modelo de perfusão intestinal em ratos (SANTOS-NETO *et al.*, 1996).

Rocha *et al.* (1998) demonstraram, pelo método de ELISA, que macrófagos peritoneais estimulados com a toxina A, mas não com toxina B (ROCHA *et al.*, 2001), liberam interleucina-1 β no sobrenadante da cultura que, por sua vez, é capaz de induzir secreção intestinal em mucosa ileal de coelho, *in vitro*. Evidenciaram, ainda, que a regulação desta citocina é dependente da ativação de uma proteína G, sensível à toxina pertussis. Ademais, prostaglandinas, PAF e TNF- α estão envolvidos nos mecanismos de síntese e liberação de IL-1 β . Por fim, evidenciaram que a atividade secretória desta citocina, ocorre de maneira indireta, via síntese de prostaglandinas, por células da lâmina própria intestinal, e ativação do sistema nervoso entérico (ROCHA *et al.*, 1998).

Ademais, em outros estudos avaliamos o efeito do sobrenadante de macrófagos estimulados com LPS, toxina do *Vibrio cholerae* e microcistina (*Microcystis aeruginosa*) no íleo de coelho, em câmaras de Üssing. Entretanto, dentre essas toxinas, somente a microcistina foi capaz de estimular a síntese de fatores com propriedade secretória intestinal (ROCHA *et al.*, 2001). A análise dos sobrenadante, por ELISA, evidenciou que tanto o LPS como a microcistina foram capazes de induzir a síntese de TNF- α . Contudo, somente a microcistina foi capaz de estimular a síntese de IL-1 β (ROCHA *et al.*, 2001). Dessa forma, esses resultados forneceram mais um subsídio científico, apontando a importância de macrófagos no efeito secretório intestinal de algumas toxinas.

Mais recentemente, Rocha *et al.* (2003; submetido) examinou a curva dose-resposta, a curva temporal e o papel de macrófagos, mastócitos e mediadores pró-inflamatórios na resposta secretória intestinal da toxina da cólera, *in vivo* e *in vitro*. A toxina da cólera causou uma secreção dose-dependente, no intestino delgado em modelo de alça ligada, após 18 h de inoculação na alça. Os sobrenadantes de macrófagos tratados com toxina de cólera não tiveram nenhum efeito no transporte de íon. Além disso, a análise desses sobrenadantes por ELISA, revelaram que a toxina da cólera não induziu a síntese de IL-1 β ou TNF- α . Ratos tratados com composto 48/80 ou cetotifeno apresentaram uma redução significativa na resposta secretoria intestinal. A secreção induzida por toxina da cólera também foi significativamente reduzida por antagonistas de receptor de histamina e de histamina/serotonina, de PAF, fosfolipase A2 e inibidores de ciclooxigenase, anti-histamínicos e bloqueadores de síntese de TNF- α . Por outro lado, o antagonista específico de receptor de

serotonina e inibidores de lipoxigenase não bloquearam este efeito. A análise do fluido intestinal de ratos injetados com toxina de cólera revelou que a toxina de cólera induz a liberação de IL-1 β e TNF- α para o fluido. Os dados sugerem que mastócitos, mas não macrófagos, estejam envolvidos na secreção induzida por toxina da cólera, como também, a importância da histamina, prostaglandinas, PAF, IL-1 β e TNF- α nesse processo.

1.5. Hipersensibilidade intestinal: imunofisiopatologia em animais experimentais

Os modelos experimentais de hipersensibilidade intestinal envolvendo animais normais e transgênicos estão em amplo desenvolvimento. As pesquisas têm como finalidade aumentar o conhecimento dos mecanismos específicos da reação inflamatória induzida por alérgenos provenientes dos alimentos, bem como conhecer os possíveis fatores genéticos envolvidos com a hipersensibilidade intestinal. Os modelos de hipersensibilidade intestinal envolvem o uso principalmente de ratos, camundongos e cobaia, os quais demonstram respostas alérgicas quando estimulados com ovalbumina ou outra proteína alergênica (LAKE, 1983; KWEON *et al.*, 2000).

A secreção iônica constitui uma resposta de defesa do hospedeiro na presença de antígenos, micróbios e outras substâncias no lúmen intestinal (PERDUE; MCKAY, 1994). O transporte de água e eletrólitos no intestino é regulado por fatores neuronais, imunomoduladores parácrinos, hormônios circulantes e agentes luminiais. A alça intestinal isolada e a perfusão intestinal *in vivo* são modelos adequados para o estudo da função intestinal de absorção e secreção de íons e água, modulada pela reação inflamatória induzida por antígenos alimentares (LIMA *et al.*, 2002).

O modelo de câmaras de Üssing, utilizando fragmentos das diversas porções do íleo pode ser utilizado com sucesso para estudos, *in vitro*, da modulação funcional resultante da reação inflamatória induzida na alergia alimentar experimental (ROCHA *et al.*, 1998). Um modelo modificado de câmaras de Ussing utilizando cultura de células intestinais combinado com células do sistema imune gastrointestinal pode também ser utilizado para estudar mecanismos específicos da modulação funcional e dos mecanismos envolvidos na secreção dos mediadores pró-inflamatórios induzidos por proteínas alimentares (BARRET, 1991; ROCHA *et al.*, 1998, 2000).

A permeabilidade epitelial é o parâmetro mais utilizado para avaliar a integridade da barreira epitelial, *in vivo*, podendo estar comprometida em várias enteropatias. Pode ser determinada utilizando-se testes não invasivos, que envolve a coleta e análise de urina, após um certo tempo de administração oral de marcadores, como, por exemplo: polietileno glicol (PEG 400), dissacarídeos não hidrolizáveis (lactulose), monossacarídeos (manitol e L-ramnose) e ^{51}Cr -EDTA (THOMSON *et al.*, 1997).

Os marcadores moleculares de mono- e dissacarídios, manitol e lactulose, são hoje bem estabelecidos, tanto *in vivo* como *in vitro*, para a determinação da absorção e alteração da permeabilidade intestinal (LIMA *et al.*, 1998).

1.5.1. Hipersensibilidade intestinal induzida por ovalbumina

Estudo, *in vitro*, utilizando Câmaras de Üssing mostrou que, em ratos Hooded-Lister sensibilizados com ovalbumina (OVA), a estimulação antigênica do lado seroso de segmentos isolados de jejuno resultou em um rápido aumento da corrente de curto-circuito, que foi inibida por doxantrazole (estabilizador de mastócitos) (CROWE; PERDUE, 1992). Por outro lado, quando o antígeno foi adicionado no lado mucoso, ocorreu um aumento mínimo na corrente de curto-circuito, 20-30 minutos após o estímulo. Experimentos simultâneos realizados pelos mesmos autores documentaram elevados níveis de AMPc na mucosa, 2 minutos após a estimulação por OVA. Com base nesses dados, os autores sugeriram que os mastócitos da mucosa, localizados no compartimento subepitelial, foram ativados por antígenos a liberar mediadores que estimulam a secreção de Cl^- nas células epiteliais, possivelmente pelo aumento dos níveis de AMPc celular (CROWE; PERDUE, 1992).

Em adição, Kosecha *et al.* (1999) investigaram o papel da toxina pertussis, como adjuvante, no prolongamento do período de sensibilização induzida por ovalbumina, sobre a resposta secretória intestinal, em modelo de Câmara de Üssing. Verificaram que ovalbumina sozinha respondeu ao estímulo antigênico com resposta secretória transitória, que desapareceu em 14 dias. Em contraste, a co-administração de toxina pertussis com ovalbumina induziu uma sensibilização de longa duração. A resposta secretória ao estímulo antigênico e estímulo nervoso, tanto do lado seroso como luminal esteve presente por 8 meses, após a sensibilização primária. Esses dados sugerem que a exposição a determinadas bactérias ou produtos bacterianos,

que agem como adjuvantes, pode prolongar a resposta imune normal e transitória a antígenos de alimentos inertes.

Vale ressaltar, que o material luminal atravessa a barreira epitelial pelas vias transcelular ou paracelular. As junções compactas ou "tight junctions" atuam como um lacre no polo luminal de células epiteliais adjacentes e constitui um fator limitante regulador da permeabilidade paracelular. Evidências têm mostrado que essas junções expressam alto grau de plasticidade e podem ser alteradas em várias doenças (ANDERSON; VAN ITALIE, 1995). A doença de Crohn (D.C.) e a colite ulcerativa (C.U.) são doenças inflamatórias intestinais de etiologia desconhecidas. Estudos de absorção oral têm mostrado aumento da permeabilidade intestinal, para várias moléculas de açúcar, em pacientes com doenças inflamatórias intestinais, como um possível fator patogênico. Schurmann *et al.* (1999) demonstraram que os antígenos ovalbumina e "horseradish peroxidase" atingem, dentro de poucos minutos, o espaço paracelular por transporte através de vesículas nos enterócitos de indivíduos sadios e com doença inflamatória intestinal. Evidenciaram também que a via transcelular é afetada tanto na D.C. como na C.U., caracterizada por um alto nível de antígenos dentro do citosol. Estes autores especularam que o aumento da permeabilidade intestinal resulta substancialmente do transporte transcelular aumentado.

Scott *et al.* (1990) investigaram os mediadores envolvidos na alteração da motilidade, observada em um modelo animal de anafilaxia intestinal induzida por ovalbumina, em ratos Hooded-Lister. Os resultados mostraram que as alterações na motilidade intestinal em ratos sensibilizados são desencadeadas pela degranulação de mastócitos, mediada por IgE do tecido conjuntivo e da mucosa, liberação de 5-HT, estimulação da síntese de prostaglandina e contração da musculatura lisa longitudinal do jejuno. Essa resposta rápida e eficaz não foi atribuída a interação local entre antígeno e músculo liso entérico, levando os autores a sugerir que nervos intrínsecos e extrínsecos devem ter sido ativados.

Estudos, *in vitro*, utilizando-se células de animais sensibilizados, sugerem que a exposição antigênica provoca degranulação de mastócitos de tecido conjuntivo e mucosa, liberação de 5-HT, síntese de prostaglandinas; bem como, um efeito contrátil direto desses agentes sobre a musculatura lisa circular e longitudinal do intestino (OLIVER *et al.*, 1997).

Os mecanismos responsáveis pela diarreia em pacientes com alergia alimentar não têm sido bem caracterizados. É possível que a motilidade intestinal, que

normalmente favorece a absorção de água e eletrólitos, seja alterada para promover trânsito mais rápido e assim o organismo possa se livrar do antígeno.

Em geral, a hipersensibilidade intestinal está associada com o aumento de várias citocinas produzidas por células Th2 (HEUSSER; JARDIEU, 1997; KUWABARA *et al.*, 1995; VAN HALTEREN *et al.*, 1997). Estudos demonstraram que IL-4 e IL-10 são requeridas para o aumento da produção de IgE após estímulo intragástrico. Van Halteren *et al.* (1997) evidenciaram uma importante correlação entre citocinas de células Th2, produção de IgE e liberação de histamina no modelo murino de sensibilização sistêmica com baixas doses de ovalbumina precipitada no adjuvante hidróxido de alumínio.

Finalmente, vale ressaltar que a compreensão dos mecanismos básicos envolvidos na hipersensibilidade intestinal é importante por várias razões, dentre outras, para o tratamento de reações adversas no trato gastrointestinal a alimentos, bem como, para o desenvolvimento racional de novas estratégias profiláticas e/ou terapêuticas para doenças infecciosas e inflamatórias.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

*Todo homem tem o desejo natural de saber; mas que vale a ciência sem o temor de Deus?
Não te envaideças, pois, de qualquer arte ou ciência.
Oh! Como passa depressa a glória do mundo!*

Tomás de Kempis

2. Justificativa e objetivos

2.1. Justificativa

Processos alérgicos são desordens complexas em que mecanismos imunológicos e inflamatórios estão envolvidos. Apesar do progresso na elucidação dos mecanismos de doenças alérgicas, a fisiopatologia e significação clínica das reações alérgicas intestinais ainda não estão bem estabelecidas. As reações alérgicas intestinais podem ser diferentes das reações clássicas mediadas por IgE, desde que os pacientes com alergia intestinal têm freqüentemente teste cutâneo negativo e baixos níveis de IgE sérica (BISCHOFF, 1996). O principal problema clínico é a falta de meios apropriados para confirmar o diagnóstico da alergia intestinal, visto que os sintomas dessas reações alérgicas são variáveis e não-específicos, o diagnóstico requer o uso de testes múltiplos e a exclusão de outras patologias, como doenças infecciosas ou reações de intolerância não-imunológicas.

Contudo, novos testes para essas reações têm sido desenvolvidos, tais como: mensuração de mediadores de eosinófilos em amostras de fezes ou "testes endoscópicos de provocação" executados localmente na mucosa intestinal que podem contribuir, de forma mais objetiva, para uma melhor identificação dos pacientes atingidos. Em adição, ainda não sabemos até que ponto as reações alérgicas intestinais podem ser um fator etiológico nas doenças gastrointestinais, sobretudo para a inflamação intestinal inespecífica e síndrome de intestino irritável.

Na mucosa intestinal, as anormalidades da resposta imune local podem ter importante papel na patogênese da alergia alimentar, da doença celíaca e doenças inflamatórias intestinais. Embora a mucosa intestinal seja pré-destinada para reações alérgicas contra proteínas de alimento e outros antígenos, os mecanismos dessas reações alimentares ainda são pobremente compreendidos (BISCHOFF, 1996). Os órgãos linfóides do sistema imune das mucosas são caracterizados por sua proximidade aos antígenos e sua compartimentalização em sítios indutivos e efetores (MOWAT, 1997).

Em adição, levando-se em consideração que o sistema imune das mucosas é único, o conhecimento dos mecanismos básicos envolvidos na imunidade das mucosas, sobretudo na intestinal, poderá auxiliar no controle e tratamento de várias outras doenças alérgicas ou infecciosas tanto por fornecer dados para melhorar o

entendimento da fisiopatologia dessas doenças, bem como, para o desenvolvimento de vacinas.

O conceito de um sistema imune comum às mucosas, através do qual os linfócitos ativados por antígenos do intestino podem disseminar imunidade. tanto ao longo do trato intestinal e de vários outros tecidos das mucosas e glândulas, tem gerado bastante interesse, atualmente, pela possibilidade do desenvolvimento de vacinas orais, não somente para infecções entéricas, mas também para infecções nos tratos urogenital e respiratório (HOLMGREN *et al.*, 1994; DUNKLEY *et al.*, 1995; NEUTRA *et al.*, 1996).

Assim, o estudo das células do sistema imune intestinal fornece um excelente modelo para o entendimento dos mecanismos envolvidos tanto na sensibilização como na resposta imune. O nosso estudo centralizou-se na sensibilização intestinal, visto que esta área tem recebido atualmente muita atenção de imunofarmacologistas e alergistas.

Em adição, um dos modelos mais apropriado e utilizado na investigação de mecanismos imunopatológicos de desordens inflamatórias e anafiláticas é através da indução do edema de pata, injetando-se estímulos no tecido subplantar de ratos ou camundongos (GUO *et al.*, 1997). Ratos são comumente usados em modelos de anafilaxia, principalmente na anafilaxia intestinal. No entanto, na literatura não existem estudos sobre a inflamação imune induzida por ovalbumina em ratos. Outras espécies como camundongos e cobaias têm sido estudadas.

Baseando-se nessas informações e tendo por objetivo executar estudos de hipersensibilidade intestinal, nós decidimos avaliar inicialmente o efeito pró-inflamatório de ovalbumina em ratos sensibilizados no modelo de edema de pata e os mediadores potenciais envolvidos nesse edema alérgico.

Dando continuidade ao estudo, avaliou-se que tipos de células do sistema imune intestinal participam da patogênese da alergia intestinal induzida pela ovalbumina, bem como, investigou-se os mediadores importantes nesse tipo de hipersensibilidade.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

- Investigar o efeito pró-inflamatório de ovalbumina no modelo de edema de pata em ratos sensibilizados, bem como, os mediadores envolvidos nessa imunoinflamação. Para, em seguida, avaliar o envolvimento de células do sistema imune intestinal e seus respectivos mediadores na patogênese da hipersensibilidade intestinal induzida pela ovalbumina.

2.2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito pró-inflamatório de ovalbumina no modelo de edema de pata em ratos sensibilizados;
2. Investigar os mediadores envolvidos no edema alérgico;
3. Avaliar a atividade quimiotática para eosinófilos do sobrenadante da cultura de células totais da lâmina própria intestinal no modelo da cavidade peritoneal de ratos;
4. Investigar o possível envolvimento de células residentes na migração eosinofílica induzida por sobrenadante da cultura de células totais da lâmina própria intestinal;
5. Avaliar a atividade quimiotática para eosinófilos do sobrenadante da cultura de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos isolados da lâmina própria intestinal utilizando o modelo da cavidade peritoneal de ratos;
6. Investigar os mediadores envolvidos na migração eosinofílica induzida por sobrenadante da cultura de células totais ou de macrófagos isolados da lâmina própria intestinal utilizando o modelo da cavidade peritoneal de ratos;
7. Sugerir um mecanismo imuno-inflamatório sobre o envolvimento de células e mediadores na migração eosinofílica induzida por sobrenadantes de culturas de células da lâmina própria intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Deus limita ou aumenta as possibilidades humanas de acordo com o que se tem a fazer, muito ou nada. Quanto mais ações tivermos a executar, mais necessitamos de Deus como fonte de inspiração.

Edith Stein

3. Materiais e métodos

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) de ambos os sexos, com peso variável: 130 - 230 g para o modelo de edema; 170 - 220 g para modelo de migração celular e entre 200 - 300 g para cultura de células. Estes animais foram procedentes do Biotério da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos receberam ração balanceada e água *ad libitum*, permanecendo em gaiolas apropriadas.

3.2. Anticorpos, drogas, reagentes e corantes

3.2.1. Anticorpos

- Anticorpo anti-TNF α foi produzido em camundongo (Bachem, King of Prussia, PA, USA) e anti IL-1 β foi produzido em coelho (Sigma, St Louis, MO, USA), contra as citocinas recombinantes.

3.2.2. Drogas

- Anfotericina B, bicarbonato de sódio, ciproheptadina, composto 48/80, cromolina, difenidramina, HEPES, indometacina, cetotifeno, metergoline, NDGA (ácido nordihidroguaiarético), ovalbumina (grau II), pentoxifilina, protease (dispase) e quinacrina (Sigma, St Louis, MO, USA);
- Dexametasona: ampolas de 2,5 ml (4 mg/ml) - Decadron (Prodome Química e Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil);
- Hidróxido de alumínio coloidal (Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Loratadina (Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Meclizina (Pfizer, São Paulo, SP, Brasil);
- Meloxicam (Legrand, São Bernardo do Campo, SP, Brasil);
- MK-886 (inibidor de lipoxigenase) – L-663, 536 (3-[1-(4-clorobenzil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-yl]-2,2-ácido dimetilpropanóico (Calbiochem, La Jolla, CA, USA);
- Metisergida (maleato, Sandoz, Cambridge, MA, USA);
- Montelucaste sódico (Merck Sharp & Dohme, São Paulo, SP, Brasil);
- Penicilina-Estreptomicina (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA);

- Talidomida e heparina sódica 5.000 UI/ml (CEME, Brasília, DF, Brasil);
- WEB 2086 (anti-PAF) – foi cedido pelo Dr. Boris Vargaftig (Instituto Pasteur, Paris, França).

3.2.3. Reagentes e corantes

- Corante Hema III (Protocol™, Middletown, VA, USA)
- Azul de trypan (Sigma, St Louis, MO, USA)
- May Grunwald-Giemsa (Bioclin/Quibasa, São Paulo, SP, Brasil)
- Dimetil sulfóxido - DMSO® (Sigma, St Louis, MO, USA)
- Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, USA)
- Percoll (Sigma, St. Louis, USA)

A maioria das substâncias foi preparada em solução fosfatada tamponada (PBS) ou água destilada estéreis. Indometacina foi dissolvida em bicarbonato de sódio a 0,5% e tioglicolato, em água destilada, sendo aquecido para sua completa dissolução. E talidomida foi diluída em DMSO a 0,2%.

3.3. Composição das soluções e dos meios de cultura de células do sistema gastrointestinal

As Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 mostram as soluções e meio de cultura utilizados na fase experimental desta pesquisa, dando ênfase a composição, quantidade ou concentração e companhia fornecedora de cada elemento.

Tabela 1 - Meio de cultura Dulbecco

Composição	Quantidade	Companhia
Meio Dulbecco	13,5 g	^a Gibco
Bicarbonato de sódio	2,2 g	^a Gibco
Tampão HEPES	2,381 g	^b Sigma
Água destilada e deionizada	1,0 l	--

* O pH foi corrigido para 7,4

^aGibco: Gaithersburg, MD, USA; ^bSigma: St. Louis, MO, USA

Tabela 2 – Solução de Hank

Composição	Quantidade	Companhia
Solução de Hank	9,5 g	^a Gibco
Água destilada e deionizada	1,0 l	--

^aGibco: Gaithersburg, MD, USA

Tabela 3 - Solução de Tioglicolato 3%

Composição	Quantidade	Companhia
Meio tioglicolato desidratado	3,0 g	^a Difco
Água destilada e deionizada	0,1 l	--

* O pH foi corrigido para 7,4

^aDifco: Detroit, MI, USA

Tabela 4 - Solução salina tamponada com fosfato (PBS)

Composição	Quantidade	Companhia
Cloreto de sódio	8,0 g	^a Reagen
Cloreto de potássio	0,2 g	Reagen
Fosfato de sódio dibásico	1,15 g	^b Fisher
Fosfato de sódio monobásico	0,2 g	Reagen
Água destilada	1,0 l	--

* O pH foi corrigido para 7,4

^aReagen: Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^bFisher: Springfield, NJ, USA

Tabela 5 - Líquido (ou corante) de Turk

Composição	Quantidade	Companhia
Ácido acético glacial	20,0 ml	^a Reagen
Violeta genciana	2,0 ml	Reagen
Água destilada	978,0 ml	--

^aReagen: Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Tabela 6 - Solução de Albumina 3%

Composição	Quantidade	Companhia
Albumina bovina	3,0 g	^a Sigma
Salina tamponada com fosfato (PBS)	0,1 l	--

^aSigma: St. Louis, MO, USA

Tabela 7 - Soluções de Percoll para Isolamento de Eosinófilos

Concentração final do Percoll	Volume desejado (ml)	^aPercoll (ml)	PBS 10X (ml)	PBS 1X (ml)
56 %	3	1,680	0,198	0,122
72 %	2	1,440	0,177	0,390

^aSigma: St. Louis, MO, USA

3.4. Protocolo de sensibilização dos animais com ovalbumina

A sensibilização (Sens.) dos animais foi realizada 14 a 18 dias antes dos experimentos, utilizando-se ovalbumina (ova; 30µg/0,5ml/rato), intraperitonealmente (i.p.), diluída em iguais volumes de PBS estéril e hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] coloidal. Enquanto, os pseudo-sensibilizados (P.Sens.) receberam iguais volumes de PBS estéril e Al(OH)₃ coloidal (0,5ml/rato, i.p.) sem ovalbumina, conforme protocolos anteriormente utilizados (PERDUE *et al.*, 1984; OLIVER *et al.*, 1995) e por nós modificados.

3.5. Modelo do edema imune de pata induzido por ovalbumina

3.5.1. Avaliação do edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados

O volume da pata direita de cada animal foi medido em um Pletismógrafo (Ugo Basile, Varese, Itália) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, os animais receberam como estímulo ovalbumina (ova; 10 µg/pata), a qual foi injetada em 0,1 ml de salina estéril, por via subcutânea (s.c.) intraplantar, na mesma pata. Os volumes das patas foram medidos nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de ovalbumina. O edema foi avaliado como a variação de volume da pata entre os vários tempos após os estímulos e o tempo zero. As áreas sob as curvas também foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995), sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias. A comparação foi feita entre os grupos sensibilizados e pseudo-sensibilizados e, posteriormente, entre os sensibilizados pré-tratados com bloqueadores farmacológicos e àqueles pré-tratados apenas com PBS (**Figura 4**).

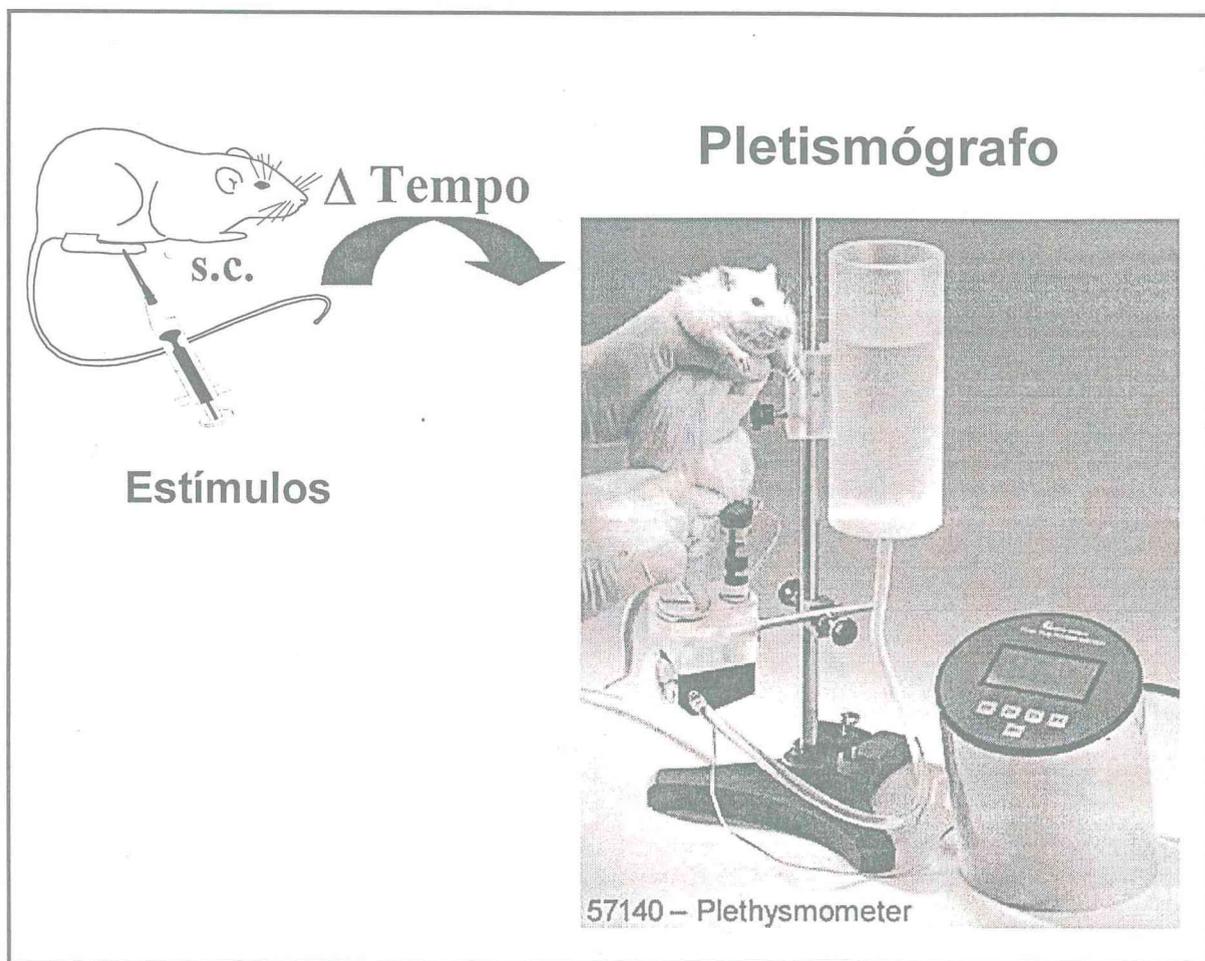


Figura 4 - Modelo do edema de pata. O volume da pata direita de cada animal foi medido em um Pletismógrafo (Ugo Basile, Varese, Itália) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, os animais receberam como estímulo ovalbumina (ova; 10 μg /pata), a qual foi injetada em 0,1 ml de salina estéril, por via subcutânea (s.c.) intraplantar, na mesma pata. Os volumes das patas foram medidos nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de ovalbumina. O edema foi avaliado como a variação de volume da pata entre os vários tempos após os estímulos e o tempo zero (Δ Tempo).

3.5.2. Determinação das curvas dose e tempo de sensibilização do edema de pata induzido por ovalbumina

Foram avaliadas diferentes doses de sensibilização com ovalbumina (10, 30, 100 ou 200 µg/rato) em grupos diferentes de animais que eram sensibilizados 14 a 18 dias antes do experimento, utilizando-se como estímulo uma injeção intraplantar de 10 µg/pata de ovalbumina. Avaliou-se também os diferentes tempos de sensibilização (7, 14, 21, 28 e 56 dias), utilizando-se a dose de sensibilização de 30 µg/rato e a mesma dose de estímulo com ovalbumina de 10 µg/pata.

3.5.3. Protocolos experimentais para a investigação dos mediadores envolvidos no edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados

Sessenta minutos antes da injeção intraplantar (i.pl.) do estímulo, os animais foram tratados subcutaneamente com inibidores, como: dexametasona (0,5 mg/kg), indometacina (2 mg/kg), NDGA (60 mg/kg), MK-886 (10 mg/kg), WEB 2086 (5 mg/kg), meclizina (30 mg/kg), difenidramina (25, 50, 75, 100 mg/kg) ciproheptadina (0,3, 1,0, 2,0, 3,0 mg/kg), metisergida (5 mg/kg), cetotifeno (10 mg/kg), cromoglicato de sódio ou cromolina (5, 10, 20, 40 mg/kg), talidomida (90 mg/kg), pentoxifilina (90 mg/kg), e clorpromazina (1, 3, 9, 18 mg/kg). Essas doses estão indicadas nas respectivas Tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e Figuras 9, 10, 11, 12. A maioria dessas doses foi previamente utilizada por Da Motta *et al.* (1994), Guo *et al.* (1997) e Rocha *et al.* (1997).

As drogas foram diluídas em PBS estéril ou, no caso de talidomida, em DMSO. Os grupos controle (C), receberam somente PBS estéril. O volume utilizado foi sempre 0,5 ml.

3.5.4. Estudo histopatológico

Os animais foram sacrificados ao final do experimento, ou seja, após a última medição do edema de pata no tempo de 4 h. As patas foram removidas e a região subplantar fixada em solução de formol a 10%. Blocos de parafina foram preparados por técnicas convencionais e as seções histológicas coradas por hematoxilina e eosina para análise microscópica.

3.6. Isolamento de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina

As células totais da lâmina própria intestinal (CLPI) foram isoladas de ratos sensibilizados ou não com ovalbumina (ova; 30 μ g/rato) conforme mostra a **Figura 5A**. Nesse procedimento, foi utilizada a metodologia desenvolvida por BEFUS *et al.* (1982) e PEARCE *et al.* (1982) após modificação no nosso laboratório por FEITOSA *et al.* (2001).

Os animais, em número de 6 a 8, foram colocados em jejum, por 18 a 24 horas antes de cada experimento. No dia seguinte, os animais foram sacrificados por inalação em éter etílico. Após o sacrifício foi feita uma incisão abdominal para que o intestino delgado fosse retirado e desprendido do mesentério. O intestino delgado foi seccionado na altura do piloro e porção cranial do ceco e lavado com 10ml de PBS estéril. Em seguida, o intestino foi aberto longitudinalmente, em toda sua extensão, e o muco contido sobre o epitélio retirado, passando-se uma gaze estéril ao longo de toda mucosa. Depois desse procedimento, o intestino foi seccionado em fragmentos de 2-3 cm, sendo removidas e descartadas todas as placas de *Peyer*. Esses fragmentos foram colocados em 2 tubos Falcon com 25-30 ml de solução de Hank, sendo lavados, por 2 vezes, nesta solução.

Foram então preparados 100 ml de meio Dulbecco com protease a 0,3% (dispase; 0,3g/100ml), contendo antibióticos (5.000 UI de penicilina G, 5.000 μ g de estreptomomicina e 12,5 μ g de anfotericina B) e heparina (1ml/100ml) para isolamento das células intestinais totais. Os fragmentos do intestino foram adicionados a esse meio em dois tubos de 50ml cada, contendo a dispase, e incubados por um tempo inicial de 15 minutos, em estufa de CO₂ a 5%, agitando-se (agitador Vortex) a cada 5 minutos (1^a incubação). Em seguida, foi descartado o sobrenadante, contendo principalmente células epiteliais. Foi adicionado um novo meio contendo dispase aos fragmentos do intestino, e incubado por mais 30 minutos, em estufa de CO₂ a 5%, agitando-se a cada 5 minutos (2^a incubação).

Após esse período, o material foi filtrado em gaze estéril, para coletar o meio com as células, e os fragmentos intestinais descartados. O meio contendo as células foi centrifugado a 3000 rpm, por 7 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante (meio) foi descartado, para eliminar a dispase. Um novo meio, sem dispase, foi adicionado ao *pellet* e centrifugado, por 2 vezes, para lavar as células, em 3000 rpm, durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e preservado o *pellet*,

contendo as células. Após a obtenção das células intestinais, foi feita a contagem total, ajustando-se para 10^7 células/ml, em câmara de *Neubauer*. O ajuste celular foi feito utilizando-se 380 μ l do corante de Turk, combinado com 20 μ l da suspensão celular. Algumas lâminas foram preparadas com a suspensão celular e coradas com May Grunwald-Giemsa (**Figura 5B**).

Após o ajuste celular, a suspensão de CLPI foi incubada em estufa de CO₂ a 5%, por 1 h com ou sem ovalbumina, 10 μ g/ml. Em seguida, as células foram novamente lavadas e incubadas por 2 h com o meio Dulbecco contendo 2% de soro fetal bovino. Os sobrenadantes (Sob) foram coletados e conservados a -70 °C para posterior utilização no modelo de migração celular. Após o término das culturas, realizava-se a viabilidade celular utilizando-se o corante azul de Trypan.

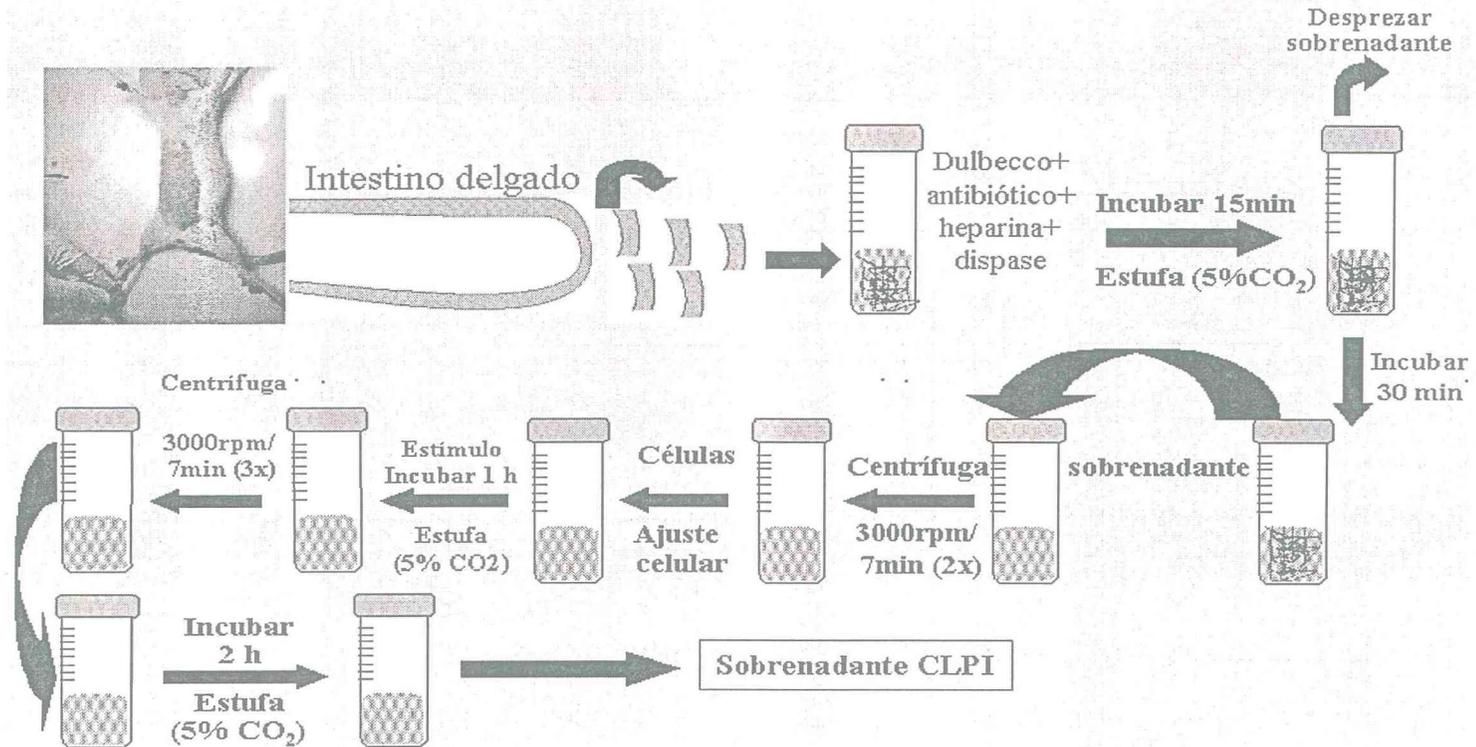


Figura 5A - Isolamento de células da lâmina própria intestinal (CLPI). As CLPI foram isoladas de ratos *Wistar* sensibilizados ou não com ovalbumina. O intestino delgado foi retirado, limpo e seccionado em fragmentos de 2-3 cm, sendo removidas as placas de *Peyer*. Esses fragmentos foram lavados por duas vezes com solução de Hank. Em seguida, os fragmentos foram colocados em meio Dulbecco com protease a 0,3% (dispase; 0,3g/100ml), contendo antibióticos e heparina (1ml/100ml) e incubados em estufa de CO₂ a 5%, por um tempo inicial de 15 min, agitando-se a cada 5 minutos, sendo o meio descartado após esse período. Foi adicionado um novo meio contendo dispase aos fragmentos do intestino, e incubado por mais 30 min para desprendimento das células, agitando-se a cada 5 min. Após esse período, o material foi filtrado em gaze estéril, para coletar o meio com as células, e os fragmentos intestinais, descartados. O meio contendo as células foi centrifugado a 3000 rpm, por 7 minutos. Após a centrifugação, o meio foi descartado, para eliminar a dispase. Um novo meio foi adicionado ao *pellet* e centrifugado, por 2 vezes, para lavar as células. Os sobrenadantes foram descartados e preservado o *pellet*, contendo as células. As células foram estimuladas com ovalbumina por 1 h, lavadas por três vezes e incubadas por mais 2h para coletar o sobrenadante final.

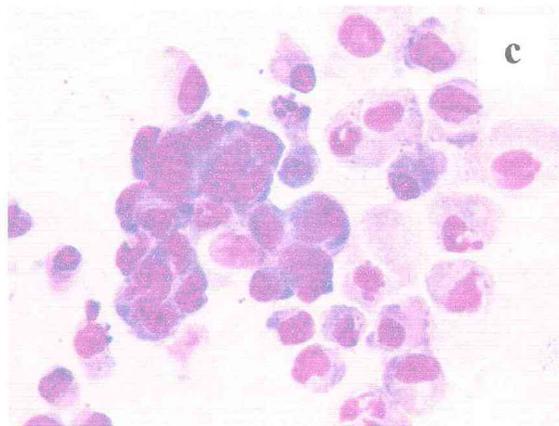
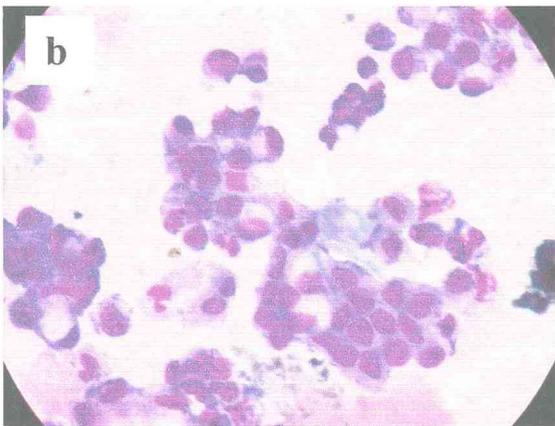
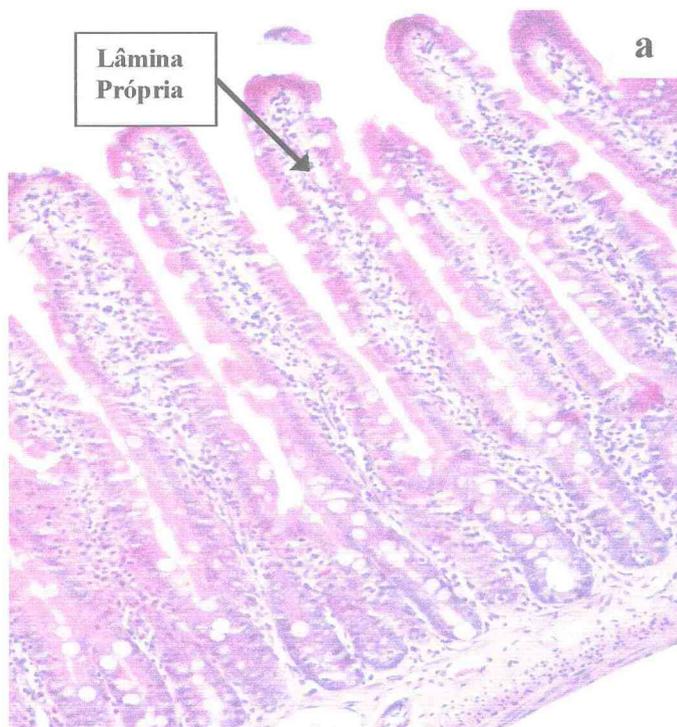


Figura 5B – Células da Lâmina Própria Intestinal. Microfotografia do intestino delgado de rato mostrando o epitélio, a lâmina própria intestinal e a membrana basal, e de células totais isoladas da lâmina própria intestinal. a) A seta indica a localização da lâmina própria intestinal, que fica entre o epitélio e a membrana basal (Coloração H.E., 10x); b) e c) Células totais da lâmina própria intestinal de ratos (May Grunwald-Giemsa, 40x).

3.7. Modelo da migração de leucócitos em cavidade peritoneal: avaliação do efeito do sobrenadante da cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina

O sobrenadante da cultura de células da lâmina própria intestinal foi testado na cavidade peritoneal de ratos normais (não sensibilizados) como estímulo para migração celular através da injeção de 1 ml por via intraperitoneal (i.p.) e comparados àqueles obtidos dos animais que foram injetados com sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos pseudo-sensibilizados.

Ao final do intervalo de tempo definido, 4 h, após a administração dos estímulos imuno-inflamatórios, os animais foram sacrificados por inalação com éter etílico. Em seguida, injetavam-se nas cavidades peritoneais 10 ml de PBS heparinizado (5 UI/ml de heparina), contendo albumina a 3%. Os abdomens dos animais foram levemente massageados e, em seguida, foram coletados cerca de 6 a 7 ml do fluido peritoneal, com seringa de 10 ml e agulha fenestrada para contagem celular total e diferencial.

As contagens total e diferencial foram feitas baseadas no método de Souza; Ferreira (1985) (**Figura 6**). A contagem *total* foi processada retirando-se 20 µl do lavado peritoneal, acrescido de 380 µl do corante de Turk. A seguir, as leituras foram processadas em câmaras de *Neubauer*. Para a contagem diferencial, o lavado peritoneal foi centrifugado a 1.000 r.p.m., por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em 200 µl de albumina a 3%. Em seguida, os esfregaços foram feitos em lâminas comuns, adaptadas com papel de filtro, contendo dois ou três orifícios centrais, com a finalidade de aglomerar as células para contagem subsequente. Após a secagem, o papel foi retirado e as células coradas com o corante HEMA III. As lâminas foram analisadas em microscopia ótica, com o uso da objetiva de imersão e contadas 100 células em cada lâmina. O número de cada tipo de célula foi calculado a partir da percentagem encontrada em relação ao número total por ml (Eosinófilos x 10⁶ células/ml). Diferenciavam-se quatro tipos celulares, a saber: neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos.

O número de cada tipo celular e, posteriormente, somente de eosinófilos foi estimado multiplicando-se o percentual encontrado destas células (contagem diferencial) pelo número total de células (contagem total), dividido por 100. Os resultados foram expressos como média ± EPM. do número de células/ml do lavado peritoneal.

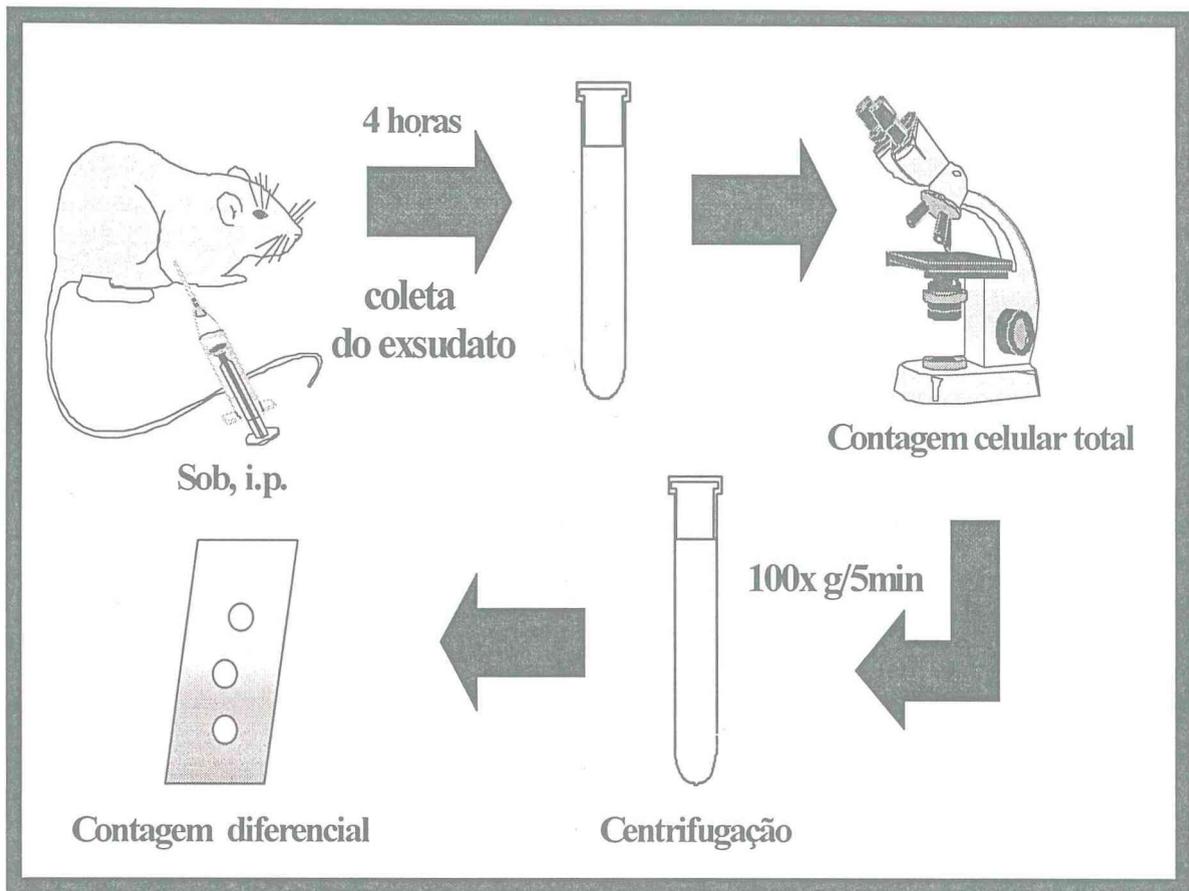


Figura 6 - Modelo de migração celular em cavidade peritoneal de ratos. Ratos normais receberam i.p. 1 ml de sobrenadante (Sob) de cultura de células da lâmina própria intestinal. Quatro horas após o estímulo, 10 ml de PBS com albumina a 3% foi injetado para, em seguida, coletar o exsudato. Após a quantificação dos leucócitos em câmara de *Neubauer*, o fluido foi centrifugado (100x g/ 5 min), o precipitado ressuspenso e distribuído em lâminas para contagem diferencial.

3.7.1. Avaliação da atividade do sobrenadante da cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos não sensibilizados, pseudo-sensibilizados e sensibilizados sobre a migração de leucócitos

Inicialmente, avaliou-se o efeito do sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal provenientes de ratos normais, pseudo-sensibilizados e sensibilizados estimulados ou não *in vitro* com ovalbumina sobre a migração de leucócitos (neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos) para a cavidade peritoneal de ratos normais. O estímulo intraperitoneal foi feito 4 h antes do experimento de migração.

Como neste "screening" inicial observou-se migração de eosinófilos, nos experimentos subseqüentes, passou-se a investigar somente a migração de eosinófilos. O controle positivo do experimento foi o grupo que recebeu o sobrenadante da cultura de células da lâmina própria intestinal (CLPI) obtidos de ratos sensibilizados e o controle geral, o grupo que recebeu o sobrenadante das CLPI de ratos pseudo-sensibilizados com hidróxido de alumínio.

Para melhor fechar e delinear o nosso protocolo, descartando outros fatores ou interferências foram realizados alguns outros grupos controle no modelo de migração celular, tais como: 1) animais que não receberam nenhum estímulo na cavidade peritoneal; 2) os que receberam somente meio Dulbecco na cavidade peritoneal 4 h antes da coleta do exsudato e 3) os que receberam o Sob oriundo de ratos sensibilizados somente com ovalbumina sem adição de adjuvante no processo de sensibilização como o estímulo da cavidade peritoneal.

3.7.2. Protocolo experimental da incubação com ovalbumina da cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados

As células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados foram incubadas com ovalbumina (10 µg/ml) *in vitro* em intervalos de tempo de 15 min, 30 min, 1 h e 1,5h em cultura. Os sobrenadantes obtidos nos diferentes tempos de incubação foram administrados por via i.p. (1 ml) em ratos normais 4 h antes da contagem de eosinófilos.

Como a resposta de migração eosinofílica aumentou significativamente quando se utilizou o Sob proveniente de células que haviam sido estimuladas por 1 h com ovalbumina *in vitro*, então, nos experimentos com células da lâmina própria intestinal foi sempre utilizado esse tempo de incubação.

3.7.3. Curso temporal do efeito de sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos

O sobrenadante da cultura das células da lâmina própria intestinal foi administrado por via i.p. (1 ml), e a migração de eosinófilos acompanhada por 4, 8, 24 e 48 horas após a injeção do estímulo. Os resultados foram comparados aos dos animais injetados com o Sob obtido de ratos pseudo-sensibilizados.

Observou-se que no tempo de 4 h pós-estímulo havia diferença significativa em relação aos pseudo-sensibilizados (controle). Quando aumentou-se o tempo de estímulo observou-se que o sobrenadante de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados também induzia migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal de ratos. Por isso nesse estudo nos experimentos de migração celular foi sempre utilizado o tempo de 4 h para estímulo na cavidade peritoneal.

3.8. Protocolos experimentais para a investigação dos mediadores envolvidos na migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante da cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados

Para a avaliação da atividade do sobrenadante da cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados na quimiotaxia de eosinófilos foram estudados o papel de células residentes e os mecanismos envolvidos no modelo de migração eosinofílica. Neste estudo, foram utilizados os sobrenadantes das culturas de células totais da lâmina própria intestinal, e, posteriormente, os Sobs obtidos da cultura de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos.

As estratégias experimentais utilizadas para avaliação do papel de células residentes foram: aumento do número de macrófagos pelo tratamento com tioglicolato (Tg) (RIBEIRO *et al.*, 1991) e depleção de mastócitos pelo tratamento com o composto 48/80 (DI ROSA *et al.*, 1971).

3.8.1. Aumento da população de macrófagos residentes pelo pré-tratamento com tioglicolato

Com o objetivo de aumentar a população de macrófagos residentes, e de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro *et al.* (1991), os animais receberam 10 ml de tioglicolato a 3% (Tg; m/v) através de injeção intraperitoneal e quatro dias após essa injeção, os ratos receberam como estímulo 1ml i.p. do sobrenadante das células da lâmina própria intestinal de ratos pseudo-sensibilizados (controle; C) ou sensibilizados. A migração de eosinófilos foi avaliada 4 horas após, como descrito para o modelo, comparando-se o número de eosinófilos nos 2 grupos (C e sensibilizados).

3.8.2. Depleção da população de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80

Seguindo o método descrito por Di Rosa *et al.* (1971), os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com o composto 48/80 durante quatro dias consecutivos a intervalos de 12 horas. Nos três primeiros dias, receberam 0,6 mg/kg, e no quarto dia, 1,2 mg/kg. Cinco dias após o início do tratamento, o fluido peritoneal foi coletado e a depleção de mastócitos avaliada.

O sobrenadante da cultura das células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados ou pseudo-sensibilizados (controle; C) foi administrado, intraperitonealmente, nos animais pré-tratados com o composto 48/80 e quatro horas após a injeção do estímulo, a migração de eosinófilos foi avaliada sendo os resultados comparados aos do de animais não tratados com o composto 48/80. Na contagem diferencial de células coradas por HEMA III não foi observado nenhum mastócito nos animais pré-tratados com o composto 48/80.

Esse mesmo protocolo também foi executado para depleção de mastócitos de ratos sensibilizados que iriam ser usados na cultura de células. Iniciava-se o tratamento com o composto 48/80 no décimo dia de sensibilização. No 15º dia pós-sensibilização as células intestinais da lâmina própria foram isoladas, conforme descrito anteriormente no item 3.6.

3.8.3. Efeito do tratamento *in vivo* com moduladores farmacológicos (drogas anti-inflamatórias, anti-histamínicas e anti-alérgicas) sobre a atividade do sobrenadante das células da lâmina própria intestinal na migração eosinofílica para a cavidade peritoneal

Ratos normais (n=5 ou 6) foram pré-tratados com diferentes bloqueadores farmacológicos (ver a seguir) ou apenas com PBS, 30 min antes da injeção i.p. de sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados. Quatro horas após foi feita a avaliação do número de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal, que migraram em resposta ao estímulo, e comparado ao número de eosinófilos obtidos de animais não tratados com bloqueadores e injetados apenas com sobrenadante (1 ml; i.p.) das CLPI.

A) Avaliação do efeito de drogas anti-inflamatórias sobre a atividade do sobrenadante das células da lâmina própria intestinal na migração eosinofílica para a cavidade peritoneal

Os animais foram pré-tratados 30 min antes da injeção i.p. de sobrenadante das CLPI com dexametasona (0,5mg/kg; sc), quinacrina (20mg/kg; sc), indometacina (2mg/kg; sc), WEB-2086 (20mg/kg; sc), montelucaste sódico (10mg/kg; vo), NDGA (50mg/kg; sc) e meloxicam (10mg/kg; v.o.).

B) Avaliação do efeito de drogas anti-histamínicas e anti-alérgicas sobre a atividade do sobrenadante das células da lâmina própria intestinal na migração eosinofílica para a cavidade peritoneal

Os animais foram pré-tratados 30 min antes da injeção i.p. do sobrenadante das CLPI com os seguintes inibidores: cetotifeno (10mg/kg; i.p.), cromolina (20mg/kg; s.c.), difenidramina (10mg/kg; 50mg/kg; s.c.), loratadina (10mg/kg; v.o) ciproheptadina (2 mg/kg; s.c.) e metergoline (5mg/kg; s.c.).

3.8.4. Avaliação do envolvimento de citocinas sobre a atividade de sobrenadante das células da lâmina própria intestinal na migração eosinofílica para a cavidade peritoneal

Os animais foram pré-tratados 30 min antes da injeção i.p. do sobrenadante das CLPI com: pentoxifilina (90mg/kg; sc), talidomida (90mg/kg; sc), anti-IL-1 β ra (5 μ g/kg; sc). Além disso, 50 μ l dos anticorpos anti-TNF α (50 μ g/kg) e anti-IL1 β (100

µg/kg) foram incubados com o Sob das células da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina, 30 min antes da sua administração na cavidade peritoneal.

Na etapa seguinte desse estudo, passou-se a investigar dentre as células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados, qual ou quais células estaria(m) envolvida(s) na migração de eosinófilos em cavidade peritoneal de ratos normais. Para tanto, foram isolados macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados e estimulados com ovalbumina, conforme metodologias descritas abaixo, sendo os sobrenadantes testados no modelo de cavidade peritoneal de ratos normais.

3.9. Isolamento de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina

3.9.1. Isolamento de macrófagos intestinais de ratos sensibilizados e atividade do sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com ovalbumina e pré-incubados com moduladores farmacológicos sobre a migração de eosinófilos

Com o objetivo de investigar o papel de macrófagos na resposta de migração eosinofílica, essas células foram isoladas, cultivadas em meio apropriado e estimuladas com ovalbumina.

As células totais intestinais da lâmina própria do intestino delgado foram isoladas, de acordo com protocolo descrito no item 3.6.

A seguir, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 3000 rpm durante 7 minutos, sendo o precipitado final ressuspenso em 10 ml de Dulbecco. Procedeu-se, então, a quantificação das células obtidas, pela contagem celular em câmara de *Neubauer*, após diluição (1:20) em corante de Turk (**Figura 7**).

Para a preparação da monocamada de macrófagos, esse material foi aplicado em placa de cultura de 12 poços (1 ml/poço) na concentração aproximada de 10^6 células/ml. A seguir, o material foi incubado em estufa de CO₂ durante 1,5 hora para a adesão dos macrófagos à placa. Ao final desse período, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas três vezes com Dulbecco (**Figura 8**). Foi feita nova incubação com 1 ml de meio, contendo ou não ovalbumina (10µg/poço) durante uma hora em estufa de CO₂. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado

e a monocamada de macrófagos lavada por mais 3 vezes. Nova incubação foi feita com 1 ml de Dulbecco durante 2 horas, para liberação dos fatores. Após este período, o material contendo as substâncias liberadas da cultura de macrófagos foi coletado, centrifugado e o sobrenadante conservado a -70°C a fim de ser testado no modelo de migração para a cavidade peritoneal como descrito no item 3.7.

Atividade do sobrenadante da cultura de macrófagos intestinais estimulados com ovalbumina e pré-incubados com moduladores farmacológicos sobre a migração de eosinófilos

Tendo em vista que, no modelo de migração celular, macrófagos intestinais liberavam fatores quimiotáticos para eosinófilos, nos experimentos seguintes passou-se a testar algumas drogas que inibiram previamente a migração eosinofílica, quando utilizou-se sobrenadante de células totais da lâmina própria intestinal, investigando-se, assim, que mediadores, com atividade quimiotática para eosinófilos, eram liberados por macrófagos.

A cultura de $M\phi$ s foi incubada por 30 min com bloqueadores farmacológicos na concentração de 10^{-5}M ou 10^{-6}M antes da adição do estímulo. Em síntese, os macrófagos em cultura foram estimulados ou não durante 60 minutos com ovalbumina ($10\mu\text{g/ml}$). Trinta minutos antes da adição do estímulo, dexametasona (10^{-5}M), indometacina (10^{-5}M), cetotifeno (10^{-5}M), ciproheptadina (10^{-5}M), metisergida (10^{-5}), difenidramina (10^{-6}), ou Dulbecco foram adicionados à cultura. Ao final, as células foram lavadas três vezes com 1 ml de meio e feita nova incubação com Dulbecco, contendo soro fetal bovino a 10% durante 2 horas. Concluída esta etapa, os sobrenadantes foram colhidos e conservados a -70°C para posterior administração i.p. em animais normais. A avaliação da migração de eosinófilos foi feita 4 horas após e a comparação feita entre os animais que receberam o sobrenadante obtido de macrófagos estimulados com ovalbumina e os não estimulados (**Figura 7**).

Em adição, algumas drogas foram testadas *in vivo* 30 min antes da administração do Sob de $M\phi$ s na cavidade peritoneal dos ratos, tais como montelucaste, anti-leucotrieno, foi usado na dose de 10mg/kg v.o. , e WEB-2086 (20mg/kg) por via subcutânea. Como relatado acima, após 4 horas da administração do estímulo foi feita a avaliação da migração de eosinófilos.

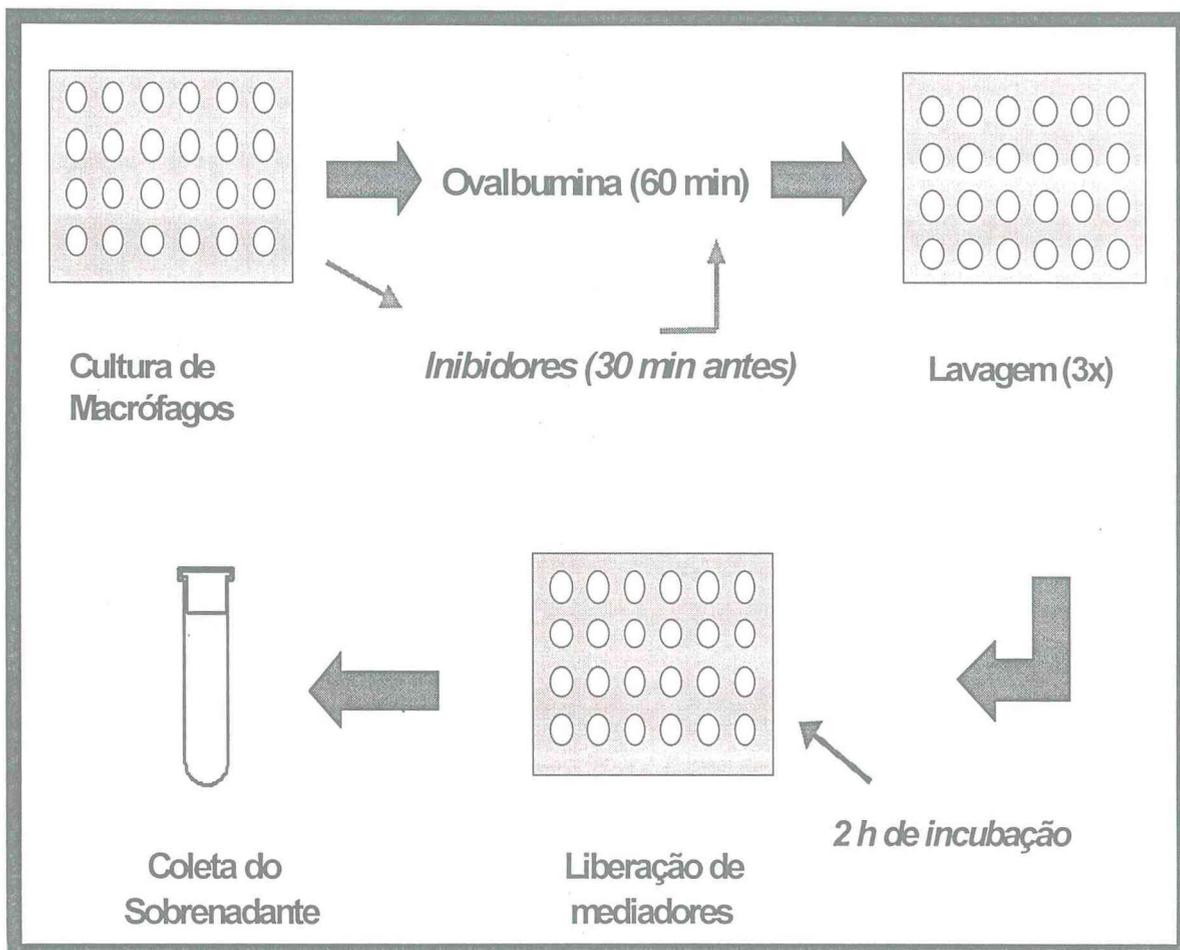


Figura 7 - Isolamento de macrófagos da lâmina própria intestinal, estimulação da cultura de macrófagos e obtenção do sobrenadante. Os macrófagos aderidos eram incubados com ovalbumina ($10\mu\text{g/ml}/60\text{ min}$). Antes da adição do estímulo, dexametasona (10^{-5}M), indometacina (10^{-5}M), cetotifeno (10^{-5}M), ciproheptadina (10^{-5}M), metisergida (10^{-5}M) difenidramina (10^{-6}M) ou meio Dulbecco eram adicionados à cultura e incubados por 30 min. As células eram lavadas 3x com meio, seguia-se nova incubação (2 h) sem estímulo e sem drogas, sendo os sobrenadantes coletados e conservados a -70°C para aplicação na cavidade peritoneal.

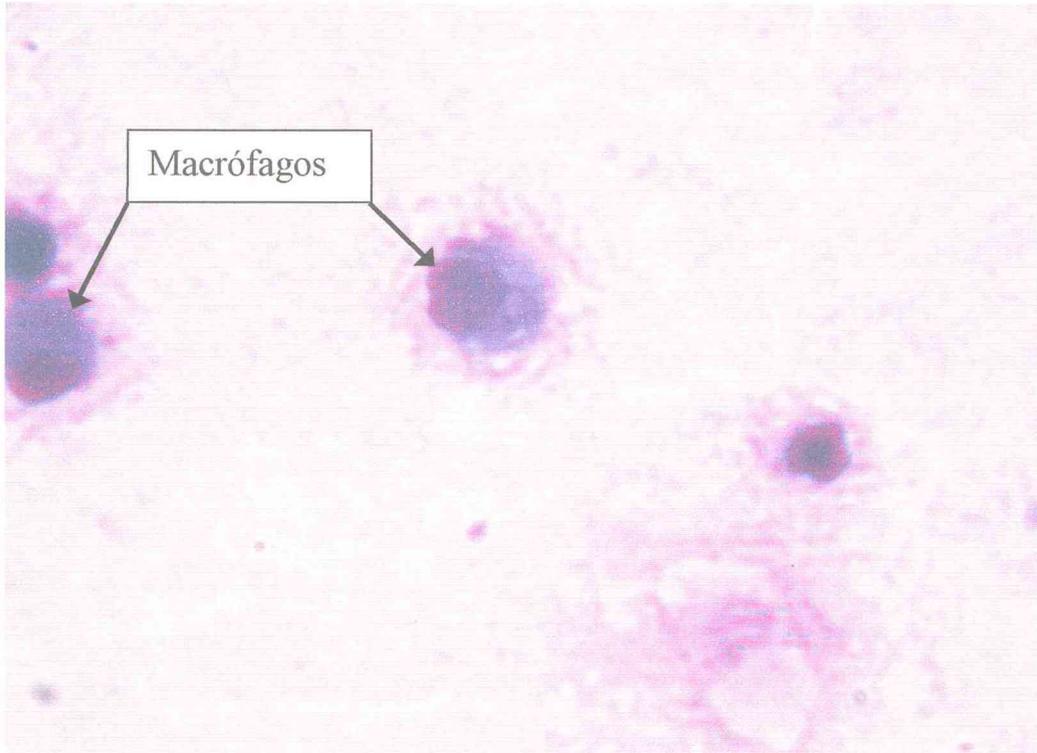


Figura 8 – Microfotografia de macrófagos da lâmina própria intestinal de ratos. Macrófagos apresentando núcleo denso e o citoplasma com uma fraca basofilia (May Grunwald-Giemsa, 100x).

3.9.2. Isolamento e cultura de linfócitos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados

As células intestinais da lâmina própria do intestino delgado foram isoladas, de acordo com o protocolo do item 3.6.

A seguir, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 3000 rpm durante 7 minutos, sendo o precipitado final ressuspenso em 12 ml de Dulbecco. Procedeu-se, então, a quantificação das células obtidas, pela contagem celular em câmara de Neubauer, após diluição (1:20) em corante de Turk.

Em seguida, 6 ml da suspensão celular ($\pm 10^6$ células/ml) foi adicionada a tubos com 3 ml de Histopaque 1077. A suspensão celular foi adicionada cuidadosamente sobre o Histopaque a fim de não misturar o material, formando duas camadas. Uma centrifugação a 2000 rpm durante 20 minutos foi realizada, sendo ao final formada uma monocamada intermediária contendo os linfócitos (**Figura 9**). A monocamada contendo os linfócitos foi ressuspensa em 10 ml de Dulbecco e centrifugada a 2000 rpm, durante 5 minutos. Este processo foi repetido e o precipitado final ressuspenso em Dulbecco de forma a se obter uma suspensão de 10^6 linfócitos/ml. Para a quantificação e caracterização dos linfócitos obtidos, lâminas eram preparadas e coradas pelo May Grunwald-Giemsa (**Figura 10**).

Os linfócitos isolados foram incubados por 1 hora em presença de ovalbumina (10 μ g/ml), sendo ao final centrifugada a 2000 r.p.m. durante 7 minutos. Em seguida, os linfócitos foram lavados, três vezes, para retirada do estímulo e adicionado novo meio contendo soro fetal bovino a 10%, seguido de nova incubação durante 2 horas. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados (filtro millipore SW INEX-13 n^o 2) e utilizados no modelo da cavidade peritoneal e posteriormente em incubação na cultura de macrófagos.

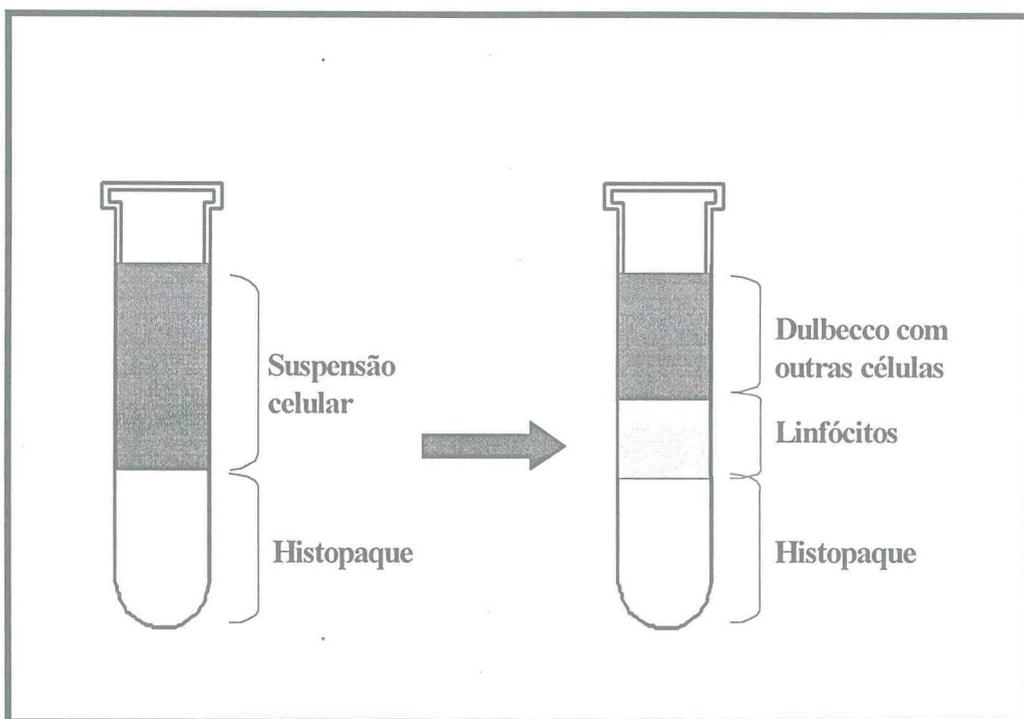


Figura 9 - Isolamento de linfócitos da lâmina própria intestinal. As células intestinais foram isoladas sendo o precipitado final ressuspenso em 12 ml de meio Dulbecco. A suspensão celular foi adicionada cuidadosamente sobre o Histopaque 1077 (3 ml/tubo) e centrifugada a 2000 rpm durante 20 minutos, sendo ao final formada uma monocamada intermediária contendo os linfócitos. Esta monocamada foi ressuspenso em 10 ml. de Dulbecco e centrifugada a 2000 rpm durante 7 minutos. Este processo foi repetido e o precipitado final foi ressuspenso em Dulbecco.

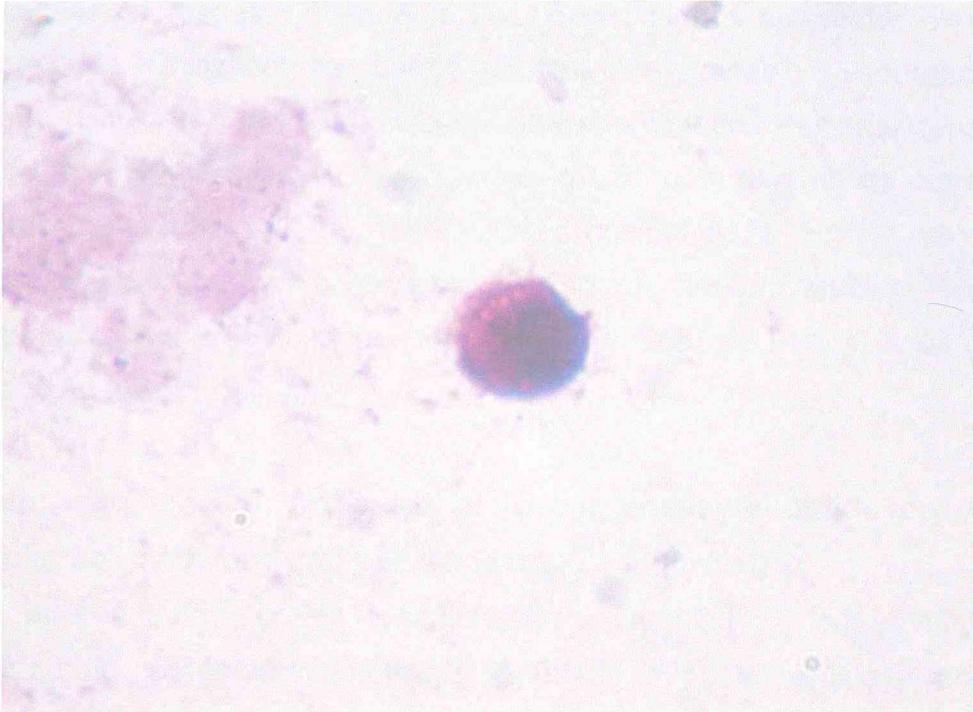


Figura 10 – Microfotografia de linfócito da lâmina própria intestinal de rato. Linfócito apresentando núcleo bastante corado e muito cromático e com pouco citoplasma (May Grunwald-Giemsa, 100x).

Como foi verificado que os sobrenadantes de macrófagos e linfócitos estimulados com ovalbumina induziam migração eosinofílica e como os macrófagos são células apresentadoras de antígenos, levantou-se a hipótese de que eles seriam responsáveis pelo início do processo e passou-se a investigar melhor a importância dessas células na resposta migratória. Para tanto, alguns protocolos experimentais foram traçados, utilizando-se como estímulo migratório o sobrenadante de macrófagos (SobMΦs) da lâmina própria intestinal isolados de ratos sensibilizados, através de combinações tanto *in vivo* como *in vitro* com os Sob de outras células, como linfócitos e, mais adiante, mastócitos e eosinófilos, a fim de se verificar se essas células com seus respectivos mediadores teriam efeitos inibitórios ou estimulatórios sobre a migração induzida por Sob de macrófagos intestinais estimulados com ovalbumina.

3.9.3. Avaliação *in vivo* da atividade do sobrenadante obtido da cultura de linfócitos sobre a atividade do sobrenadante de macrófagos

O sobrenadante obtido de linfócitos estimulados com ovalbumina foi administrado i.p. em animais normais. Após 30 min., os animais receberam o sobrenadante obtido da cultura de macrófagos estimulados com ovalbumina (1 ml; i.p.).

A avaliação da migração de eosinófilos foi feita 4 horas após a administração do sobrenadante liberado de macrófagos estimulados com ovalbumina. O controle da migração foi o grupo de animais que recebeu apenas o sobrenadante obtido de macrófagos estimulados (**Figura 13**). O controle geral foi feito com os animais que receberam apenas Dulbecco (1 ml; i.p.).

3.9.4. Avaliação *in vitro* da atividade do sobrenadante da cultura de macrófagos quando pré-incubada com o sobrenadante da cultura de linfócitos

Linfócitos isolados foram estimulados ou não (controle) durante 60 minutos com ovalbumina (10µg/ml), conforme descrito anteriormente. O sobrenadante dessas células foi usado na cultura de macrófagos, sendo adicionados à cultura 30 min antes do estímulo ovalbumina. O sobrenadante final obtido foi administrado i.p. em animais normais e comparado àqueles que receberam o sobrenadante obtido de macrófagos estimulados com ovalbumina. O controle geral do experimento foi estabelecido com animais que receberam apenas 1 ml de Dulbecco por via intraperitoneal (**Figura 13**).

3.9.5. Isolamento e cultura de mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados

As células intestinais da lâmina própria do intestino delgado foram isoladas, de acordo com o protocolo do item 3.6.

A seguir, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 3000 rpm durante 7 minutos, sendo o precipitado final ressuspenso em 10 ml de Dulbecco. Em seguida, para o isolamento de mastócitos, 6 ml da suspensão celular ($\pm 10^6$ células/ml) foram adicionados a tubos contendo 3 ml da solução de Percoll (10:1; 9 partes de Percoll com uma parte de PBS 10x concentrada). Para o isolamento de eosinófilos, 5 ml da suspensão celular foi adicionada a tubos contendo duas camadas de soluções de Percoll a 56 e 72%, que era preparada como descrito na **Tabela 7**. A suspensão celular, em ambos os casos, foi adicionada cuidadosamente sobre o Percoll a fim de não misturar o material, obtendo-se duas camadas. Uma centrifugação a 3000 rpm, durante 20 minutos, foi realizada, sendo ao final formada uma monocamada intermediária contendo os mastócitos (**Figura 11A**) ou os eosinófilos (**Figura 11B**). A monocamada contendo os mastócitos ou eosinófilos foi ressuspensa em 10 ml de Dulbecco e centrifugada a 3000 rpm durante 7 minutos. Este processo foi repetido e o precipitado final era ressuspenso em 5 ml de Dulbecco. Para a quantificação e caracterização do número de mastócitos (**Figura 12A**) ou eosinófilos (**Figura 12B**) obtidos, lâminas eram preparadas e coradas com May Grunwald-Giemsa.

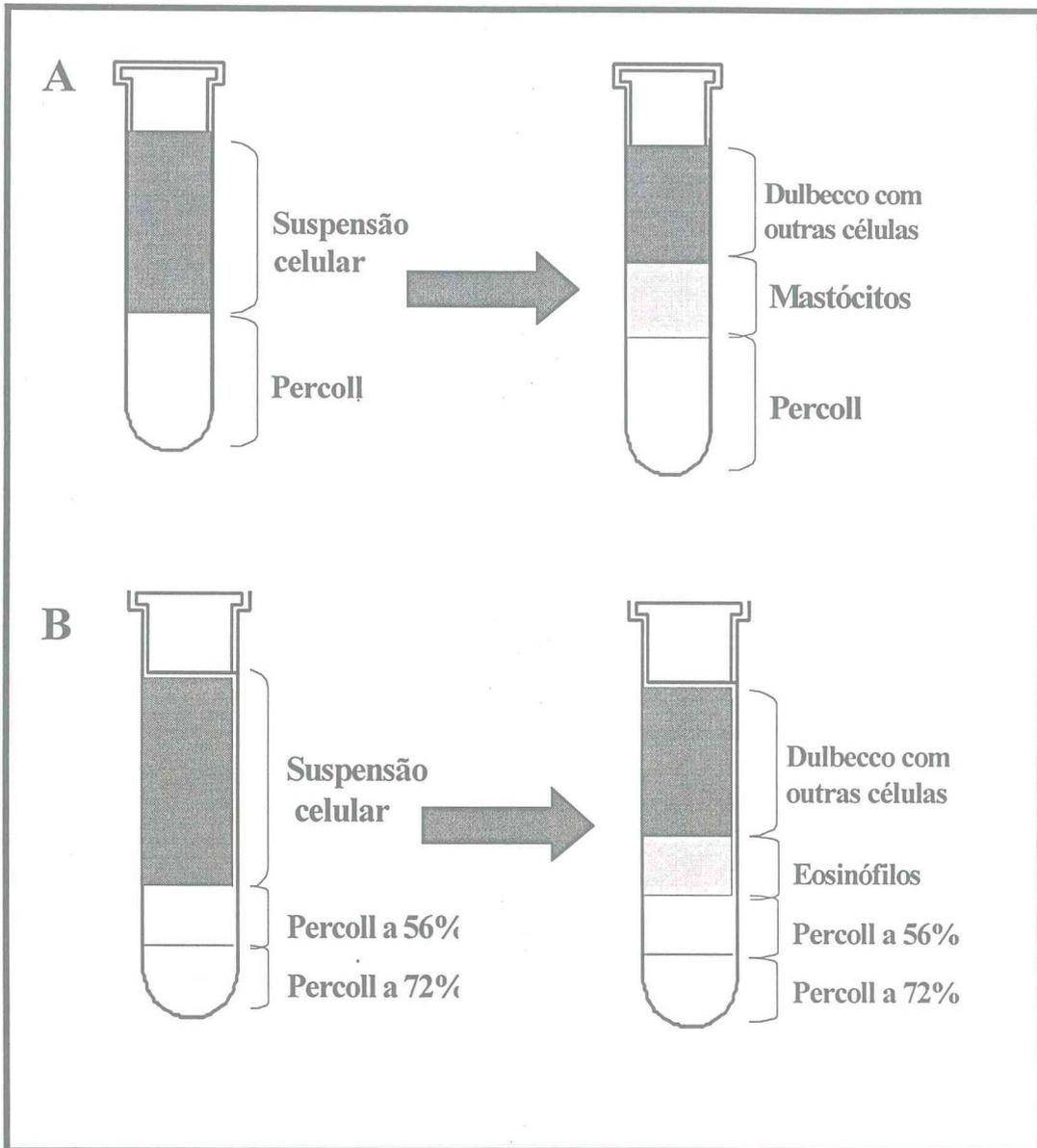


Figura 11 - Isolamento de mastócitos ou eosinófilos da lâmina própria intestinal.

Células intestinais foram isoladas e o precipitado final ressuspensa em 10 ml de Dulbecco. (A) Para o isolamento de mastócitos, esta suspensão celular foi adicionada ao Percoll (10:1; 3 ml/tubo) e (B) para eosinófilos, a suspensão celular foi adicionada a tubos contendo duas camadas de soluções de Percoll a 56 (3ml) e 72% (2ml) superpostas e centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos, sendo ao final formada uma monocamada intermediária contendo os mastócitos. A monocamada obtida contendo mastócitos ou eosinófilos foi ressuspensa em 10 ml de Dulbecco e centrifugada a 2000 rpm durante 7 minutos. Esse processo foi repetido e o precipitado final ressuspensa em Dulbecco.

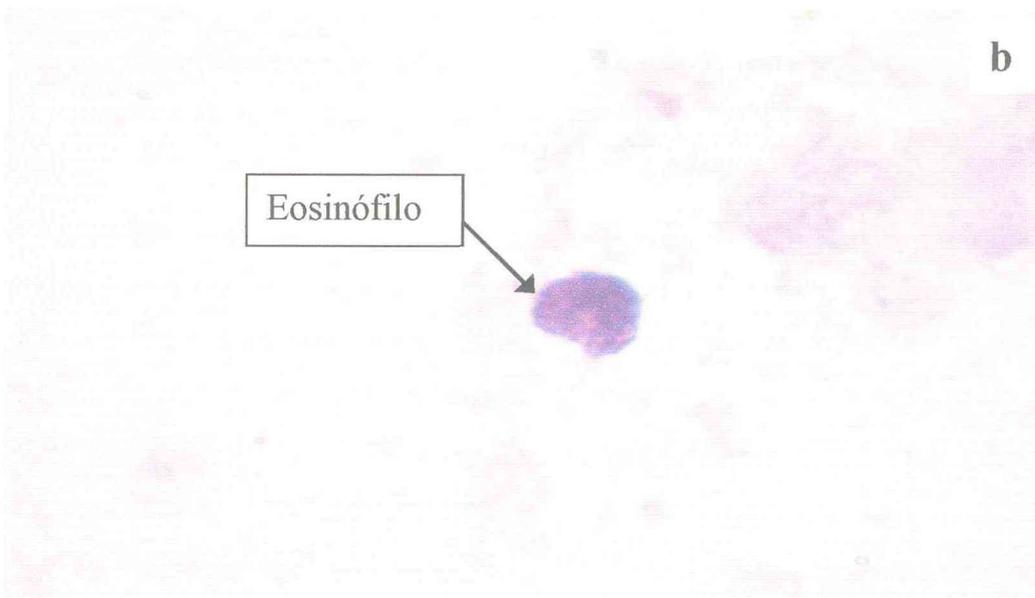
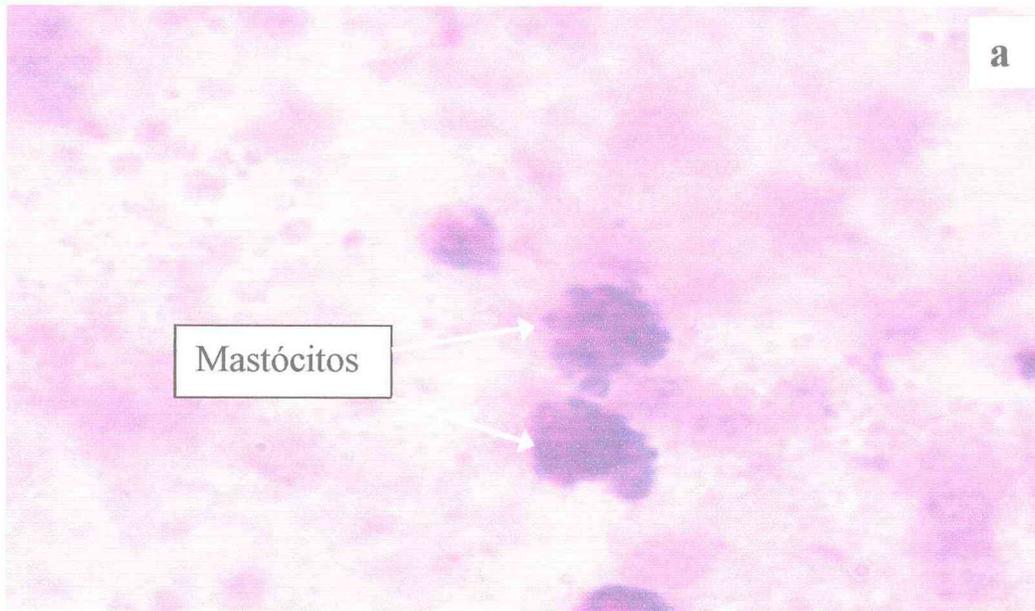


Figura 12 – Microfotografias de mastócitos e eosinófilo isolados da lâmina própria intestinal de rato. a) As setas indicam mastócitos da lâmina própria intestinal de rato, com seus respectivos grânulos. b) A seta indica eosinófilo apresentando núcleo bilobulado da lâmina própria intestinal de rato (May Grunwald-Giemsa, 100x).

3.9.6. Avaliação *in vivo* da atividade do sobrenadante obtido da cultura de mastócitos ou eosinófilos sobre a atividade do sobrenadante de macrófagos

O sobrenadante obtido de mastócitos ou eosinófilos em cultura, estimulados com ovalbumina, foi administrado i.p. em animais normais. Após 30 minutos, os animais receberam o sobrenadante obtido de macrófagos também estimulados com ovalbumina em cultura (1 ml; i.p.).

A avaliação da migração de eosinófilos foi feita 4 horas após a administração do sobrenadante liberado de macrófagos estimulados. O controle do experimento foi o grupo de animais que recebeu apenas o sobrenadante obtido de macrófagos estimulados sem tratamento prévio. O controle geral foi feito com os animais que receberam o meio Dulbecco (1 ml; i.p.) (**Figura 13**).

3.9.7. Avaliação *in vitro* da atividade do sobrenadante da cultura de macrófagos quando pré-incubado com sobrenadante da cultura de mastócitos ou eosinófilos

Mastócitos ou eosinófilos isolados da lâmina própria intestinal em cultura foram estimulados durante 60 minutos com ovalbumina (10 μ g/ml), conforme descrito anteriormente. Os sobrenadantes dessas células foram usados na cultura de macrófagos, sendo adicionados à cultura 30 min antes do estímulo ovalbumina. O sobrenadante final obtido da cultura de macrófagos pré-incubados com Sob de mastócitos ou eosinófilos administrado i.p. em animais normais e comparados àqueles que receberam o sobrenadante obtido da monocamada de macrófagos estimulados com ovalbumina. O controle geral do experimento foi estabelecido com animais que receberam apenas 1 ml de Dulbecco por via intraperitoneal (**Figura 13**).

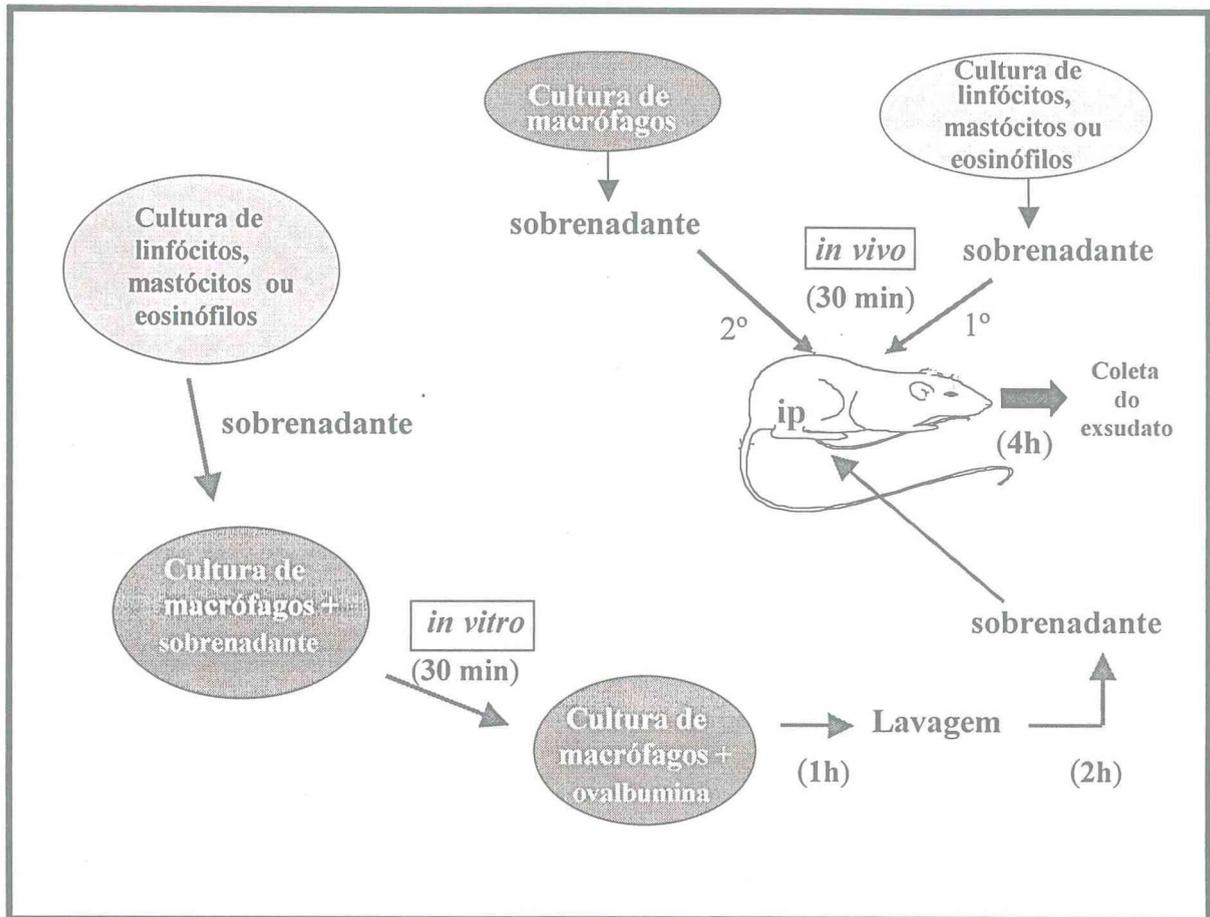


Figura 13 - Manuseio dos sobrenadantes de macrófagos, linfócitos, mastócitos ou eosinófilos intestinais *in vivo* ou *in vitro*. Linfócitos, mastócitos ou eosinófilos em cultura foram estimulados com ovalbumina por 60 min. Os sobrenadantes foram injetados em animais normais 30 min antes da injeção do sobrenadante de macrófagos (avaliação da combinação *in vivo*) ou adicionados a culturas de macrófagos (avaliação da combinação *in vitro*). Nesta, os macrófagos eram pré-incubados por 30 min por Sob de linfócitos, mastócitos ou eosinófilos, sendo em seguida estimulados com ovalbumina (10µg/ml) por 1h. Procedia-se a lavagem (3 x) com meio Dulbecco e incubação por 2 h em CO₂. O sobrenadante final foi coletado e injetado em animais normais.

3.10. Dosagens de citocinas

Os níveis de TNF- α e IL-1 β nos sobrenadantes de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos isolados da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados, estimulados com ovalbumina, foram determinados através de ELISA específicos (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; RAT TNF- α e RAT IL-1 β ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA) e as dosagens comparadas aos níveis de animais não sensibilizados. Os kits foram usados de acordo com as especificações do fabricante.

3.10.1. Ensaio para detecção de TNF- α

Os níveis de TNF- α nos sobrenadantes de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos isolados a lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados ou não estimulados com ovalbumina foram analisados por meio de um *kit* de ELISA, específico para essa citocina (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat TNF- α ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA) (**Figura 14**).

Para tanto, inicialmente foi colocado 50 μ l do diluente-padrão em cada poço que continha um anticorpo específico para TNF- α de rato. A seguir, 50 μ l das amostras, assim como 50 μ l dos padrões, nas respectivas diluições (15,6, 31,2 62,5, 125, 250, 500 e 1000 pg/ml), foram distribuídos em cada poço da placa. A etapa subsequente constou da adição de 50 μ l do segundo anticorpo anti-TNF- α . Após esse procedimento, a placa foi incubada à temperatura ambiente, por mais 1,5 hora. Passado esse período, as amostras e padrões foram descartados e os poços lavados, quatro vezes, com uma solução-tampão fornecida pelo próprio fabricante.

Em outra etapa, foram distribuídos 100 μ l de estreptavidina-HRP, por poço, e logo em seguida, a placa foi incubada por 45 minutos, a 25°C. Posteriormente, o conteúdo dessa placa foi descartado e repetiu-se o procedimento da lavagem, consoante a metodologia descrita.

Por último, foram adicionados 100 μ l de cromógeno a cada poço e, subsequentemente, a placa foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Logo após essa etapa, colocaram-se 100 μ l/poço da solução bloqueadora de reação. A leitura da absorbância foi realizada imediatamente, a 450 nm, sendo os níveis de TNF- α expressos em picogramas por ml.

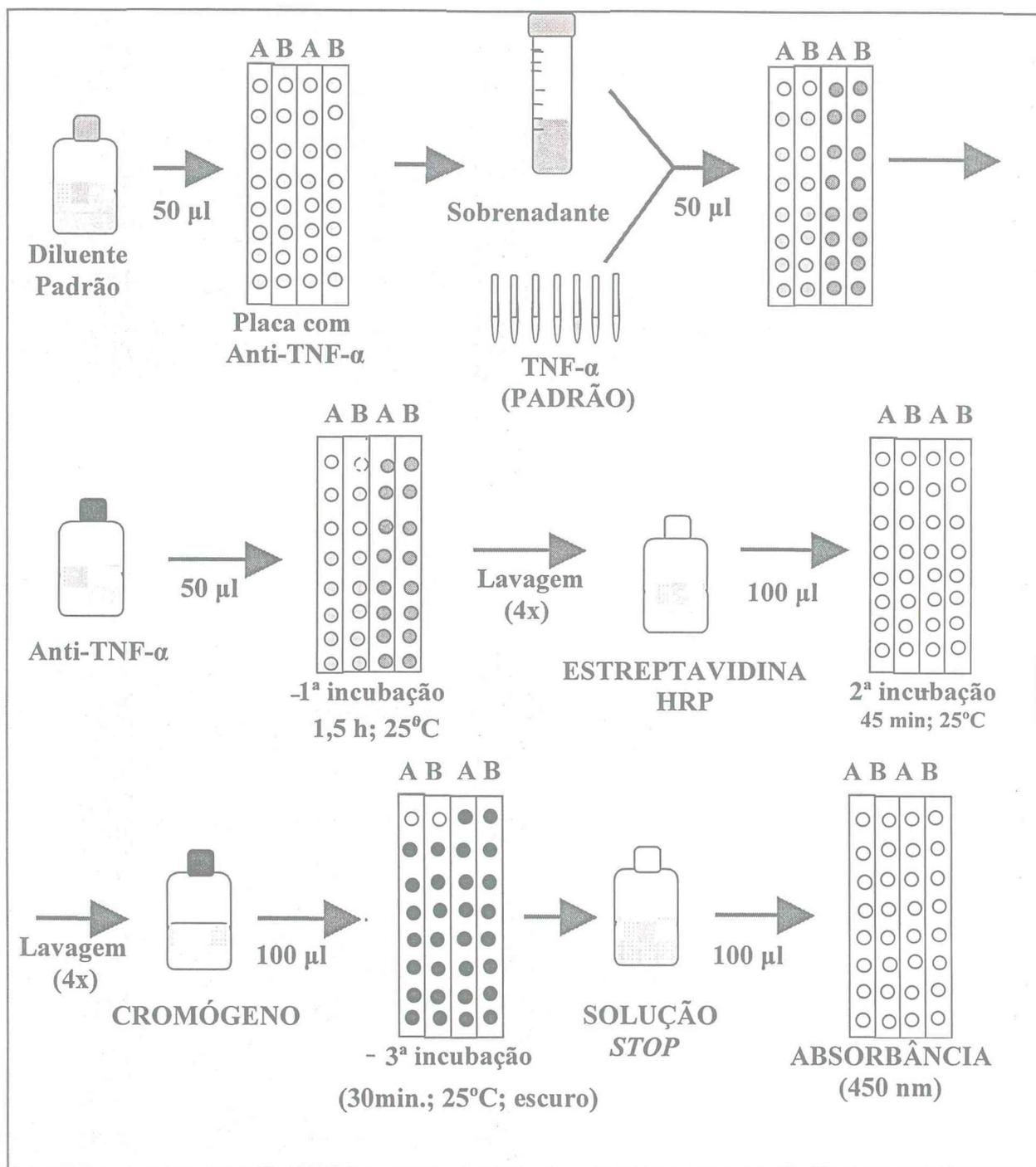


Figura 14 - Ensaio para detecção de TNF- α . Esse painel representa um desenho esquemático das várias etapas do ELISA para TNF- α passando pelas etapas da distribuição do diluinte-padrão, das amostras dos sobrenadantes de cultura de células e do anticorpo anti-TNF- α , incubações e leitura da absorbância.

3.10.2. Ensaio para detecção de IL-1 β

Os sobrenadantes das células intestinais foram obtidos conforme técnica descritas anteriormente. A concentração de IL-1 β foi determinada através de um ELISA específico (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; Rat IL- 1 β ; Biosource International, Camarillo, Califórnia, USA) (**Figura 15**).

O *kit* para IL-1 β foi usado de acordo com as especificações do fabricante. Dessa forma, 100 μ l do diluente-padrão foram distribuídos em cada poço, contendo um anticorpo para IL-1 β . A seguir, distribuíram-se 100 μ l da amostra/poço, sendo a placa imediatamente coberta e incubada por 3 horas, a 37°C. Após esse período, o material foi descartado e os poços lavados, quatro vezes, com uma solução tampão.

Na etapa seguinte, 100 μ l de anti- IL-1 β foram adicionados a cada poço e aí permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, as soluções foram desprezadas e os poços novamente lavados, por mais 4 vezes, com o líquido-tampão. Após este procedimento, 100 μ l de streptavidina-HRP foram distribuídos em cada poço. A placa foi coberta e deixada por mais um período de 30 minutos à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, essa placa foi esvaziada e lavada de acordo com o método descrito anteriormente.

A fase subsequente consistiu na adição de 100 μ l de cromógeno a cada poço. Nessa etapa, a placa foi incubada, por 30 minutos, à temperatura ambiente e em local escuro. Logo em seguida, 100 μ l da solução bloqueadora de reação foram adicionados aos poços. Por fim, a leitura da absorbância foi realizada a 450 nm, sendo os níveis de IL-1 β expressos em picogramas por ml.

As curvas do padrão foram construídas para cada experimento de forma análoga à descrita anteriormente. Contudo, inicialmente foram adicionados aos poços 100 μ l dos padrões de IL-1 β nas respectivas diluições (46,9, 93,7, 187, 375, 750, 1500 e 3000 pg/ml), em substituição aos sobrenadantes das células.

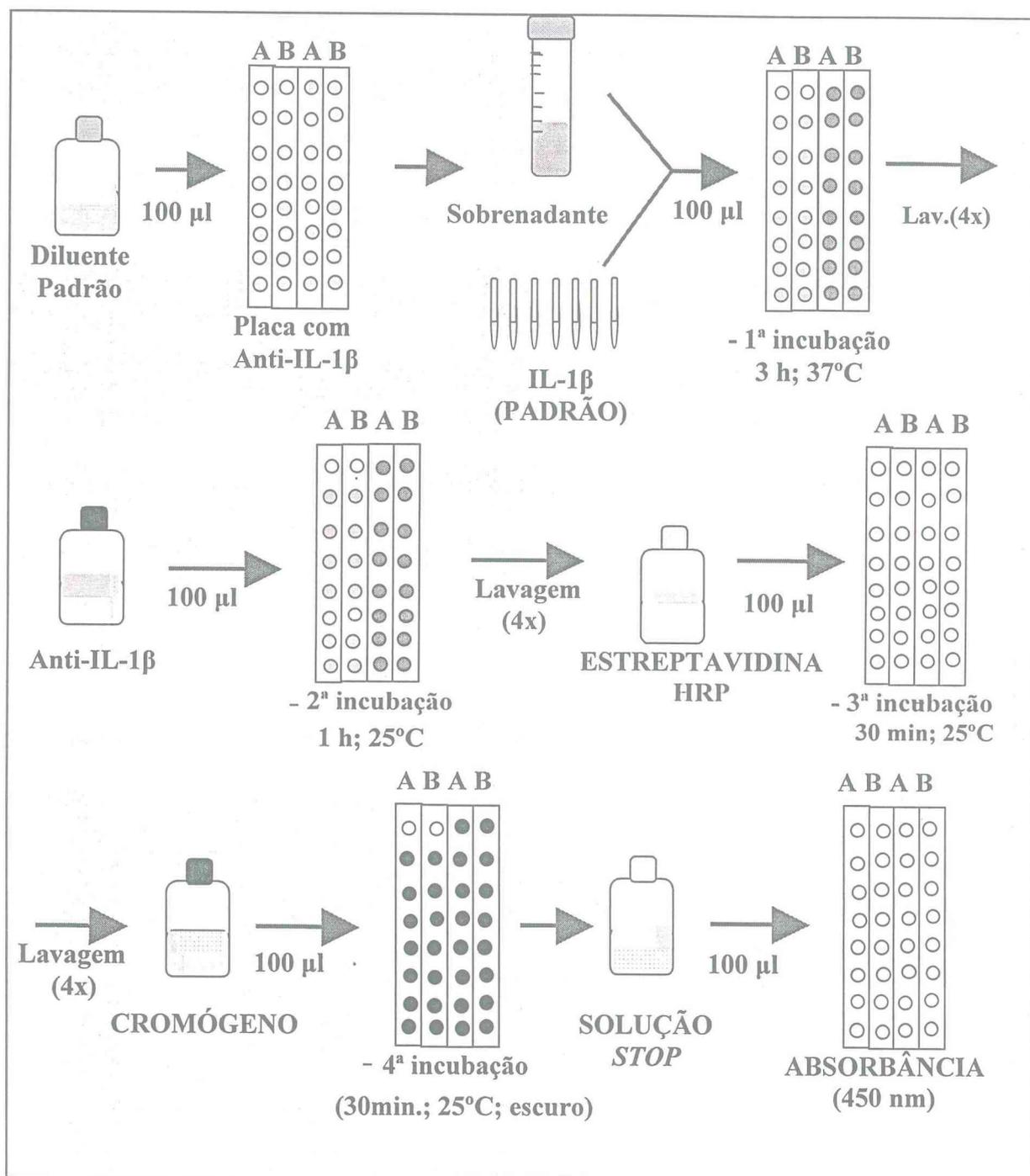


Figura 15 - Ensaio para detecção de interleucina-1 β . Esse esquema representa as várias etapas do ELISA para IL-1 β passando pelas etapas da distribuição do diluente padrão, das amostras dos sobrenadantes de células e do anticorpo anti-IL-1 β , incubações e leitura da absorbância.

3.11. Análise da viabilidade celular

Ao final de cada cultura de células, a viabilidade celular foi analisada através da técnica do corante azul de Trypan. Para tanto, uma pequena amostra da suspensão celular era ressuspensa em 200 μ l de meio. Da suspensão celular, eram retirados 20 μ l e adicionados a 5 μ l do corante azul de Trypan, em lâmina de microscopia. A análise era feita por microscopia óptica, com base na morfologia celular e na impregnação do corante. Assim, identificavam-se as células com aspecto fluorescente como sendo as células viáveis e as coradas em azul representavam as células não viáveis.

Vale salientar que os macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos foram identificados de 86 a 92% das células totais e a viabilidade foi de 80-90% para os mastócitos e de 85 a 95% para as demais células. Vale também frisar que, nas lâminas observadas, freqüentemente eram encontrados alguns plasmócitos.

3.12. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM de 5 ou 6 animais, na maioria dos experimentos. Para a determinação das diferenças estatísticas entre os grupos, os testes utilizados foram: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni foi utilizado para comparar os diversos grupos no modelo de migração celular utilizando-se os sobrenadantes de cultura de células, e ANOVA seguido de teste T pareado para análise dos dados do edema de pata. $P < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

4. RESULTADOS

Nunca digamos que estamos muito ocupados e que não temos tempo para Deus.

Sobre isto Ele nos diz: Dá-me o teu tempo e farei mais da metade de teu trabalho.

Dá-me as tuas orações e abrirei para ti os inexauríveis tesouros do céu.

Clarence J.ENZLER

4. Resultados

Os resultados do presente estudo foram divididos em três partes: 1) Avaliação do efeito pró-inflamatório de ovalbumina no modelo de edema de pata em ratos sensibilizados; 2) Avaliação da atividade do sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos; 3) Avaliação da atividade do sobrenadante de cultura de células isoladas (macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos) da lâmina própria intestinal de ratos sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos, dando maior enfoque a participação de macrófagos intestinais.

4.1. Avaliação farmacológica do edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados

4.1.1. Curva dose-efeito de edema de pata induzido por ovalbumina

A injeção intraplantar de 10 µg/pata de ovalbumina induziu edema em ratos pré-sensibilizados com ovalbumina nas doses de 1, 10, 30, 100 e 200 µg/rato (**Figura 16**). Na dose de 10 µg/rato para sensibilização, o edema apresentou um início rápido, atingindo o pico 1 h após o estímulo. Nas doses escolhidas para este estudo (30 µg/rato para sensibilizar e 10 µg/pata para estimular), o edema alcançou um pico máximo aproximadamente 2 h após o estímulo, seguiu por uma diminuição gradual e 24h após o efeito estava praticamente ausente.

4.1.2. Curva temporal do edema de pata induzido por ovalbumina

Para avaliar o curso temporal de sensibilização, foram utilizadas os intervalos de 3, 7, 14, 21, 28 e 56 dias. O edema aumentou nos grupos de até 21 dias após a sensibilização (**Figura 17**), passou a diminuir a partir de 28 dias de sensibilização. Enquanto na dose mais alta de sensibilização (200 µg/rato) o edema foi mais duradouro, aumentando até 28 dias após a sensibilização (dados não mostrados). Os grupos de ratos não-sensibilizados ou pseudo-sensibilizados com Al(OH)₃ (controles) não foram detectados edema com a injeção intraplantar de ovalbumina.

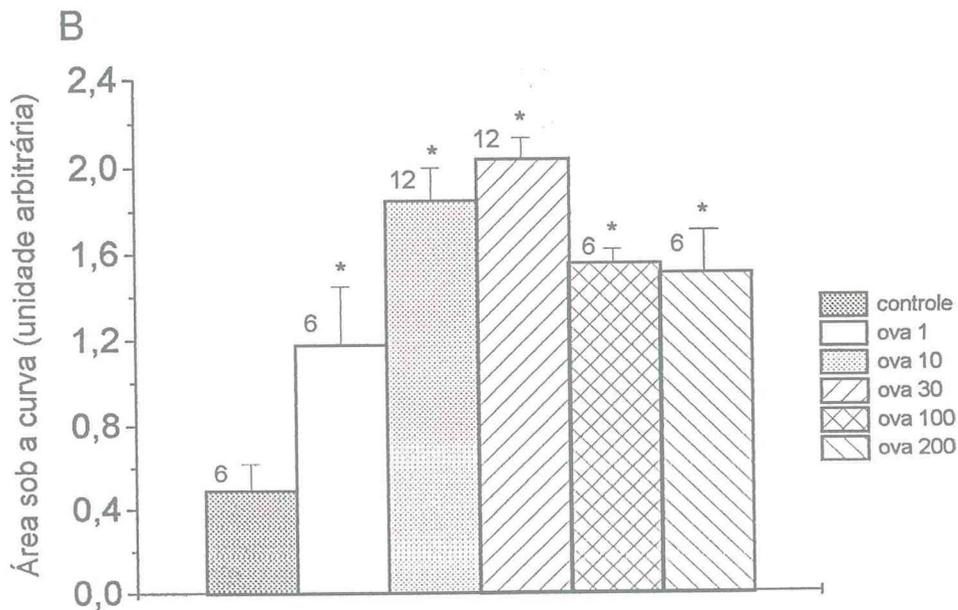
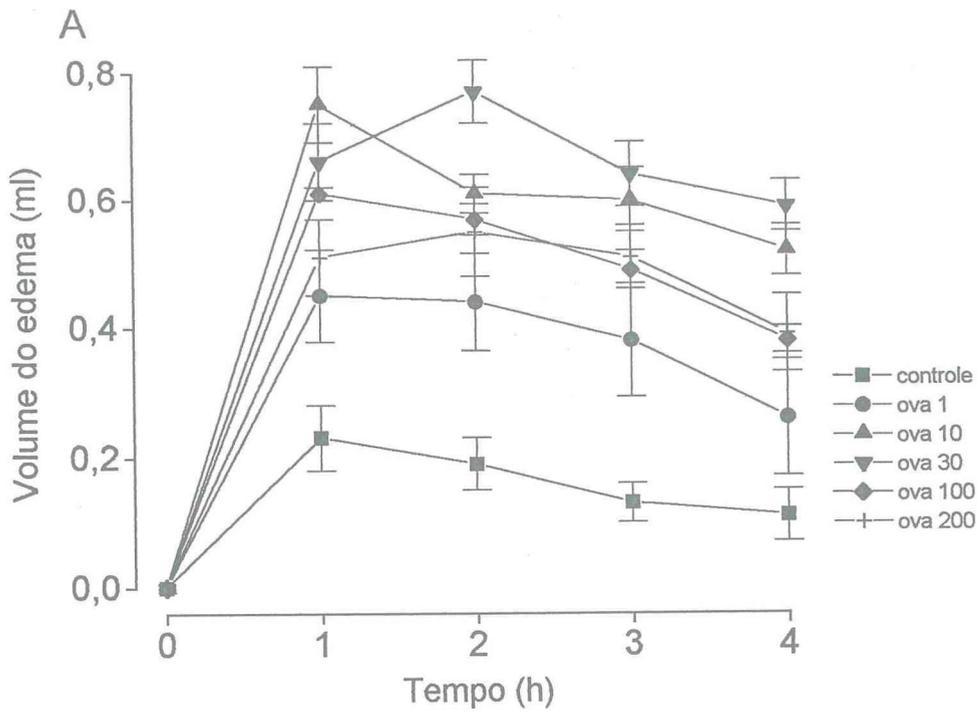


Figura 16 - Curva dose de sensibilização de ratos antes da indução do edema de pata induzido por ovalbumina (ova). (A) Ratos foram pseudo-sensibilizados com $Al(OH)_3$ (controle) ou pré-sensibilizados com ova nas doses de 1, 10, 30, 100 e 200 μg /rato e 14-18 dias depois o estímulo foi injetado ipl (10 μg /pata). O edema foi avaliado 1, 2, 3 e 4 h após o estímulo e expresso como o aumento do volume da pata (ml) acima do volume basal. (B) A área sob a curva tempo-resposta foi determinada usando uma curva trapezoidal. Cada ponto representa a média \pm EPM para o número de animais indicados acima. Os asteriscos indicam as diferenças significativas comparadas ao grupo pseudo-sensibilizado (controle). ($p < 0,05$; ANOVA, teste t de *Student* pareado).

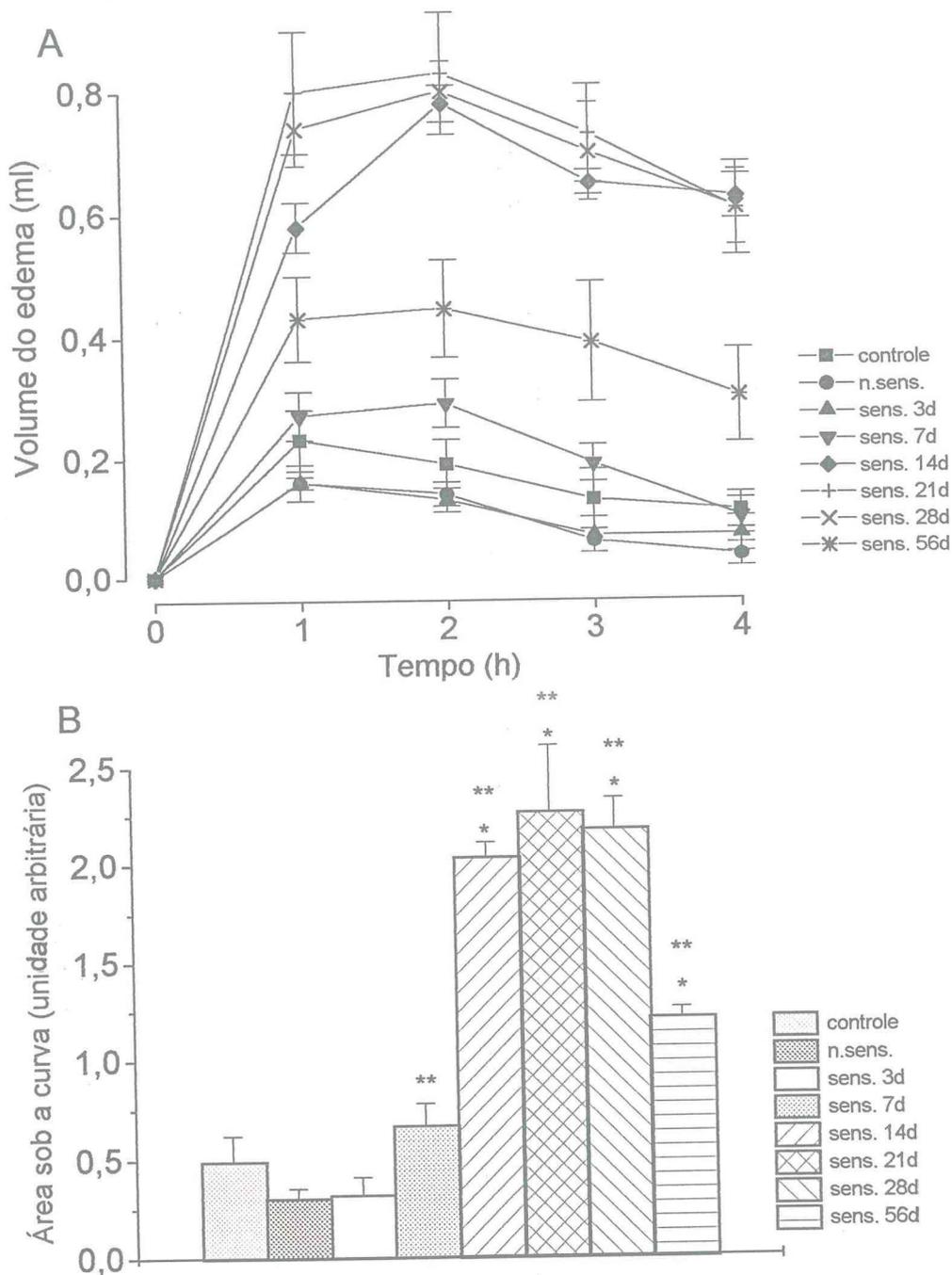


Figura 17 - Curva temporal de sensibilização de ratos antes da indução do edema de pata induzido por ovalbumina (ova). (A) O edema induzido por ova (10 μg /pata) foi injetado nos seguintes grupos de ratos: pseudo-sensibilizado (controle), não-sensibilizado (n.sens.) ou sensibilizado (sens.) com ova (30 μg /rato) em diferentes dias (d) pós-sensibilização. O edema foi avaliado 1, 2, 3 e 4 h após o estímulo e expresso como o aumento do volume da pata (ml) acima do volume basal. (B) A área sob a curva tempo-resposta foi determinada usando uma curva trapezoidal. Cada ponto representa a média \pm EPM para o número de animais ($n=6$). As diferenças significativas foram comparadas aos respectivos controles: *comparado ao grupo pseudo-sensibilizado (controle) ou **comparado ao grupo não-sensibilizado ($p<0,05$; ANOVA, teste t de Student pareado).

4.1.3. Efeito dos bloqueadores de derivados do ácido araquidônico sobre o edema induzido por ovalbumina

O pré-tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/kg) foi efetivo em inibir o edema alérgico. Os agentes anti-inflamatórios não-esteróides, indometacina (2 mg/kg), MK-886 (10 mg/kg), NDGA (60 mg/kg) e WEB 2096 (5 mg/kg) não inibiram essa resposta quando comparados ao grupo PBS (controle; animais pré-tratados apenas com PBS). Assim como, a combinação de indometacina (2 mg/kg) + MK-886 (10 mg/kg) + cetotifeno (10 mg/kg) também não afetou o edema induzido por ovalbumina (**Tabela 8**). Portanto, sugere-se que os metabólitos do ácido araquidônico não participam dessa reação inflamatória. Dados anteriores do Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI/IBIMED) têm mostrado que essas doses inibem as correspondentes vias do metabolismo do ácido araquidônico em ratos (ROCHA *et al.*, 1997).

4.1.4. Papel de aminas endógenas sobre o edema induzido por ovalbumina

As aminas vasoativas parecem estar envolvidas, desde que as drogas difenidramina (anti-histamínica H1), ciproheptadina (anti-H1/5HT2) e metisergida (anti-serotoninérgica: primariamente anti-5HT2), reduziram o edema imune (**Figuras 18 e 19 Tabela 9**). A inibição induzida por difenidramina foi dose-dependente e observada em todas as doses (25, 50, 75 e 100 mg/kg; s.c.). A maior dose (100 mg/kg) quase completamente bloqueou o edema induzido por ovalbumina (**Figura 18**). Em contraste, meclizina (anti-H1 clássico) falhou em inibir o edema imune (**Tabela 9**). Em adição, ciproheptadina também reduziu o edema de maneira bifásica, ou seja, o maior índice de redução ocorreu na dose de 2mg/kg e com o aumento da dose (3mg/kg) a redução foi menor (**Figura 16**).

4.1.5. Efeito do composto 48/80 e estabilizadores de mastócitos sobre o edema induzido por ovalbumina

A depleção de mastócitos por tratamento sistêmico com composto 48/80 potencializou a resposta edematogênica, de forma significativa (**Tabela 9**). Por outro lado, cetotifeno (10 mg/kg), estabilizador de mastócitos, não afetou o edema imune (**Tabela 9**). Em adição, o pré-tratamento dos animais com cromolina ou cromoglicato de sódio, outro estabilizador de mastócitos, levemente influenciou o edema induzido

por ovalbumina. Na mais alta dose (20 mg/kg), houve uma redução do edema apenas em animais jovens, enquanto na mais baixa dose de 5 mg/kg, induziu um leve aumento na resposta edematogênica que foi detectável somente no tempo de 2h ($0,87 \pm 0,06$; **Tabela 10**), comparados ao grupo PBS ($0,71 \pm 0,04$).

4.1.6. Efeito de bloqueadores de síntese de TNF- α no edema induzido por ovalbumina.

Também foi investigado o efeito de drogas como talidomida, inibidor de síntese de TNF, e pentoxifilina, inibidor da síntese de TNF e IL-1. A **Tabela 11** mostra que talidomida (90 mg/kg) e pentoxifilina (90 mg/kg) não previnem formação de edema induzido por ovalbumina em ratos. No entanto, uma inibição significativa por chorpromazina, droga anti-TNF/anti-5HT₂, foi observada em todas as doses (**Tabela 12**).

Tabela 8 - Anti-inflamatórios clássicos não inibiram o edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.

Tratamento ^a	Dose (mg/kg)	Tempo (horas)				Farmacologia
		1	2	3	4	
PBS (n=6) ^b		0,70 ± 0,10	0,65 ± 0,06	0,60 ± 0,04	0,53 ± 0,03	
Indometacina (n=6)	2	0,73 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,6 ± 0,05	0,52 ± 0,05	Inibidor de cicloxigenase
MK-886 (n=5)	10	0,54 ± 0,09	0,57 ± 0,10	0,48 ± 0,08	0,39 ± 0,09	Inibidor de lipoxigenase
NDGA (n=5)	60	0,72 ± 0,06	0,80 ± 0,08	0,72 ± 0,07	0,60 ± 0,06	Inibidor de cicloxigenase e lipoxigenase
WEB 2086 (n=6)	5	0,58 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,54 ± 0,03	0,46 ± 0,03	Antagonista de PAF
Cetotifeno (n=6)	10	0,62 ± 0,03	0,55 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,50 ± 0,03	Estabilizador de mastócitos
Indometacina+MK886 + Cetotifeno (n=5)	-	0,56 ± 0,06	0,59 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,52 ± 0,02	Combinação nas doses indicadas

Resultados foram expressos como média ± EPM do aumento do volume (ml) da pata.

^a Ovalbumina (10µg/100µl) foi injetada i.pl. e edema foi medido após 1, 2, 3 e 4 h.

^b Número de animais/grupo entre parênteses.

Tabela 9 - Efeito de drogas anti-histamínicas e anti-alérgicas sobre o curso temporal do edema induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.

Tratamento ^a	Dose (mg/kg)	Tempo (horas)				Farmacologia
		1	2	3	4	
PBS (n=6) ^b		0,70 ± 0,10	0,65 ± 0,06	0,60 ± 0,04	0,53 ± 0,03	
Meclizina (n=5)	30	0,64 ± 0,06	0,52 ± 0,04	0,55 ± 0,05	0,47 ± 0,07	Anti-histamínico H1
Metisergida (n=5)	5	0,21 ± 0,04*	0,36 ± 0,06*	0,25 ± 0,06*	0,26 ± 0,07*	Bloqueador 5-HT ₁ /5-HT ₂
Cetotifeno (n=6)	10	0,62 ± 0,03	0,55 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,50 ± 0,03	Estabilizador de mastócitos
Composto 48/80 (n=6)		0,85 ± 0,05	0,92 ± 0,03*	0,84 ± 0,05*	0,68 ± 0,03*	Depletor de mastócitos
Dexametasona (n=5)	0,5	0,29 ± 0,02*	0,41 ± 0,02*	0,38 ± 0,03*	0,23 ± 0,02*	Glicocorticoide

Resultados foram expressos como média ± EPM do aumento do volume (ml) da pata.

^a Ovalbumina (10µg/100µl) foi injetada i.pl. e edema foi medido após 1, 2, 3 e 4 h.

^b Número de animais/grupo entre parênteses.

* P<0,05 (ANOVA, teste t de Student), comparado ao grupo PBS.

Tabela 10 - Efeito do estabilizador de mastócitos (cromolina) sobre o curso temporal do edema induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.

Tratamento ^a	Dose (mg/kg)	Tempo (horas)			
		1	2	3	4
PBS (n=15)		0,75 ± 0,05	0,71 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,56 ± 0,03
Cromolina (n=6)	5	0,73 ± 0,06	0,87 ± 0,06*	0,72 ± 0,04	0,61 ± 0,05
Cromolina (n=6)	10	0,70 ± 0,06	0,76 ± 0,06	0,63 ± 0,04	0,64 ± 0,05
Cromolina (n=6)	20	0,69 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,47 ± 0,03
Cromolina (n=6) ^b	20	0,37 ± 0,04*	0,44 ± 0,04*	0,43 ± 0,02*	0,38 ± 0,01*

Resultados foram expressos como média ± EPM do aumento do volume (ml) da pata.

^a Ovalbumina (10µg/100µl) foi injetada i.pl. e o edema foi medido após 1, 2, 3 e 4 h.

Número de animais/grupo entre parênteses.

* P<0,05 (ANOVA, teste t de *Student* pareado), comparado ao grupo PBS.

^b Ratos jovens pesando em média 130g.

Tabela 11 - Drogas anti-TNF-α não inibiram o edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.

Tratamento ^a	Dose (mg/kg)	Tempo (horas)			
		1	2	3	4
PBS (n=15)		0,75 ± 0,05	0,71 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,56 ± 0,03
Talidomida (n=6) ^b	90	0,65 ± 0,07	0,71 ± 0,07	0,66 ± 0,06	0,63 ± 0,06
Pentoxifilina (n=6)	90	0,64 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,50 ± 0,04	0,48 ± 0,05

Resultados foram expressos como média ± EPM do aumento do volume (ml) da pata.

^a Ovalbumina (10µg/100µl) foi injetada i.pl. e o edema foi medido após 1, 2, 3 e 4 h.

Número de animais/grupo entre parênteses.

^b DMSO (veículo de talidomida) não afetou edema imune.

Tabela 12 - Efeito de clorpromazina (anti-TNF/anti-5HT2) sobre o curso temporal do edema induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados.

Tratamento ^a	Dose (mg/kg)	Tempo (horas)			
		1	2	3	4
PBS (n=15)		0,75 ± 0,05	0,73 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,56 ± 0,03
Clorpromazina (n=6)	1	0,50 ± 0,06*	0,55 ± 0,05*	0,46 ± 0,05*	0,42 ± 0,05*
Clorpromazina (n=6)	3	0,55 ± 0,07*	0,58 ± 0,08*	0,51 ± 0,07*	0,4 ± 0,06*
Clorpromazina (n=6)	9	0,26 ± 0,05*	0,29 ± 0,02*	0,28 ± 0,05*	0,23 ± 0,04*
Clorpromazina (n=6)	18	0,29 ± 0,04*	0,34 ± 0,4*	0,29 ± 0,04*	0,31 ± 0,03*

Resultados foram expressos como média ± EPM do aumento do volume (ml) da pata.

^a Ovalbumina (10µg/100µl) foi injetada i.pl. e o edema foi medido após 1, 2, 3 e 4 h.

Número de animais/grupo entre parênteses.

* P<0,05 (ANOVA, teste t de *Student* pareado), comparado ao grupo PBS.

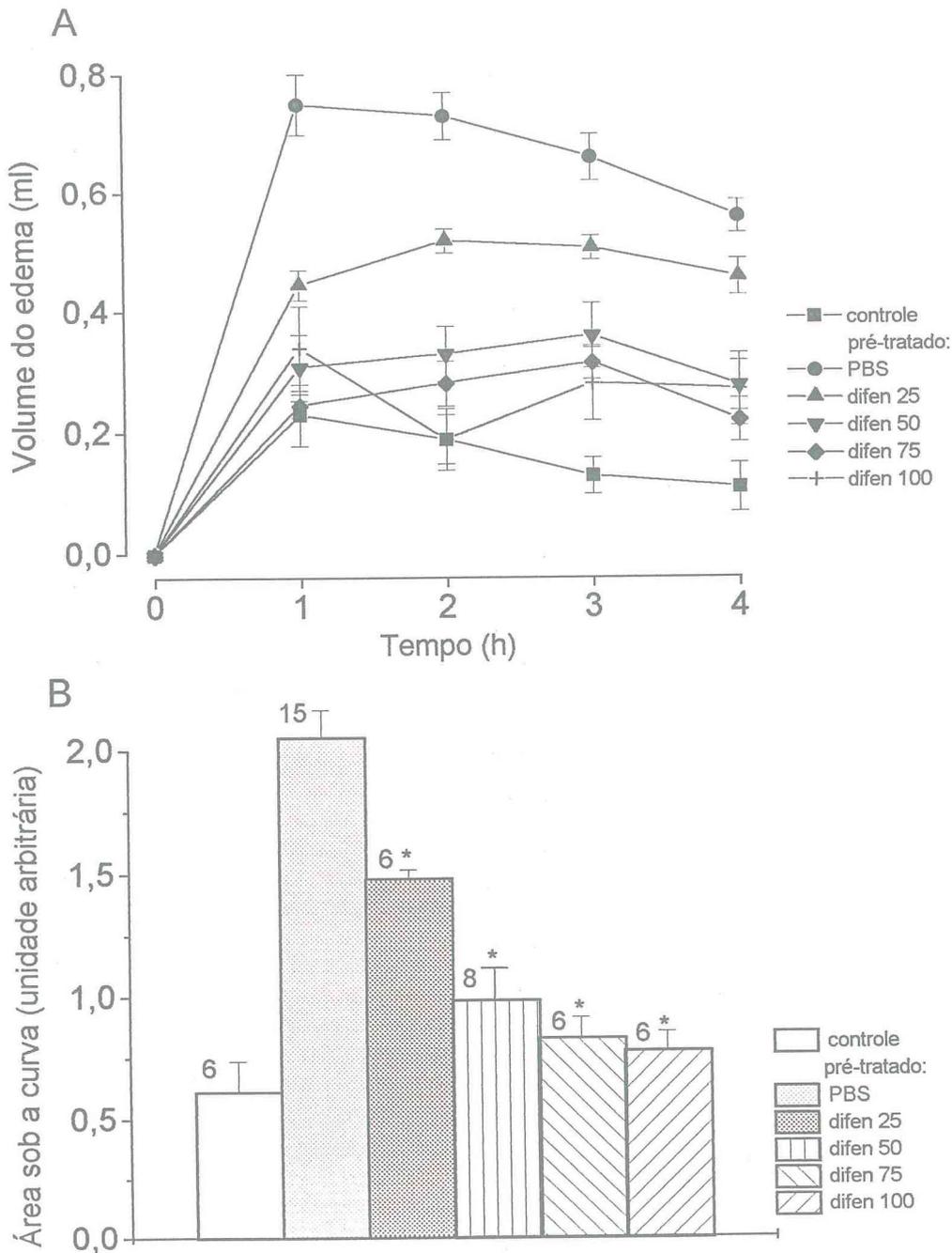


Figura 18 - Inibição por difenidramina (difen; anti-H1) de edema de pata induzido por injeção intraplantar de ovalbumina (ova; 10 µg/pata) em ratos sensibilizados. Quatorze a dezoito dias antes os animais foram pseudo-sensibilizados (controle) ou sensibilizados com ovalbumina (30 µg/rato, i.p.) e tratados 1 h antes do estímulo intraplantar, com PBS ou ciproheptadina s.c. nas doses indicadas. (A) O edema foi avaliado 1, 2, 3 e 4 h após o estímulo e expresso como o aumento do volume da pata (ml) acima do volume basal. (B) A área sob a curva tempo-resposta foi determinada usando uma curva trapezoidal. Cada ponto representa a média ± EPM para o número de animais indicados acima. Os asteriscos indicam as diferenças significativas comparadas ao grupo PBS ($p < 0,05$; ANOVA, teste t de *Student* pareado).

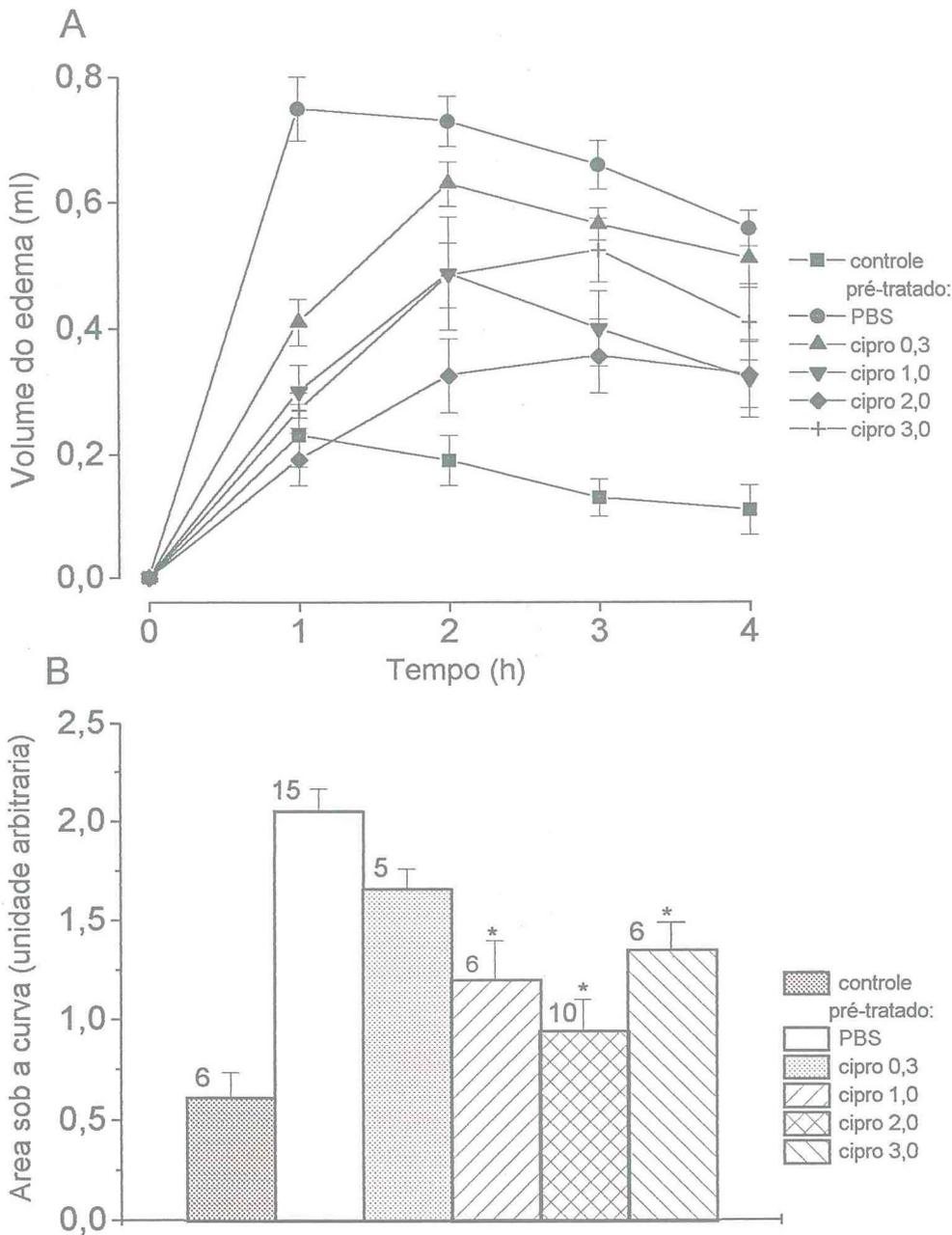


Figura 19 - Inibição por ciproheptadina (cipro; anti-H1/5-HT2) de edema de pata induzido por injeção intraplantar de ovalbumina (ova; 10 μ g/pata) em ratos sensibilizados. Quatorze a dezoito dias antes os animais foram pseudo-sensibilizados (controle) ou sensibilizados com ovalbumina (30 μ g/rato, i.p.) e tratados 1 h antes do estímulo intraplantar, com PBS ou ciproheptadina s.c. nas doses indicadas. (A) O edema foi avaliado 1, 2, 3 e 4 h após o estímulo e expresso como o aumento do volume da pata (ml) acima do volume basal. (B) A área sob a curva tempo-resposta foi determinada usando uma curva trapezoidal. Cada ponto representa a média \pm EPM para o número de animais indicados acima. Os asteriscos indicam as diferenças significativas comparadas ao grupo PBS ($p < 0,05$; ANOVA, teste t de Student pareado).

4.1.7. Estudo histopatológico do edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados

Ao final do experimento, ou seja, após a última medição do edema, no tempo de 4 h, as patas foram removidas para análise histológica. Ao microscópio óptico, foi verificada uma intensa infiltração de neutrófilos e eosinófilos na hipoderme das patas edemaciadas de ratos sensibilizados que haviam sido injetadas com ovalbumina (10 μ g/pata) para a indução do edema (**Figura 20**).

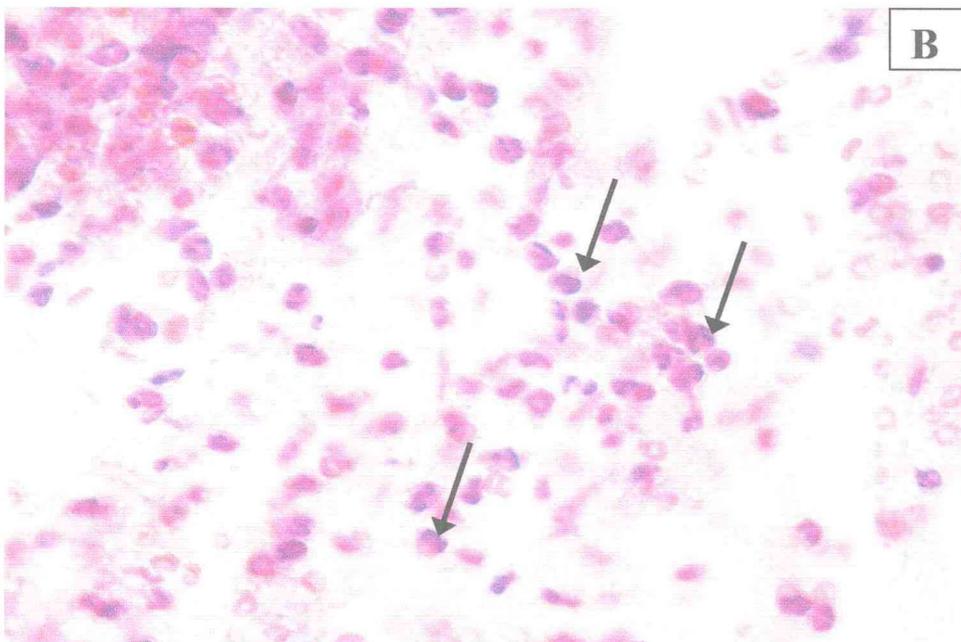
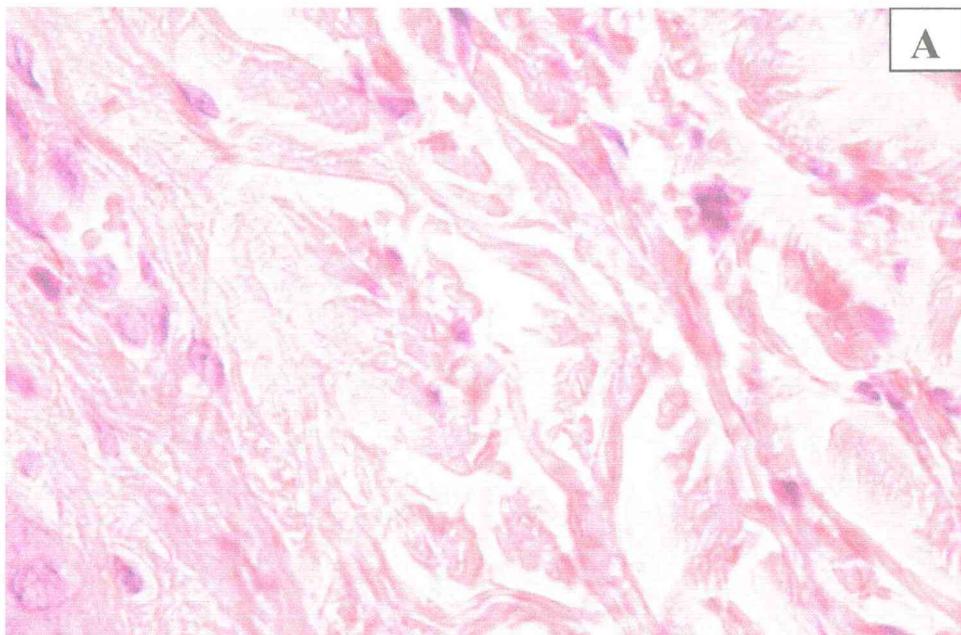


Figura 20 – Estudo histopatológico de patas de ratos com infiltrado leucocitário no local do edema induzido por ovalbumina (10 μ g/pata). Painel A: Mostra corte histológico de uma pata normal sem edema de animais não sensibilizados (controle). **Painel B:** Apresenta corte de uma pata de rato sensibilizado 4 h após a indução do edema, apresentando grande infiltrado leucocitário no local de aplicação da ovalbumina, cujas células predominantes foram neutrófilos e eosinófilos, indicadas por setas (Coloração H.E., aumento de 40x).

Tendo em vista que se obteve resultado positivo, quando testou-se a atividade pró-inflamatória de ovalbumina em ratos sensibilizados no modelo de edema de pata, passou-se, então, a realizar a segunda parte do estudo visando-se a avaliação de células e mediadores envolvidos na alergia intestinal induzida por ovalbumina.

4.2. Avaliação da atividade do sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sobre a migração celular

4.2.1. Avaliação da atividade de sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos normais, sham-sensibilizados e sensibilizados sobre a migração de leucócitos

De início, comparou-se a contagem diferencial de quatro tipos de células: neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos que migraram para a cavidade peritoneal de ratos normais em respostas ao sobrenadante (Sob) de cultura de células totais da lâmina própria intestinal (CLPI) de ratos sensibilizados, estimuladas com ovalbumina.

Foi observada diferença significativa na migração de eosinófilos entre os grupos que receberam sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados estimulados com ovalbumina ($1,029 \pm 0,07$), comparados aos que receberam Sob de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados ($0,317 \pm 0,06$) ou de ratos não sensibilizados ($0,287 \pm 0,11$) ou ao Dulbecco ($0,278 \pm 0,08$) também estimulados com ovalbumina. Também se constatou que o estímulo ovalbumina sobre a cultura foi importante para a migração eosinofílica ($1,029 \pm 0,06$ c/ova; $0,489 \pm 0,07$ s/ova) (**Figura 21**).

Para as demais células (neutrófilos, mononucleares e mastócitos) não houve diferença significativa, em termos de migração dessas células para a cavidade peritoneal nas mesmas condições citadas acima (**Tabela 13**).

Baseando-se nos resultados supra-citados, nos experimentos subseqüentes passou-se a investigar a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de cultura de CLPI de ratos sensibilizados e comparando-se ao Sob de ratos pseudo-sensibilizados, cujas culturas foram estimuladas com ovalbumina.

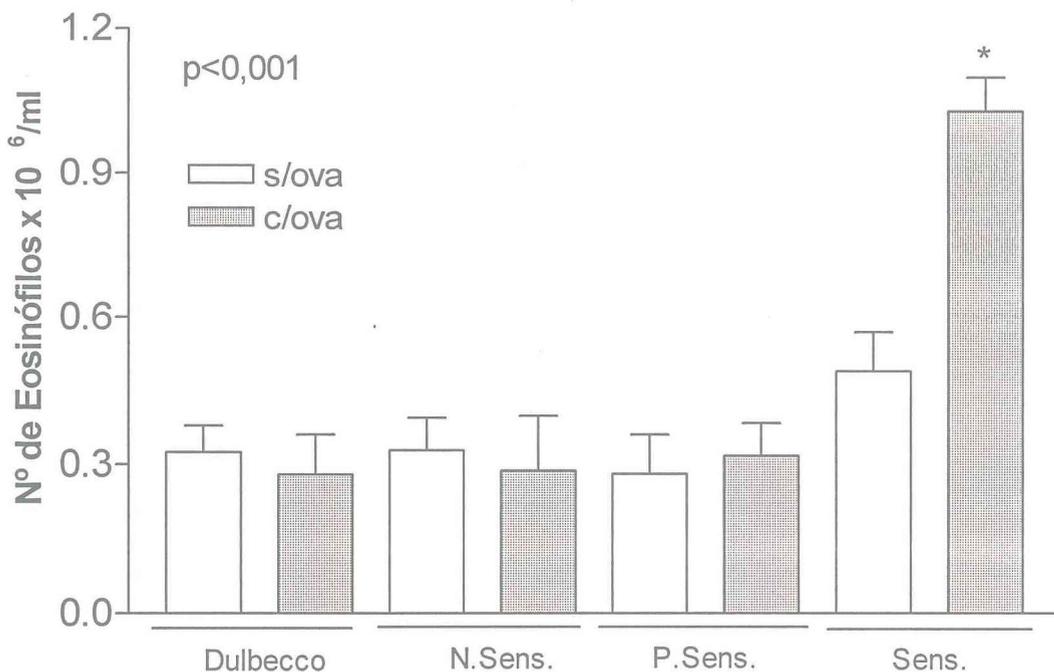


Figura 21 - Efeito do sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas ou não com ovalbumina, de ratos não sensibilizados, pseudo-sensibilizados ou sensibilizados com ovalbumina (ova) sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos não sensibilizados. A Figura mostra que houve migração de eosinófilos (ME) induzida por sobrenadante (Sob) de cultura de células da lâmina própria intestinal (CLPI) estimuladas com ovalbumina *in vitro* de ratos sensibilizados (Sens.) quando comparados aos que receberam Sob de ratos não sensibilizados (N.Sens.) ou pseudo-sensibilizados (P.Sens.) ou o meio Dulbecco sozinho. A ME foi avaliada 4h após a injeção i.p. do estímulo. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 06 animais. * $p < 0,001$ comparado ao grupo que recebeu Sob de ratos sensibilizados sem estímulo ova na cultura. ANOVA–Teste de Bonferroni. **s/ova:** sem estímulo ovalbumina *in vitro*; **c/ova:** com estímulo ovalbumina na cultura de células

Tabela 13 - O sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal (Sob de CLPI) não induziu migração de neutrófilos, mononucleares e mastócitos na cavidade peritoneal de ratos, quando foram comparados os grupos estimulados ou não, com ovalbumina (ova).

Migração de Neutrófilos	n	S/Estímulo ova (Média ± EPM)	n	C/Estímulo ova (Média ± EPM)
Dulbecco (meio)	4	1,07 ± 0,19	5	1,57 ± 0,24
Sob de CLPI de ratos não sensibilizados	6	2,46 ± 0,36	5	1,65 ± 0,34
Sob de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados	6	2,00 ± 0,32	6	1,36 ± 0,07
Sob de CLPI de ratos sensibilizados	6	1,41 ± 0,29	6	1,75 ± 0,25
Migração de Mononucleares				
Dulbecco (meio)	4	3,40 ± 0,27	5	2,74 ± 0,21
Sob de CLPI de ratos não sensibilizados	6	1,98 ± 0,53	5	3,15 ± 0,35
Sob de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados	6	2,86 ± 0,34	6	2,66 ± 0,26
Sob de CLPI de ratos sensibilizados	6	2,89 ± 0,18	6	2,52 ± 0,28
Migração de Mastócitos				
Dulbecco (meio)	4	0,12 ± 0,07	5	0,02 ± 0,04
Sob de CLPI de ratos não sensibilizados	6	0,19 ± 0,10	5	0,23 ± 0,11
Sob de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados	6	0,16 ± 0,09	6	0,05 ± 0,05
Sob de CLPI de ratos sensibilizados	6	0,09 ± 0,04	6	0,11 ± 0,05

Os resultados foram expressos como média ± EPM do número de células x 10⁶ /ml; n: número de animais/grupo

4.2.2. Curso temporal do efeito de sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos.

A resposta migratória de eosinófilos no modelo da cavidade peritoneal aplicando-se o sobrenadante da cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados (Sens.) ou pseudo-sensibilizados (P.Sens.) foi avaliada em diferentes intervalos de tempo pós-estímulo, que variou de duas a 48 horas.

O número de eosinófilos foi significativamente diferente na quarta hora após a injeção de estímulo, comparando-se o grupo de ratos sensibilizados ($1,049 \pm 0,08$) com os pseudo-sensibilizados ($0,368 \pm 0,05$). O número destas células passou a aumentar concomitantemente nos dois grupos a partir de 8h, atingindo valores máximos e equivalentes nos dois grupos na 24^a hora após a administração dos estímulos (**Figura 22**).

Portanto, comparando-se os resultados nos dois grupos a resposta migratória foi significativamente diferente quando o fluido peritoneal para contagem de células foi coletado 4h pós-estímulo (**Figura 22**). Por isso, nos experimentos subseqüentes os estímulos foram sempre aplicados 4 h antes da coleta do exsudato peritoneal.

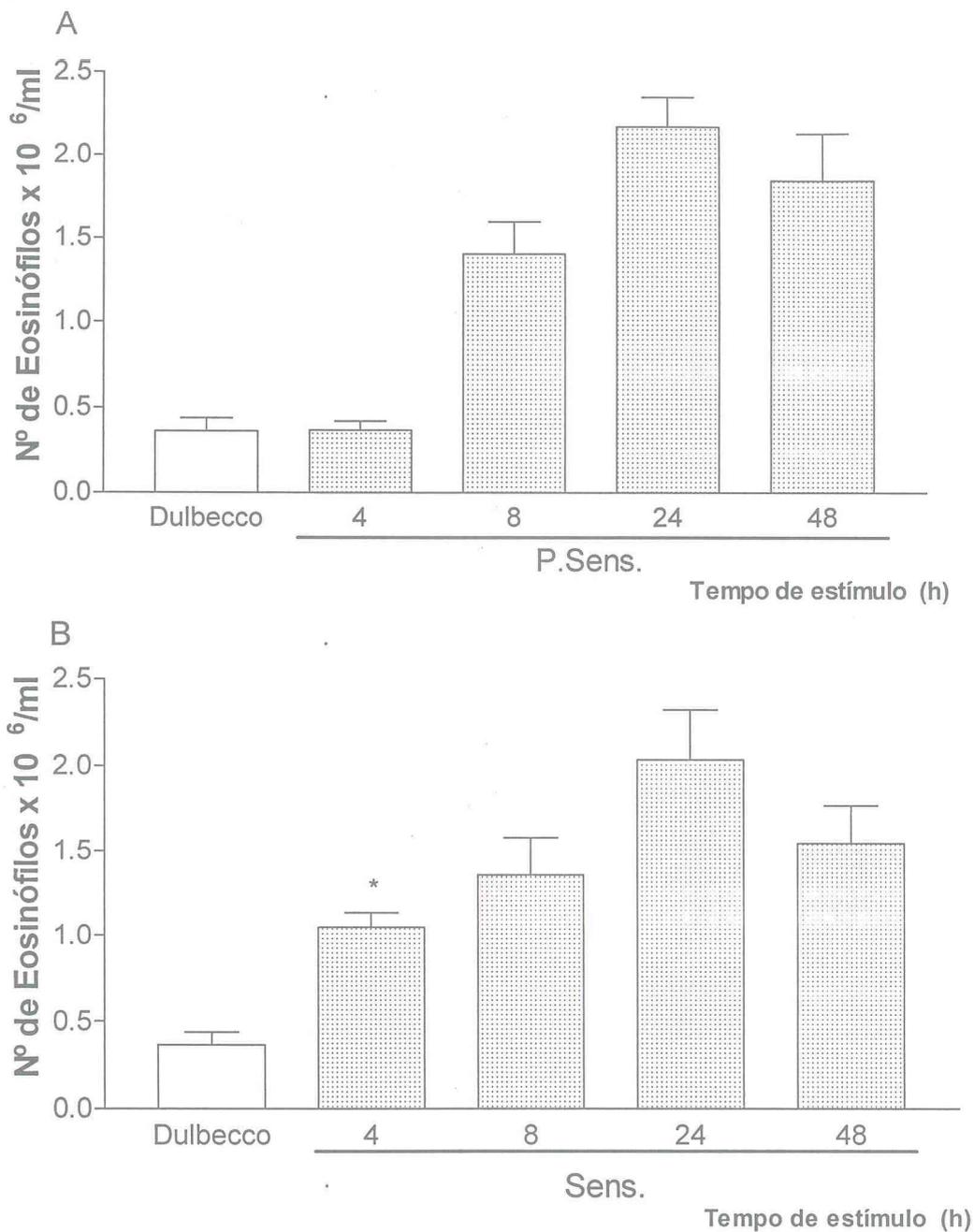


Figura 22 - Curva do tempo-efeito de estímulo na cavidade peritoneal com o sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos. A Figura mostra que no tempo de 4 h pós-estímulo, houve aumento significativo na migração de eosinófilos (ME) induzida por sobrenadante (Sob) de cultura de células da lâmina própria intestinal (CLPI) estimuladas com ova *in vitro* de ratos sensibilizados (Sens.) quando comparados aos que receberam Sob de ratos pseudo-sensibilizados (P.Sens.). A ME foi avaliada nos intervalos de tempo indicados acima, após a injeção i.p. do estímulo. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 06 animais. ANOVA-Teste de Bonferroni.

Vale salientar que a partir dos resultados encontrados inicialmente, sentiu-se a necessidade de realizar outros grupos controles, visando-se avaliar a importância do adjuvante (hidróxido de alumínio) nessa resposta migratória, bem como, se a sensibilização dos ratos utilizados no modelo de migração celular alteraria essa resposta, visto que em nosso protocolo somente eram sensibilizados os ratos utilizados nos protocolos de cultura de células.

Para tanto foram realizados os seguintes grupos:

1) ratos sensibilizados em que nenhum estímulo foi feito na cavidade peritoneal, ou seja, foi somente coletado o exsudato peritoneal para a contagem de células;

2) ratos sensibilizados que receberam na cavidade peritoneal Sob de células da lâmina própria de ratos também sensibilizados;

3) ratos normais (não sensibilizados) que receberam na cavidade peritoneal sobrenadante de cultura de células da lâmina própria de ratos sensibilizados apenas com ovalbumina, sem o adjuvante. O controle desses experimentos foi o grupo de ratos não sensibilizados que recebeu Sob de células da lâmina própria de ratos sensibilizados. Vale ressaltar que nesses grupos as culturas foram sempre estimuladas com ovalbumina.

Observou-se então, que a sensibilização *per si* dos animais no modelo de migração não induz migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal e que o hidróxido de alumínio (adjuvante) na sensibilização, foi importante para potencializar a resposta migratória de eosinófilos (**Figura 23**).

4.2.3. Curso temporal de incubação com ovalbumina da cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos.

As culturas de CLPI foram incubadas com ovalbumina por 30, 60 e 90 min para avaliação do melhor tempo de incubação. Essa resposta foi tempo-dependente, atingindo o pico máximo quando as células foram estimuladas por 90 min. Contudo esse aumento só foi significativo comparando-se os grupos de 30 e 60 min (**Figura 24**). Baseando-se nesses dados, escolheu-se o tempo de incubação de 60 min (1 h) para os experimentos subsequentes, também tendo em vista que quanto menor o tempo de manipulação das células maior será a sua viabilidade.

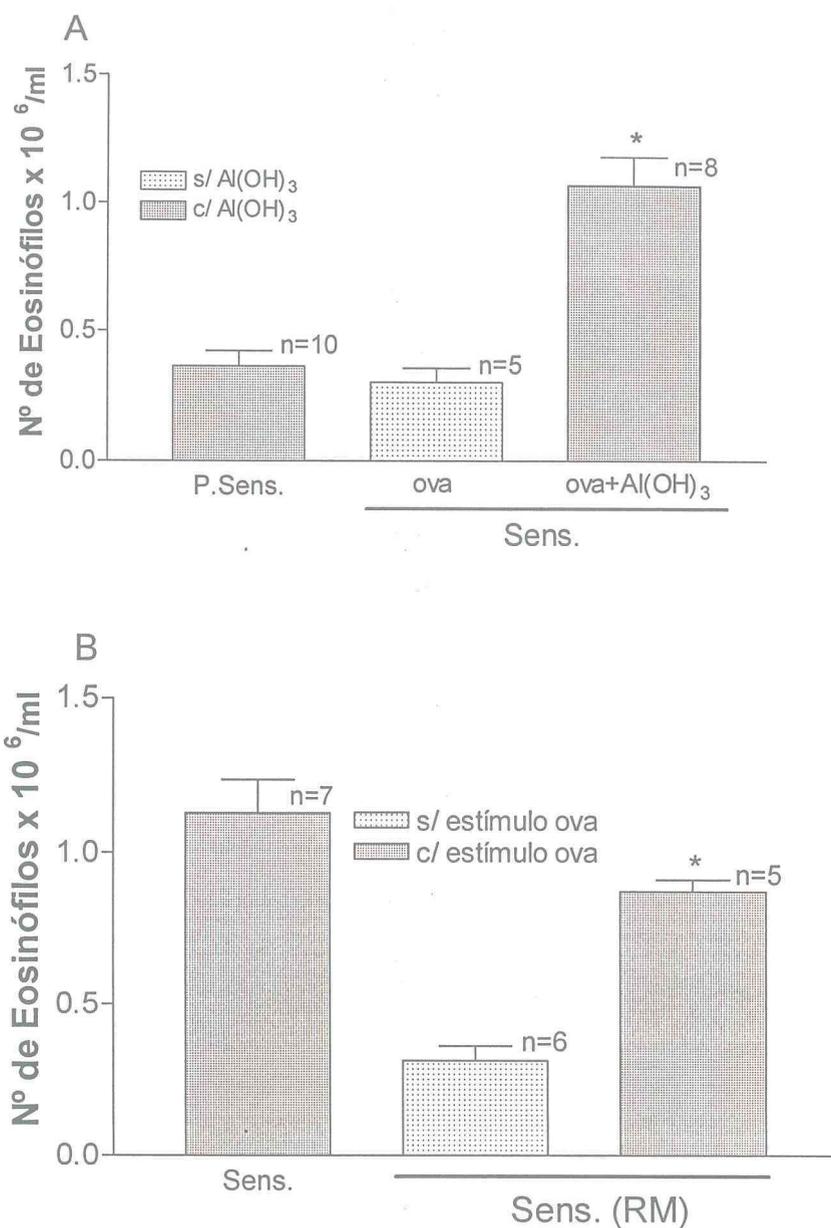


Figura 23 - Efeito do sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas ou não com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados com ovalbumina sozinha (ova s/ Al(OH)₃] ou com ova+hidróxido de alumínio (ova c/ Al(OH)₃] sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos normais ou sensibilizados. (A) A Figura demonstra que não houve migração de eosinófilos (ME) induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados somente com ova sem Al(OH)₃ (adjuvante) quando comparados aos que receberam Sob de ratos sensibilizados com ova+adjuvante, na cavidade peritoneal de ratos normais. O grupo controle geral foi pseudo-sensibilizado com Al(OH)₃. **(B)** A Figura mostra que a sensibilização dos ratos que foram utilizados no modelo de migração (RM) da cavidade peritoneal não altera a resposta migratória quando comparada a migração em ratos normais que também receberam SobCLPI de ratos sensibilizados (Sens.). A ME foi avaliada 4h após a injeção i.p. dos estímulos. Resultados expressos como média ± EPM *p<0,05 comparado aos grupos controles. ANOVA–Teste de Bonferroni.

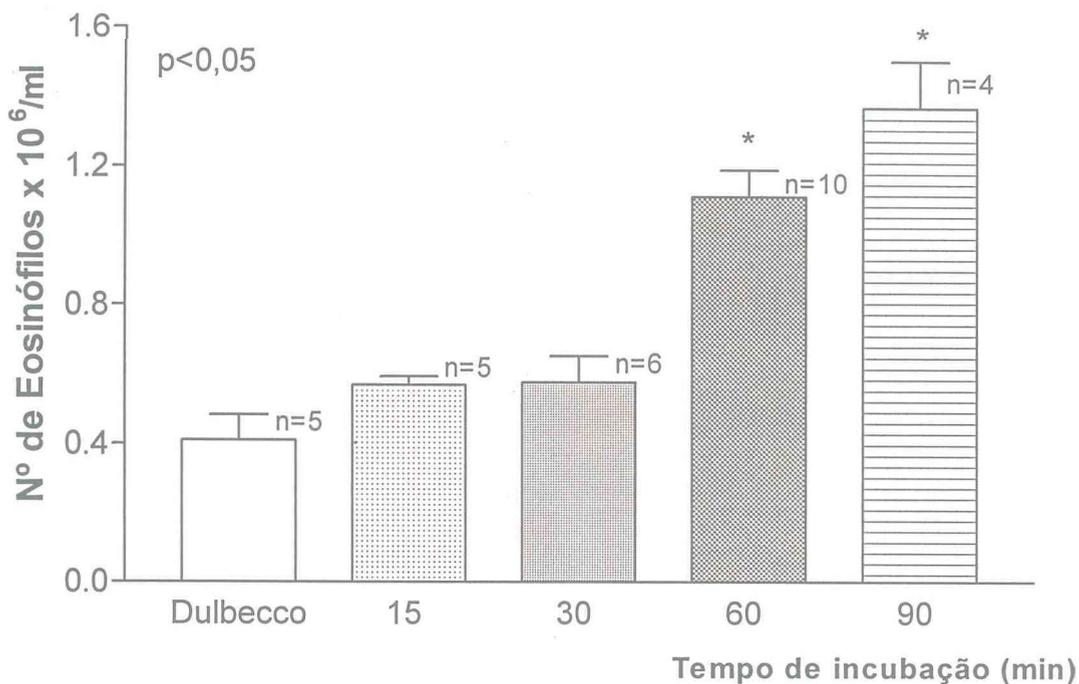


Figura 24 - Curva tempo de incubação com ovalbumina na cultura de células da lâmina própria intestinal cujos sobrenadantes foram avaliados sobre a migração eosinofílica na cavidade peritoneal de ratos normais. A Figura mostra que houve aumento significativo na migração de eosinófilos (ME) induzida por sobrenadante (Sob) de células da lâmina própria intestinal (CLPI) estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados a partir do tempo de estimulação de 60 min comparados aos que receberam Sob de CLPI estimuladas com ova por 15 ou 30 min. A ME foi avaliada 4h após a injeção i.p. do estímulo. Resultados expressos como média \pm EPM do número de animais indicado acima. * $p < 0,05$ comparado a Dulbecco e aos grupos que receberam Sob de CLPI estimuladas com ova por 15 ou 30 min. ANOVA–Teste de Bonferroni.

4.2.4. Avaliação da participação de células peritoneais residentes no recrutamento de eosinófilos induzido pelo sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados.

Com o objetivo de investigar o papel de células peritoneais residentes no efeito estimulador de eosinófilos induzido pelo sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal foram utilizadas várias metodologias com o propósito de alterar a população destas células.

4.2.4.1. Avaliação de macrófagos residentes na infiltração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados.

A **Figura 25** mostra que o pré-tratamento com tioglicolato a 3% dos ratos que receberam o estímulo imuno-inflamatório potencializou levemente, mas não significativamente, a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de células de ratos sensibilizados estimulados com ovalbumina, quando comparada ao grupo que não foi previamente tratado com tioglicolato. Estes dados sugerem que os macrófagos da cavidade peritoneal parece não terem influência na resposta migratória. Posteriormente, avaliamos a participação de macrófagos isolados da lâmina própria intestinal sobre a migração de eosinófilos. Por outro lado, a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados foi dependente de macrófagos residentes, desde que o aumento da população de macrófagos da cavidade peritoneal por tioglicolato, potencializou significativamente essa resposta migratória (**Figura 25**).

4.2.4.2. Papel de mastócitos na migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados.

A migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados, não foi alterada nos animais depletados de mastócitos com o composto 48/80 quando comparados aos controles não tratados com esse composto. Contudo o pré-tratamento com composto 48/80 aumentou potencialmente a resposta migratória induzida por SobCLPI de ratos pseudo-sensibilizados (**Figura 26**). Estes

dados sugerem que mastócitos residentes são responsáveis pela baixa resposta migratória induzida por Sob de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados no tempo de estímulo de 4 horas, ou seja, modulam negativamente essa resposta.

Quando se utilizou esse protocolo de depleção de mastócitos nos ratos sensibilizados utilizados na cultura, não houve alteração na resposta migratória (**Figura 26**). Estes resultados sugerem que mastócitos da cavidade peritoneal parece que não participam dessa resposta migratória.

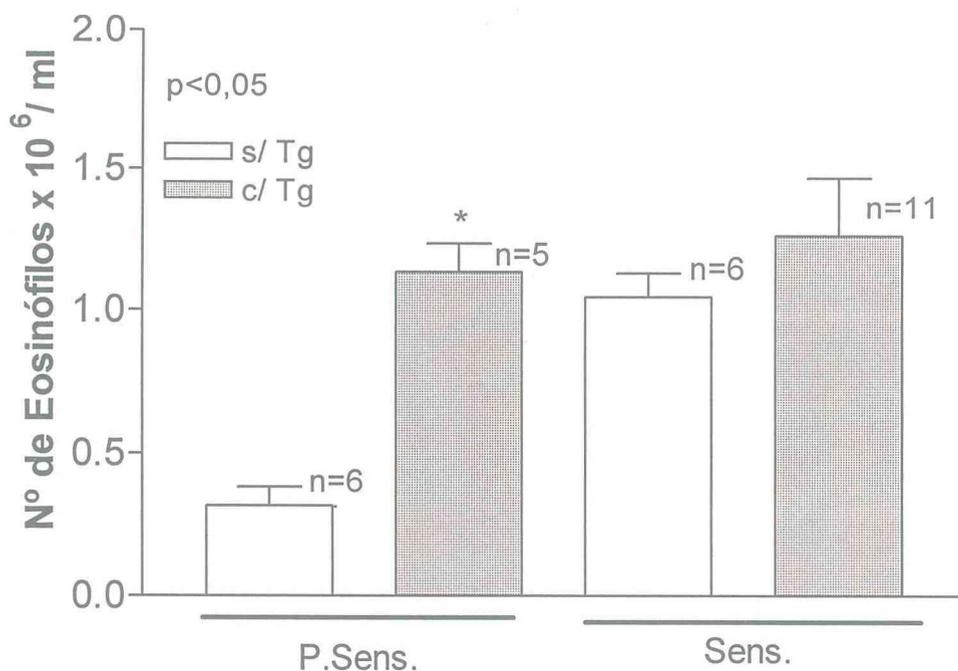


Figura 25 - Avaliação do aumento da população de macrófagos peritoneais sobre a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova), de ratos pseudo-sensibilizados ou sensibilizados. A Figura mostra que o pré-tratamento de ratos com tioglicolato 3% (c/ Tg; 3% v/v, 10ml i.p.) utilizados no modelo da cavidade peritoneal não altera a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal (SobCLPI) estimuladas com ova de ratos sensibilizados (Sens.), contudo potencializa a resposta migratória induzida por SobCLPI de ratos pseudo-sensibilizados (P.Sens.). A ME foi avaliada 4h após a injeção i.p. dos estímulos na cavidade peritoneal de ratos normais. Resultados expressos como média \pm EPM * $p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado com Tg (s/ Tg). ANOVA – Teste de Bonferroni.

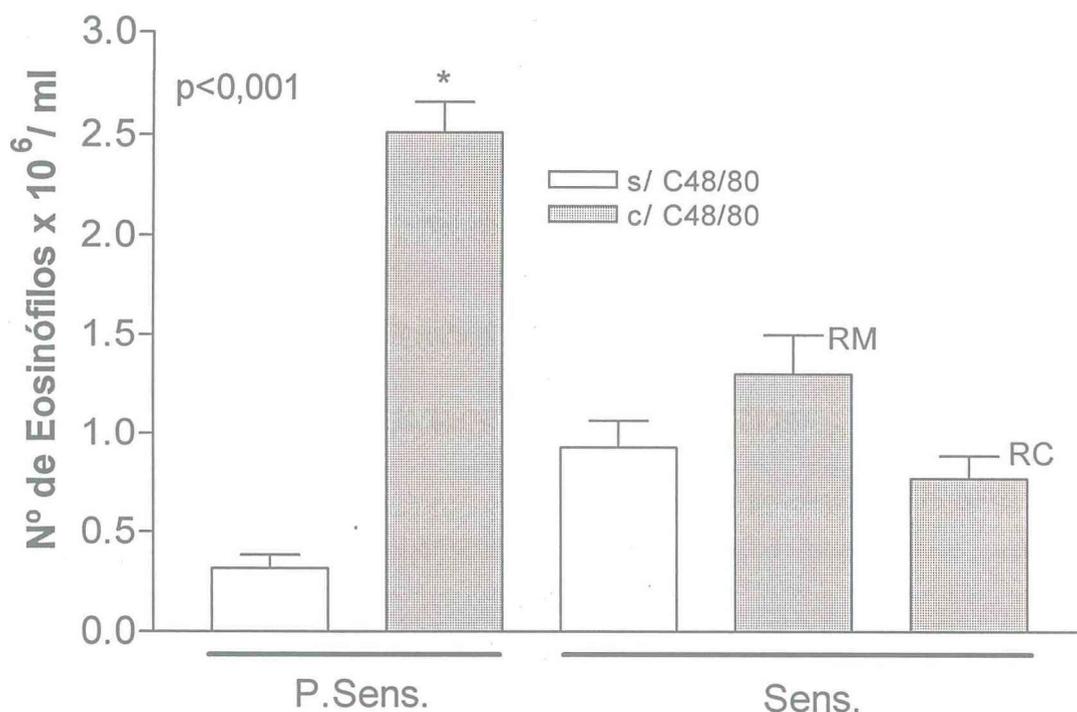


Figura 26 - Avaliação da depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 sobre a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal (CLPI) estimuladas com ovalbumina (ova), de ratos pseudo-sensibilizados ou sensibilizados. A Figura mostra que o pré-tratamento subcrônico de ratos normais utilizados no modelo da cavidade peritoneal (RM) com composto 48/80 (c/ C48/80) não altera a migração eosinofílica induzida por sobrenadante (Sob) de cultura de CLPI estimuladas com ova de ratos sensibilizados, contudo aumenta potencialmente a resposta migratória induzida por SobCLPI de ratos pseudo-sensibilizados (P.Sens.). Mostra ainda que o pré-tratamento com composto 48/80 dos ratos sensibilizados utilizados na cultura (RC) de CLPI por 4 dias antes do isolamento das células não altera a resposta migratória. A ME foi avaliada 4h após a injeção i.p. dos estímulos na cavidade peritoneal de ratos normais. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 06 animais. * $p < 0,001$ comparado ao grupo não tratado com composto 48/80 (s/ C48/80). ANOVA – Teste de Bonferroni.

4.2.5. Efeito do tratamento *in vivo* com moduladores farmacológicos sobre a atividade de sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados no modelo de migração eosinofílica em cavidade peritoneal.

A avaliação do número de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal, que migraram em resposta aos estímulos em ratos normais, foi feita 4h após as injeções e comparada ao número obtido de animais injetados apenas com sobrenadante de células da lâmina própria intestinal sem pré-tratamento com inibidores (1ml; i.p.).

4.2.5.1. Avaliação de drogas anti-inflamatórias na migração eosinofílica induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados.

A **Figura 27A** mostra o efeito de um glicocorticóide, dexametasona; de um inibidor de fosfolipase A2, quinacrina; e de um antagonista do PAF, WEB 2086. Enquanto a **Figura 27B** mostra o efeito do inibidor dual de ciclooxigenase e lipoxigenase, NDGA, de inibidores preferenciais da enzima ciclooxigenase-1 e 2, indometacina e meloxicam respectivamente; de um inibidor de síntese de leucotrieno, montelucaste sódico sobre a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados, para a cavidade peritoneal. O pré-tratamento dos animais com dexametasona (0,5mg/kg; $0,429 \pm 0,07$), quinacrina (20mg/kg; $0,395 \pm 0,05$), indometacina (2mg/kg; $0,30 \pm 0,05$), WEB 2086 (20mg/kg; $0,213 \pm 0,01$) ou montelucaste sódico (10mg/kg; $0,374 \pm 0,02$) inibiram ($p < 0,05$) a resposta migratória comparado ao grupo pré-tratado com PBS ($1,062 \pm 0,15$). Por outro lado, o inibidor mais seletivo de ciclooxigenase-2, meloxicam (10mg/kg), e o inibidor dual de ciclo- e lipoxigenase, NDGA (50mg/kg), não inibiram a migração de eosinófilos, comparando-se aos animais que receberam apenas o estímulo imuno-inflamatório e foram pré-tratados com PBS. Este resultado sugere o envolvimento de derivados de ciclooxigenase-1, lipoxigenase e de PAF na atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de CLPI e afasta a possibilidade do envolvimento de derivados de ciclooxigenase-2.

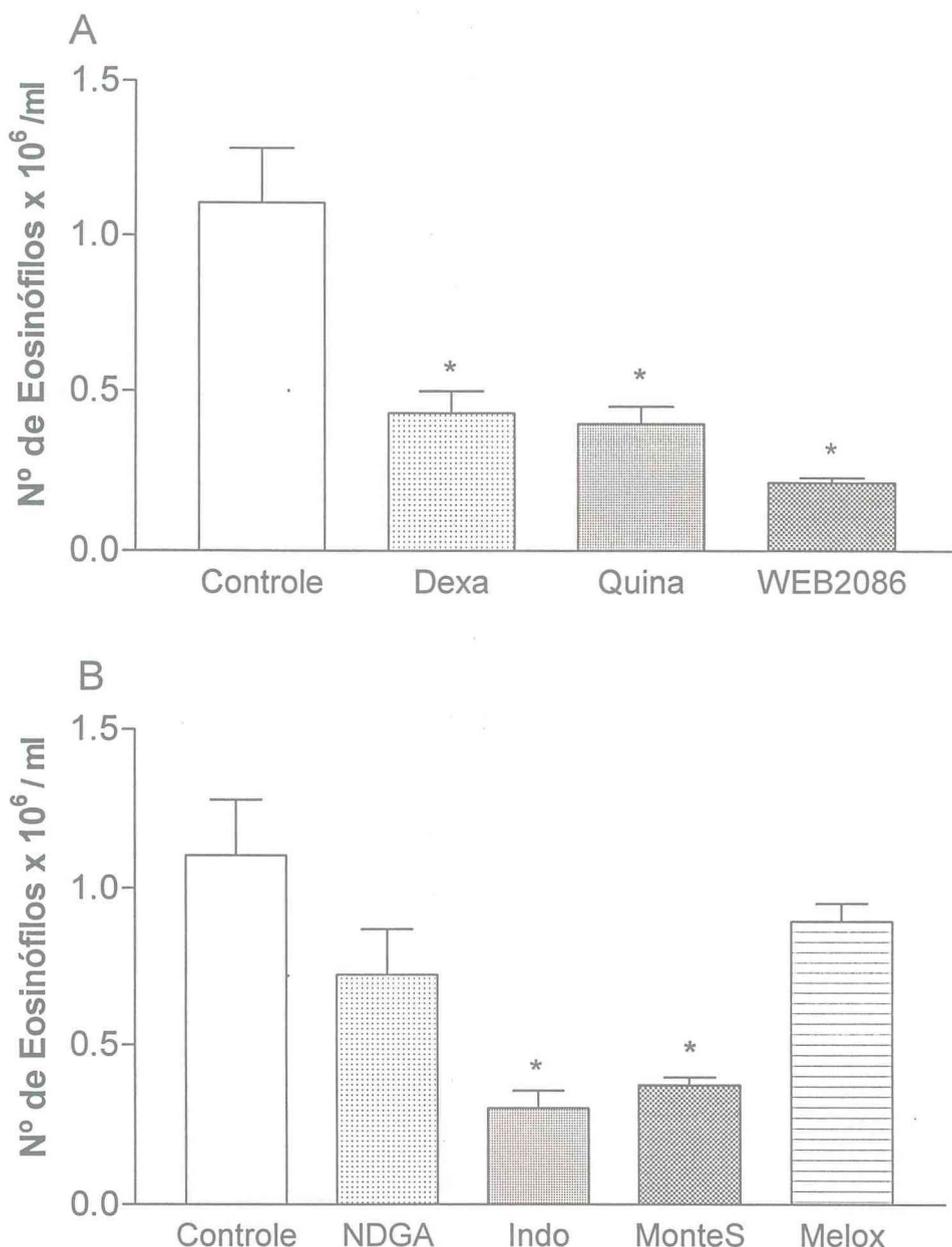


Figura 27 – Atividade moduladora de drogas anti-inflamatórias na migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados. Painel A) Mostra que o pré-tratamento com dexametasona (Dexa; 0.5 mg/kg; s.c.), quinacrina (Quina; 20mg/kg; s.c.), WEB-2086 (20mg/kg; s.c.) 30 min antes da administração i.p. do sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados (SobCLPI), estimuladas com ova, inibiu a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal de ratos. **Painel B)** mostra que indometacina (Indo; 2 mg/kg; s.c.) e montelucaste sódico (MonteS; 10mg/kg; vo) administrados 30 min antes do SobCLPI, estimuladas com ova, inibiram a migração de eosinófilos, enquanto NDGA (50mg/kg; s.c.) e meloxicam (Melox; 10mg/kg; v.o.) não inibiram esse efeito. A migração de eosinófilos foi avaliada 4h após o estímulo. Os animais do grupo Controle foram pré-tratados com 0,5 ml de PBS estéril, 30 min antes do estímulo. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 06 animais. *p<0,05 comparado ao Controle (PBS). ANOVA – Teste de Bonferroni.

4.2.5.2. Avaliação do efeito de anti-histamínicos, anti-serotoninérgicos e estabilizadores de mastócitos sobre a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados.

A **Figura 28A** mostra o efeito do pré-tratamento com anti-histamínicos e anti-5-HT sobre a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal de ratos normais, induzida pelo sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados. Observa-se que os anti-histamínicos de receptor H1, difenidramina (10mg/kg; $0,59 \pm 0,07$) e loratadina (10mg/kg; $0,617 \pm 0,06$) e o anti-5-HT, metergolina (5mg/kg; $0,411 \pm 0,04$), bem como, o inibidor dual de histamina e serotonina, ciproheptadina (2 mg/kg; $0,354 \pm 0,10$), inibiram ($p < 0,05$) a resposta imuno-inflamatória, em relação ao grupo pré-tratado com PBS ($1,062 \pm 0,15$).

A **Figura 28B** mostra o efeito dos estabilizadores de mastócitos sobre a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados. O tratamento dos animais com o estabilizador de mastócitos, cetotifeno (10mg/kg; $0,375 \pm 0,06$), inibiu acentuadamente a resposta migratória, no entanto, um outro estabilizador bastante utilizado, cromoglicato de sódio (ou cromolina; 20mg/kg) não alterou a migração de eosinófilos, comparando-se aos animais que receberam apenas o estímulo imuno-inflamatório, pré-tratado com PBS ($1,062 \pm 0,15$).

Este resultado sugere que cetotifeno parece atuar por um outro mecanismo de ação independente de mastócitos nesta resposta.

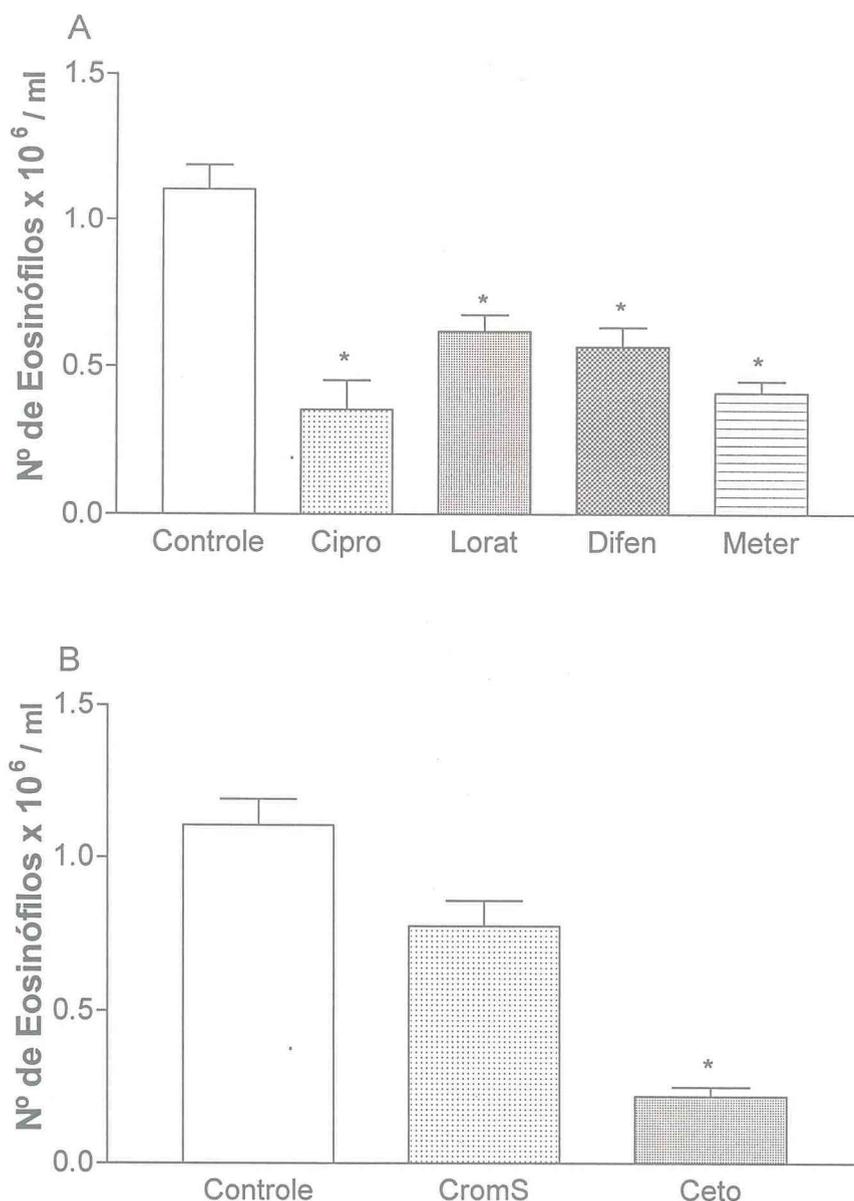


Figura 28 – Atividade moduladora de drogas anti-alérgicas e anti-histamínicas na migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados. Painel A) Mostra que o pré-tratamento com ciproheptadina (Cipro; 2 mg/kg; s.c.) loratadina (Lorat; 10mg/kg; v.o.), difenidramina (Difen; 10mg/kg; s.c.) e metergoline (Meter; 5mg/kg; s.c.) 30 min antes da administração i.p. do sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados (SobCLPI), estimuladas com ova, inibiu a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal de ratos. **Painel B)** Mostra que cetotifeno (Ceto; 10mg/kg; i.p.), 30 min antes da administração i.p. do SobCLPI de ratos sensibilizados, estimuladas com ova, também inibiu essa resposta migratória, em contraste, cromoglicato de sódio (CromS; 20mg/kg; s.c.) não inibiu esse efeito. A migração de eosinófilos foi avaliada 4h após o estímulo. Os animais do grupo Controle foram pré-tratados com 0,5 ml de PBS estéril, 30 min antes do estímulo. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de 06 animais. * $p < 0,05$ comparado ao Controle (PBS). ANOVA – Teste de Bonferroni.

4.2.5.3. Efeitos de drogas anti-TNF α e anti-IL-1 β sobre a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados

Avaliando-se as drogas que inibem a síntese e/ou a ação de TNF, pentoxifilina e talidomida, quando administradas na cavidade peritoneal 30min antes do sobrenadante de CLPI. Enquanto talidomida (90mg/kg; $0,64 \pm 0,03$) inibiu ($p < 0,05$) parcialmente a migração eosinofílica, pentoxifilina (90mg/kg) não alterou essa resposta comparando-se aos grupos que foram pré-tratados com PBS. Em adição, o antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra; 5 μ g/kg) também não inibiu essa resposta migratória, utilizando-se o mesmo protocolo anterior (**Figura 29**).

4.2.5.4. Anticorpo anti-TNF- α *in vivo* inibe parcialmente a atividade quimiotática para eosinófilos induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados

O anticorpo anti-TNF- α (50 μ g/kg) incubado por 30min com o sobrenadante de células da lâmina própria antes da administração na cavidade peritoneal, reduziu ($p < 0,05$) parcialmente o número de eosinófilos que migraram em resposta a estimulação. No entanto, a incubação com o anticorpo anti-IL1 β (100 μ g/kg) não alterou a migração eosinofílica (**Figura 30**). Assim, a atividade quimiotática induzida pelo sobrenadante de CLPI parece ser, em parte, devido à atividade de TNF, desde que talidomida e anticorpo anti-TNF- α inibem parcialmente essa resposta.

A participação de TNF na migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de CLPI foi confirmada posteriormente através do teste ELISA.

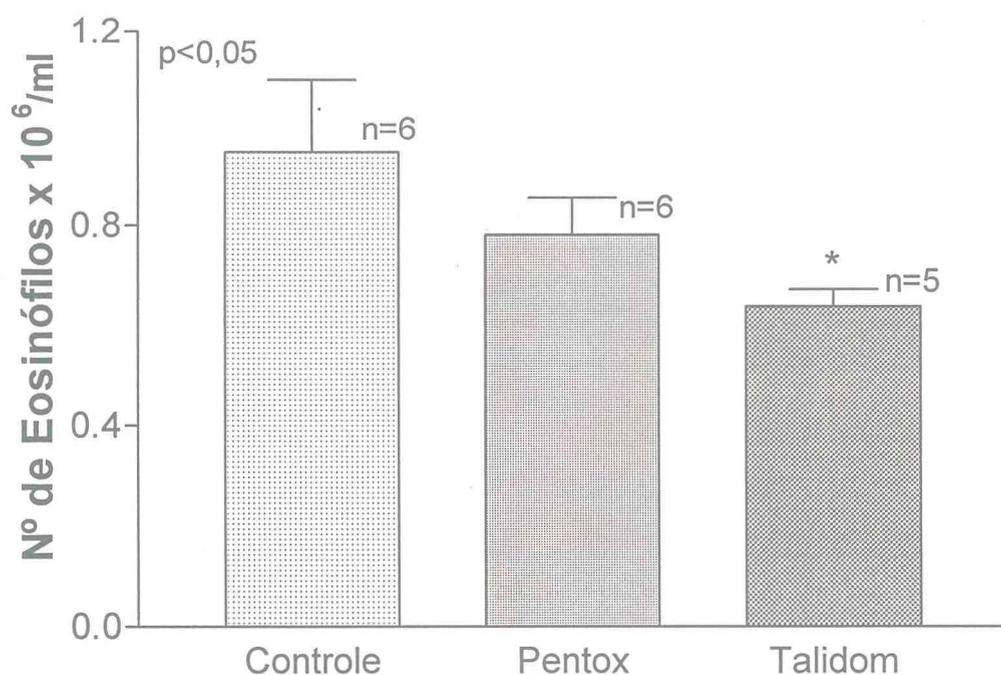


Figura 29 - Talidomida, mas não pentoxifilina, inibe a migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova), de ratos sensibilizados. Os animais foram pré-tratados com pentoxifilina (Pentox; 90mg/kg; sc), talidomida (Talidom; 90mg/kg; sc), 30 min antes da administração i.p. de sobrenadante de de células da lâmina própria intestinal estimuladas com ova de ratos sensibilizados (SobCLPI). A migração de eosinófilos foi avaliada 4h após o estímulo. Os animais do grupo Controle foram pré-tratados com 0,5 ml de PBS estéril, 30 min antes do SobCLPI. Os resultados foram expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado ao Controle (PBS). ANOVA – Teste de Bonferroni.

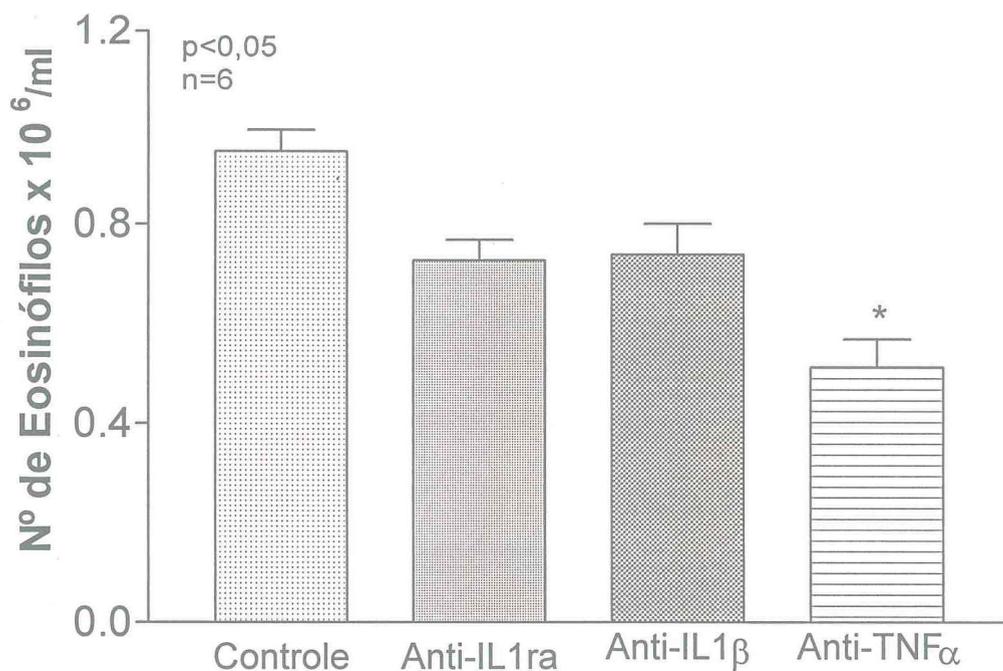


Figura 30 - Anticorpo anti-TNF- α *in vivo*, mas não anti-IL-1 β ra ou anti-IL1 β , inibe a atividade quimiotática para eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina (ova) de ratos sensibilizados. Os animais foram pré-tratados 30 min antes da injeção ip de sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados (SobCLPI) com antagonista de receptor de IL-1 β ra (anti-IL-1ra; 5 μ g/kg; sc). Os anticorpos anti-TNF α (50 μ g/kg) e anti-IL1 β (100 μ g/kg) foram incubados com o Sob de CLPI estimuladas com ova por 30 min antes da sua administração na cavidade peritoneal. A migração de eosinófilos foi avaliada 4h após o estímulo. Os animais do grupo Controle foram pré-tratados com 0,5 ml de PBS estéril, 30 min antes do SobCLPI. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de 6 animais. * $p < 0,05$ comparado ao Controle (PBS). ANOVA – Teste de Bonferroni.

4.3. Avaliação farmacológica da atividade dos sobrenadantes de células isoladas da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados na migração de eosinófilos

4.3.1. Resposta migratória utilizando-se sobrenadante de células (macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos) isoladas da lâmina própria intestinal.

Com o objetivo de investigar qual a(s) célula(s) especificamente estaria(m) envolvida(s) ou liberaria(m) fator(es) quimiotático(s) para a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal, isolou-se algumas células (macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos) da lâmina própria intestinal para avaliar de maneira direta, *in vitro*, sua participação nesse processo, através dos protocolos experimentais descritos a seguir.

4.3.1.1. Macrófagos e linfócitos, mas não mastócitos e eosinófilos, da lâmina própria em cultura, estimulados com ovalbumina, liberam uma substância quimiotática para eosinófilos.

A **Figura 31** apresenta a resposta migratória de sobrenadante de culturas de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos da lâmina própria do intestino de ratos sensibilizados. Todas essas células estudadas foram estimuladas com ovalbumina *in vitro*.

Observou-se que macrófagos e linfócitos liberam para o sobrenadante uma substância com atividade quimiotática para eosinófilos, desde que os sobrenadantes dessas culturas potencializaram a resposta migratória para a cavidade peritoneal quando injetado em animais e avaliado 04 horas após sua administração. Esta análise foi feita comparando-se com os animais que receberam sobrenadante do *pool* de células da lâmina própria (CLPI) estimuladas com ovalbumina (**Figura 31**) e com o meio Dulbecco.

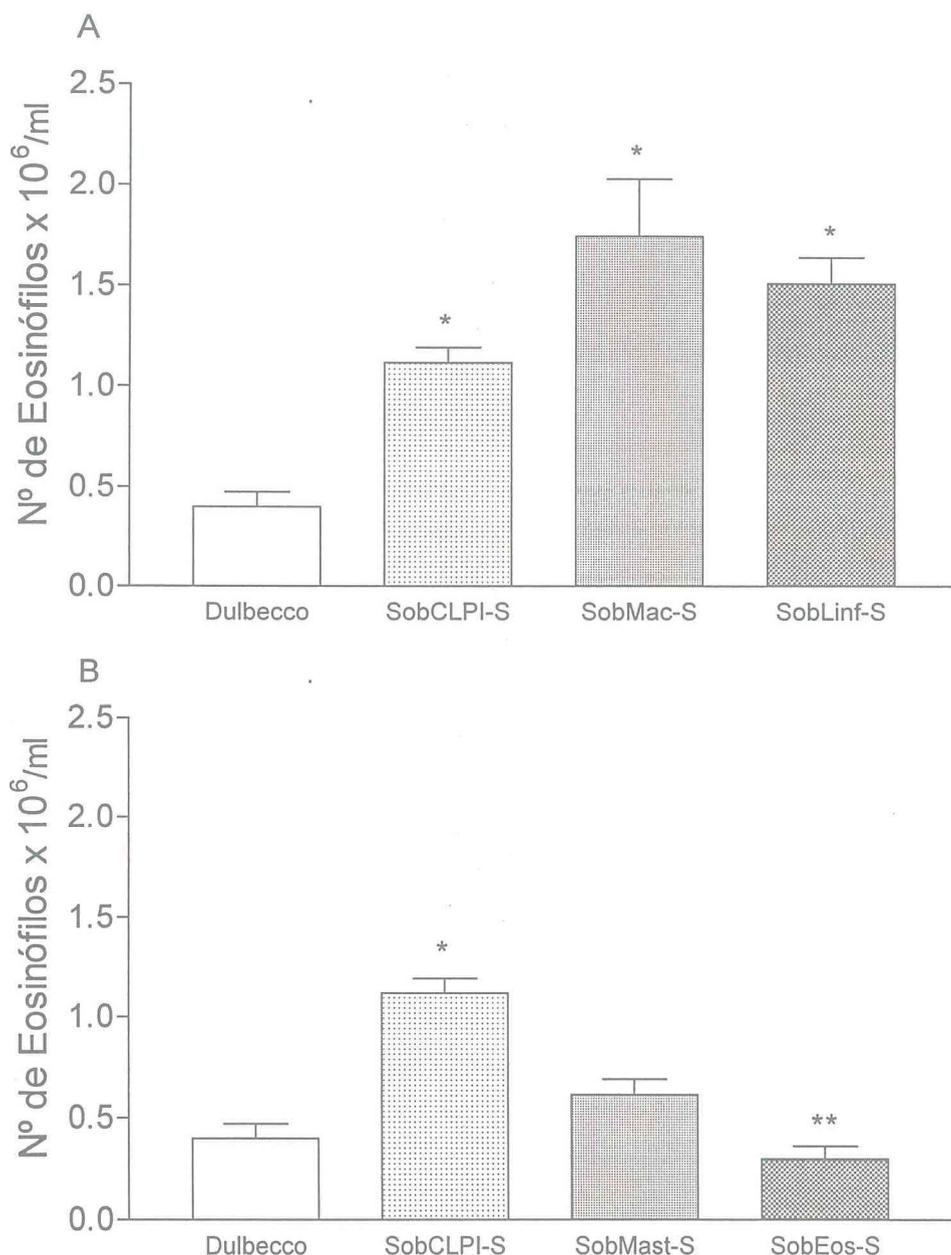


Figura 31 - Efeito dos sobrenadantes de macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal, estimulados com ovalbumina (ova), de ratos sensibilizados sobre a migração de eosinófilos. Painel A) Mostra que macrófagos e linfócitos em cultura quando estimulados com ova (10µg/ml) liberam fatores quimiotáticos para eosinófilos. Os sobrenadantes de macrófagos (SobMφs) ou linfócitos (SobLin) intestinais induziram migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal e essa resposta migratória foi aumentada quando comparada a induzida pelo sobrenadante de células totais da lâmina própria intestinal (SobCLPI). **Painel B)** Mostra que os sobrenadantes de mastócitos (SobMast) ou eosinófilos (SobEos) intestinais estimulados com ova (10µg/ml) não induzem migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal e essa resposta migratória foi reduzida quando comparada a induzida pelo sobrenadante de células totais da lâmina própria intestinal (SobCLPI). Os sobrenadantes foram administrados (1ml; i.p.) em animais normais e a avaliação da migração de eosinófilos avaliada 4h após. O controle geral recebeu 1ml de Dulbecco i.p. Os resultados foram expressos como média ± EPM de 06 animais. *p<0,05 comparado a Dulbecco e **p<0,05 comparado ao SobCLPI. ANOVA – Teste de Bonferroni.

Pelos dados apresentados foi evidenciado que macrófagos e linfócitos liberavam fatores com atividade quimiotática para eosinófilos, como os macrófagos são as células apresentadoras de antígenos e provavelmente responsáveis pelo início do processo como mostram as Figuras 2 e 3 apresentadas no início desse estudo, passou-se a investigar melhor a importância dessas células na resposta migratória e que mediadores liberados por macrófagos estariam envolvidos nesse efeito.

4.3.2. Modulação farmacológica da cultura de macrófagos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina

Os macrófagos da lâmina própria de ratos sensibilizados foram incubados com dexametasona (10^{-5} M), indometacina (10^{-5} M), metisergida (10^{-5} M), ciproheptadina (10^{-5} M), difenidramina (10^{-6} M) e cetotifeno (10^{-5} M), 30 min antes do estímulo com ovalbumina. O sobrenadante obtido destas culturas foi injetado i.p. em animais normais. A avaliação da migração de eosinófilos foi feita 04 horas após e comparada aos animais que receberam apenas o sobrenadante obtido de macrófagos não incubados com bloqueadores na cultura (controle). Observa-se na **Figura 32** que, os sobrenadantes obtidos das culturas incubadas com dexametasona ($0,43 \pm 0,11$), indometacina ($0,46 \pm 0,07$), metisergida ($0,31 \pm 0,02$), ciproheptadina ($0,57 \pm 0,04$) e difenidramina ($0,57 \pm 0,07$) inibiram ($p < 0,05$) a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal de ratos normais, induzida pelo sobrenadante de M ϕ s, comparados ao controle ($1,45 \pm 0,14$), com exceção de cetotifeno, que não inibiu essa resposta tendo inibido anteriormente a resposta migratória induzida por sobrenadante de células totais da lâmina própria. Esta inibição foi maior no grupo que recebeu sobrenadante pré-incubado com metisergida. Estes resultados indicam que o efeito inibidor destes fármacos ocorre, possivelmente, sobre a liberação da substância quimiotática para o sobrenadante, visto que inibiram quando incubados diretamente com as células na cultura.

4.3.3. Efeito do tratamento *in vivo* com moduladores farmacológicos sobre a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos da lâmina própria de ratos sensibilizados

O pré-tratamento dos ratos com montelucaste sódico (10mg/kg, v.o.; $0,57 \pm 0,01$), mas não com WEB 2086 (20mg/kg, s.c.; $0,87 \pm 0,11$), inibiu a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de macrófagos, estimulados com ovalbumina, de ratos sensibilizados quando os resultados foram comparados ao controle ($1,40 \pm 0,20$) que recebeu apenas o sobrenadante de macrófagos (**Tabela 14**).

Tabela 14 – Efeito de drogas anti-inflamatórias sobre a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos intestinais, estimulados com ovalbumina, de ratos sensibilizados.

Tratamento	Nº de Eosinófilos x 10^6 / ml		Efeito Farmacológico
	n ^a	(Média ± EPM ^b)	
Controle (Sob de MØs)	7	$1,40 \pm 0,20$	Sobrenadante de cultura de macrófagos intestinais
WEB 2086 (20mg/kg, s.c.)	5	$0,87 \pm 0,11$	Antagonista do PAF
Montelucaste (10 mg/kg, v.o.)	5	$0,57 \pm 0,01^*$	Antagonista de receptor de cistenil-leucotrienos (cisLT1)

^a n: número de animais por grupo

^b EPM: erro padrão da média

* $P < 0,05$ (ANOVA, teste de Bonferroni), comparado ao grupo Controle

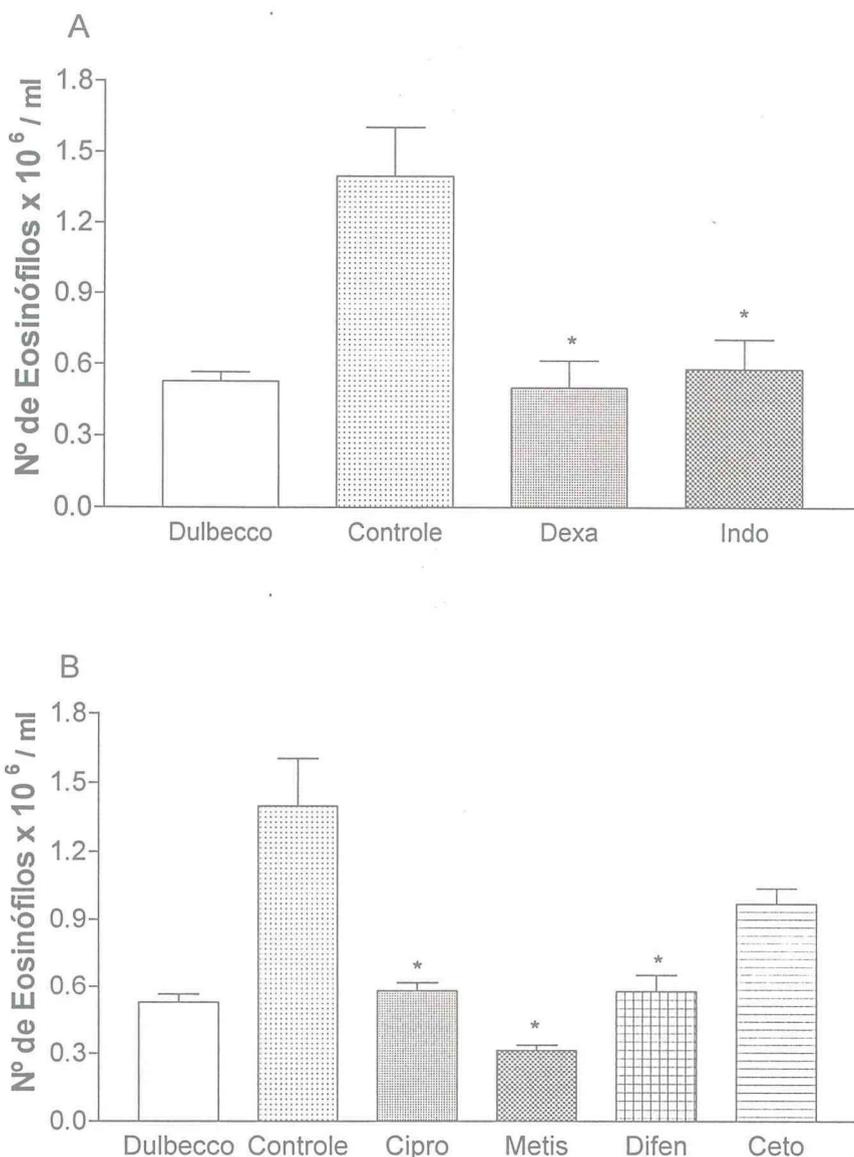


Figura 32 – O sobrenadante de macrófagos de ratos sensibilizados isolados da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina (ova) induziu migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos. Essa resposta migratória foi inibida por dexametasona, indometacina, ciproheptadina, metisergida, difenidramina mas não por cetotifeno. Macrófagos intestinais de ratos sensibilizados foram estimulados com ova (10µg/ml) durante 60 min ou pré-incubados por 30 min com dexametasona (Dexa; 10⁻⁵M), indometacina (Indo; 10⁻⁵M), cetotifeno (Ceto; 10⁻⁵M), ciproheptadina (Cipro; 10⁻⁵M), metisergida (Metis; 10⁻⁵) difenidramina (Difen; 10⁻⁶) ou apenas o meio Dulbecco antes da adição do estímulo ova. **Painel A)** Mostra que Dexa e Indo inibiram a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de macrófagos (SobMφs). **Painel B)** Mostra que a migração eosinofílica induzida por SobMφs foi inibida por Cipro, Metis, Difen, mas não por Cetotifeno. Os sobrenadantes foram administrados i.p. em animais normais e a avaliação da migração de eosinófilos foi realizada 4h.após. Os animais controles receberam apenas o SobMφs estimulados com ova sem pré-incubação com inibidores. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 06 animais. *p<0,05 comparado a Controle. ANOVA – Teste de Bonferroni.

Através dos dados da **Figura 31** observou-se que mastócitos e eosinófilos não liberavam fatores quimiotáticos para eosinófilos e provavelmente modulavam negativamente essa resposta, de forma que o sobrenadante da cultura de macrófagos ou linfócitos isolados tiveram uma resposta migratória potencializada em relação a induzida por sobrenadante de células totais intestinal. A partir desses dados, levantou-se a hipótese de que eles modulavam negativamente a resposta migratória, então resolveu-se investigar melhor esse possível efeito inibitório sobre a migração de eosinófilos, como descrito a seguir, os sobrenadantes foram testados através de combinações *in vivo* (item 4.3.4) e *in vitro* (4.3.5.)

4.3.4. O pré-tratamento dos animais com os sobrenadantes de mastócitos ou eosinófilos da lâmina própria de ratos sensibilizados, mas não de linfócitos, estimulados com ovalbumina inibiu a atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos.

Os sobrenadantes obtidos das culturas de mastócitos ou eosinófilos, estimulados com ovalbumina, de ratos sensibilizados, administrado i.p. em ratos normais, 30 min antes da injeção do sobrenadante de macrófagos, reduziu a atividade estimuladora da migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de macrófagos, o mesmo não ocorreu com sobrenadante de linfócitos (**Figura 33**). Estes dados foram comparados ao grupo que recebeu o sobrenadante de macrófagos estimulados com ovalbumina sem prévio tratamento com sobrenadante de linfócitos, mastócitos e eosinófilos ou ao que recebeu o Sob de CLPI e avaliados 04 horas após a administração i.p. do estímulo inflamatório. Este resultado leva a suposição de que linfócitos também liberam mediador(es), com efeito, quimiotático para migração de eosinófilos no modelo da cavidade peritoneal, que poderiam ser responsáveis, em parte, pela resposta migratória do Sob das CLPI, ou seja, parece que macrófagos e linfócitos são responsáveis pela resposta migratória, tendo os macrófagos maior participação.

4.3.5. Efeito da incubação da cultura de macrófagos estimulados por ovalbumina com o sobrenadante de linfócitos, mastócitos ou eosinófilos de culturas também estimuladas com ovalbumina

Quando os macrófagos estimulados com ovalbumina, foram pré-incubados (30 min antes do estímulo) com o sobrenadante de linfócitos, mastócitos ou eosinófilos de

culturas também estimuladas com ovalbumina (**Figura 34**) e injetados na cavidade peritoneal de ratos normais, observou-se que o resultado foi semelhante ao encontrado no item anterior, ou seja, o sobrenadante de linfócitos não alterou a resposta migratória, enquanto, sobrenadante de mastócitos e eosinófilos inibiram a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de macrófagos.

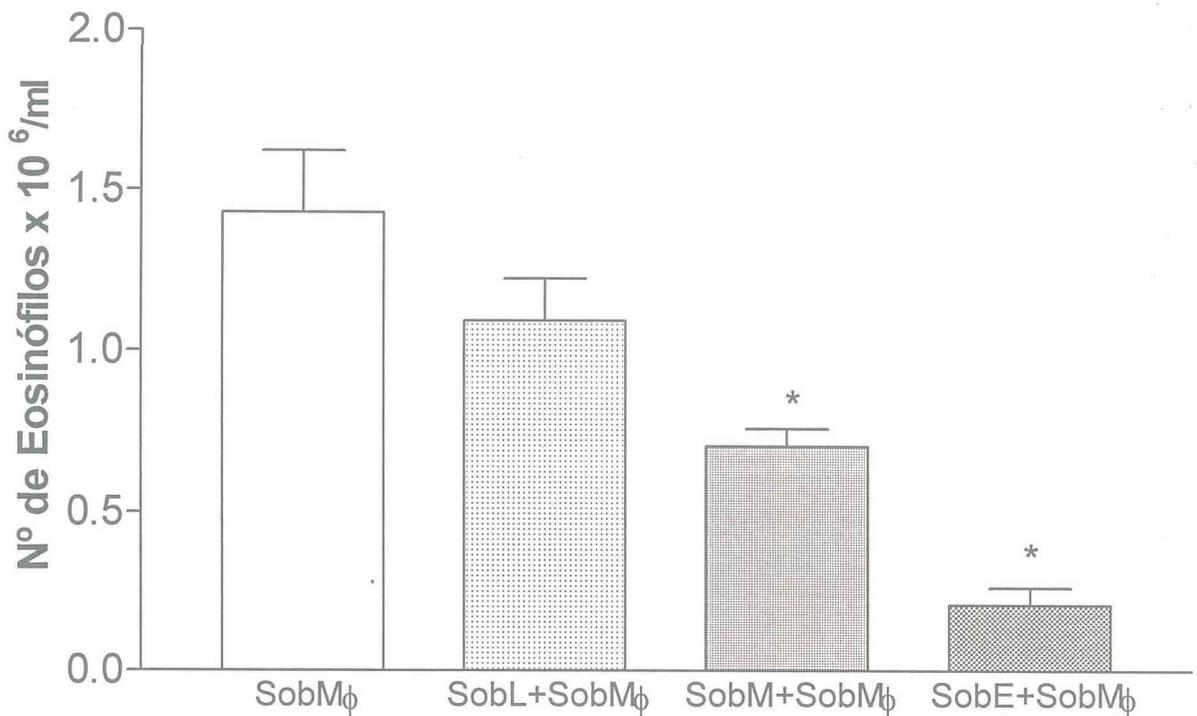


Figura 33 - O sobrenadante de mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina (ova), mas não de linfócitos, inibem a atividade quimiotática para eosinófilos induzida por sobrenadante de macrófagos estimulados com ova[#]. O sobrenadante (Sob) liberado de linfócitos (L), mastócitos (M) e eosinófilos (E) intestinais, estimulados com ovalbumina foram injetados i.p. *in vivo* em ratos normais, 30min antes da administração i.p. do Sob de macrófagos (SobM ϕ) também estimulados. O sobrenadante de mastócitos e eosinófilos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina (ova), mas não de linfócitos, inibem a atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com ova. Os resultados foram expressos como média média \pm E.P.M. de 06 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SobM ϕ). ANOVA – Teste de Bonferroni. [#] Protocolo de combinação de Sobs nos animais da migração

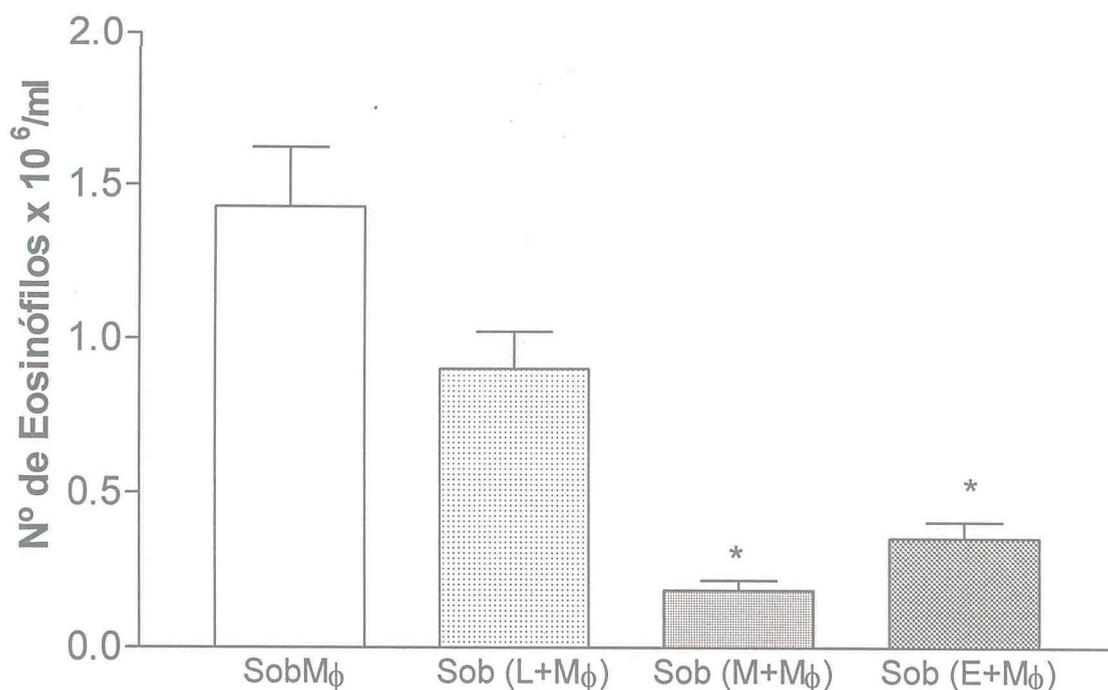


Figura 34 - O sobrenadante de mastócitos ou eosinófilos intestinais estimulados com ovalbumina (ova), mas não de linfócitos, reduz a atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com ova[#]. O sobrenadante (Sob) liberado de linfócitos (L), mastócitos (M) ou eosinófilos (E) intestinais, estimulados com ovalbumina foram adicionados à cultura de macrófagos, mantidos por 30min, seguido da adição do estímulo ovalbumina e incubado por 60min adicionais. Os sobrenadantes das culturas de macrófagos (SobM ϕ), pré-incubados *in vitro* com Sob de linfócitos (Sob(L+M ϕ) ou de mastócitos (Sob(M+M ϕ) ou de eosinófilos (Sob(E+M ϕ)), foram administrados i.p. em animais normais e a migração de eosinófilos avaliada 4h após. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 06 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SobM ϕ . ANOVA – Teste de Bonferroni. [#] Protocolo de combinação de Sobs na cultura de células

4.4. Análise dos sobrenadantes de macrófagos, mastócitos e eosinófilos de ratos sensibilizados estimulados com ovalbumina, para investigar a presença de TNF- α e IL-1 β por meio de ELISA.

Através da análise dos sobrenadantes observou-se que houve aumento das citocinas IL-1 β e TNF α liberados por macrófagos estimulados com ovalbumina de ratos sensibilizados, comparando-se ao controle (ratos normais). Dexametasona inibiu significativamente ($p < 0.05$) essa resposta para TNF, mas não para IL-1 β (**Figura 35**).

Também foi observado que IL-1 β liberada por eosinófilos de ratos sensibilizados (RS) foi significativamente reduzida em relação a liberada por macrófagos de RS e também reduzida em relação a liberada por eosinófilos de ratos normais (controle), bem como, a IL-1 β liberada por mastócitos de ratos sensibilizados foi parcialmente reduzida, mas não de forma significativa, em relação a liberada por macrófagos. Em adição, houve redução significativa de IL-1 β e TNF liberadas por mastócitos de ratos sensibilizados em relação a mastócitos de ratos normais (controle). Em relação a linfócitos não houve nenhuma diferença significativa para ambas as citocinas.

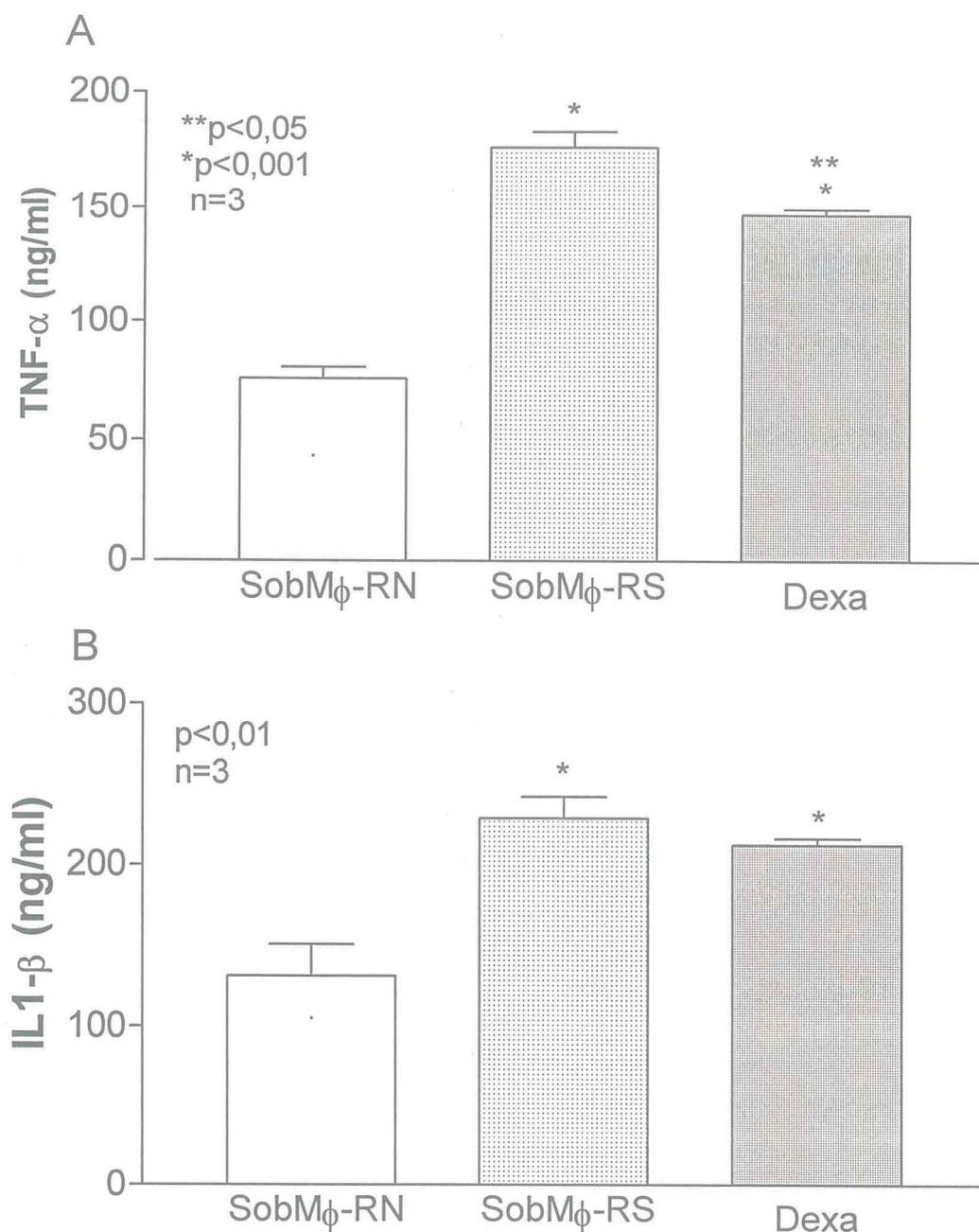


Figura 35. Análise do sobrenadante de macrófagos intestinais de ratos normais (SobM Φ -RN) ou sensibilizados (SobM Φ -RS) estimulados com ovalbumina, para avaliar os níveis de TNF- α e IL-1 β por ELISA, liberados para o sobrenadante. Os dados mostram que macrófagos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina (10 μ g/ml) liberam TNF- α (A) e IL-1 β (B) para o sobrenadante. Também foi testado o SobM Φ s de ratos sensibilizados que foi pré-incubado em cultura, com dexametasona (Dexa; 10⁻⁵M). Dexa inibiu os níveis de TNF- α , mas não de IL-1 β em cultura de M Φ s. Os dados estão apresentados como média \pm EPM e foram analisados por ANOVA (método de Bonferroni). *p<0,001 para os níveis de TNF- α (A) e *p<0,01 para IL-1 β (B) liberados para o sobrenadante de M Φ s de ratos sensibilizados (SobM Φ -RS) comparado ao sobrenadante de M Φ s de ratos normais (SobM Φ -RN; Controle). **p<0,05 comparado ao SobM Φ -RS no painel A. "n" indica o número de amostras medidas em duplicata.

5. DISCUSSÃO

Urge ao homem “ter um coração que veja” o que os olhos e a razão não conseguem enxergar. Para tanto, ele precisa conectar-se com o Eterno que habita no mais profundo de si mesmo.

Santo Agostinho

5. Discussão

5.1. Discussão dos resultados referentes à atividade pró-inflamatória de ovalbumina em ratos sensibilizados no modelo de edema de pata

Nossos resultados demonstraram um potente efeito pró-inflamatório de ovalbumina no modelo de edema de pata de ratos sensibilizados com ovalbumina.

Também demonstram claramente que o edema imune não parece ser dependente do metabolismo do ácido araquidônico, desde que tanto o inibidor de cicloxigenase, indometacina, como o inibidor de 5'-lipoxigenase, MK-886, e antagonista de PAF, WEB 2086 ou a combinação de indometacina + MK-886 + cetotifeno não exerceram nenhuma inibição significativa neste edema, quando testados em doses comumente usadas. Por outro lado, dexametasona apresentou uma potente inibição no edema.

O efeito inibitório de dexametasona no edema de pata induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados provavelmente não está relacionado com a formação de eicosanoides, desde que as drogas que bloqueiam as vias de cicloxigenase e lipoxigenase foram ineficazes. Vários efeitos de glicocorticoides podem ser explicados pela sua capacidade de bloquear a liberação de mediadores quimiotáticos, como os metabólitos do ácido araquidônico e/ou citocinas com propriedades inflamatórias (DINARELLO, 1991, DA MOTTA *et al.*, 1994). Esse efeito inibitório de dexametasona sobre o edema alérgico pode resultar, pelo menos em parte, na inibição da liberação de citocinas inflamatórias. Por outro lado, vários estudos indicam que há um aumento de expressão das moléculas de adesão na inflamação alérgica, as quais desempenham um papel crítico na patogênese da inflamação alérgica (JAHNOVÁ *et al.*, 1998). Yamaki *et al.* (1998) sugeriram que o "rolling" dos leucócitos foi sensível ao tratamento com glicocorticoide, possivelmente através da inibição de expressão ou função de ligantes de leucócitos, P-selectinas.

Embora difenidramina tenha uma ação anti-H1 bem estabelecida, seu efeito anti-edematogênico em ratos sensibilizados não deve ser necessariamente associado com esta propriedade, desde que meclizina (anti-H1 clássico) não inibiu o edema, assim, histamina parece não está envolvida nessa resposta edematogênica. O fato de meclizina não ter bloqueado o edema não foi surpreendente, desde que histamina não é um mediador importante na permeabilidade vascular em ratos (WILHELM, 1962). Tromp *et al.* (1998) investigaram o papel de mastócitos e histamina em interações leucócito-endotélio em quatro linhagens de rato: Brown Norway, Lewis,

Sprague-Dawley e Wistar. Em ratos Sprague-Dawley a administração tópica de histamina (10^{-4} M) resultou em um aumento significativo no nível de “rolling” de leucócitos e numa diminuição na velocidade do “rolling” comparada com o tempo controle. Histamina induziu adesão de leucócitos somente na linhagem Brown Norway.

Estudos têm dividido os anti-histamínicos em duas classes: os compostos que liberam histamina e serotonina de mastócitos isolados de cavidade peritoneal de rato e aqueles que inibem a liberação desses mediadores por composto 48/80 (MALING *et al.*, 1974). Também têm sido investigado outros possíveis efeitos dos anti-histamínicos. Difenidramina, por exemplo, parece ser efetiva em inibir a recaptação de serotonina (YEH, 1999). Maling *et al.* (1974) mostraram que difenidramina inibe o edema induzido pela serotonina em ratos. Assim nós especulamos um possível efeito desta droga na inibição da recaptação ou na depleção de serotonina.

Serotonina (5-HT) é uma amina que ocorre naturalmente com efeitos principais em uma variedade de funções importantes do corpo (LEE; WU, 2000). Estudos importantes relativos a serotonina foram focalizados em respostas vasculares e inflamatórias. Owen (1977) demonstrou que a administração de serotonina na superfície plantar da pata de rato causou edema com um notável extravasamento de albumina. Serotonina também foi importante em induzir extravasamento de plasma como resultado da formação de edema em outros modelos (PIERCE *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1996). Em adição, ciproheptadina, é uma droga que apresenta alta afinidade para receptores do tipo 2 (5-HT₂) (HONRUBIA *et al.*, 1997). Honrubia *et al.* (1997) mostraram que a atividade de derivados de ciproheptadina nos receptores 5-HT₂ está relacionada a suas características moleculares, que torna favorável uma disposição comum para interagir com todos os três subtipos de receptores 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}).

Desde que metisergida, antagonista primariamente 5-HT tipo 2 (5-HT₂) (LISTON *et al.*, 1999) e ciproheptadina, anti-H₁/5-HT₂ (WOLF; SCHUNACK, 1996; HONRUBIA *et al.*, 1997) inibiram eficazmente o edema podemos sugerir que serotonina pode ser um mediador importante na formação do edema induzido por ovalbumina em ratos sensibilizados, sendo o sítio de ligação o receptor 5-HT₂.

Por outro lado, os estabilizadores de mastócitos como cromolina (cromoglicato de sódio) e cetotifeno, apresentaram leve ou nenhum efeito sobre o edema. O pré-tratamento com cromoglicato de sódio influenciou ligeiramente a atividade de mastócitos. Os resultados mostraram que cromoglicato de sódio na mais baixa dose

(5 mg/kg) ligeiramente e temporariamente (2h) aumentou o edema, enquanto a mais alta dose (20mg/kg) reduziu o edema somente em ratos mais jovens (cerca de 130g). A ação de cromoglicato de sódio na inflamação permanece incerta. Esta droga inibe a degranulação de mastócitos e pode ter efeito direto sobre as células inflamatórias. Shida (1996) sugere que cromoglicato de sódio provavelmente, não especificamente, se liga a superfície de células importantes incluindo mastócitos e eosinófilos. Em adição, alguns estudos sugerem que esse fármaco diminui a ativação celular (BUSINCO; CANTANI, 1990; JAHNOVÁ *et al.*, 1998). No presente estudo, o efeito estimulatório em dose mais baixa sugere que mastócito pode ter um efeito inibitório nesse edema, enquanto o efeito inibitório em doses mais elevadas apenas em ratos jovens pode ser devido a um efeito direto em células imuno-inflamatórias imaturas, ou devido a um outro mecanismo desconhecido.

O composto 48/80 é conhecido como um indutor potente de degranulação de mastócitos do tecido conjuntivo e, portanto, da liberação de histamina e outros mediadores químicos que são responsáveis por sintomas de anafilaxia (GUO *et al.*, 1997). Neste trabalho, o edema induzido por ovalbumina foi potencializado através de tratamento subcrônico com composto 48/80, assim, reforça o efeito inibitório de mastócitos sobre o edema.

A análise histológica da pata traseira quatro horas após o estímulo da pata, mostrou uma intensa infiltração de neutrófilos e eosinófilos na hipoderme das patas injetadas com ovalbumina em ratos sensibilizados. Considerando que o estímulo com ovalbumina, leva a migração de neutrófilos e eosinófilos para os tecidos extravasculares, foi avaliada a contribuição da migração de leucócitos no desenvolvimento do edema alérgico.

Já foi evidenciado que o $TNF\alpha$ induz a migração de neutrófilos na inflamação imune (CANETTI *et al.*, 2001). Assim, nós investigamos a possibilidade do $TNF\alpha$ ser responsável pela atividade quimiotática para neutrófilos nesse estudo. Para tanto, foram utilizados os agentes anti-TNF: pentoxifilina, talidomida e clorpromazina, essa última droga apresenta múltiplas ações.

Pentoxifilina é uma droga derivada de metilxantina que tem sido usada há mais de vinte anos no tratamento da doença vascular periférica. Pentoxifilina é um potente inibidor da secreção de $TNF\alpha$, *in vitro* e *in vivo*, e tem demonstrado ser eficaz no tratamento de determinadas doenças humanas e animais (POLLICE *et al.*, 2001). Além disso, talidomida exerce sua ação inibitória sobre $TNF\alpha$ por aumentar a

degradação de RNAm (MOREIRA *et al.*, 1993). No presente estudo, os agentes anti-TNF, talidomida e pentoxifilina, foram ineficazes em inibir o edema induzido por ovalbumina.

Adicionalmente, neste estudo várias doses de clorpromazina (inibidor da síntese de TNF e implicado em diversas outras funções) foram usadas, visando explorar melhor, neste modelo específico, os novos dados da literatura sobre os efeitos antiinflamatórios desse fármaco. Foi observada uma potente inibição por esta droga em todas as doses testadas. Nas doses mais elevada (9 e 18 mg/kg), a clorpromazina produziu uma redução altamente significativa no efeito edematogênico.

A clorpromazina, um derivado da fenotiazina, possui propriedades antiinflamatórias, inibindo a síntese de TNF α e a reabsorção óssea (DE LIMA *et al.*, 2000). Em adição, os efeitos anti-serotoninérgicos de clorpromazina sobre os receptores 5HT2 já é bem caracterizado (NISIJIMA *et al.*, 2001). Trichard *et al.* (1998) sugerem um nível elevado de bloqueio 5-HT2A com doses elevadas de clorpromazina. Entretanto, as propriedades anti-histamínicas de clorpromazina são menos conhecidas.

Os dados acima sugerem que o fator responsável pela indução de migração celular é diferente de TNF, desde que talidomida e pentoxifilina não inibiram o edema imune. Uma inibição significativa foi observada por clorpromazina, em todas as doses usadas (1, 3, 9 e 18 mg/kg), contudo essa droga, além da ação anti-TNF, apresenta várias outras ações importantes, dentre elas os efeitos anti-serotoninérgicos sobre os receptores 5HT2.

Em resumo, o presente trabalho mostra que o fato de indometacina, MK-886, NDGA e WEB 2086 não inibirem esse edema alérgico, indica que a ação de dexametasona parece não ser *via* fosfolipase A2, mas possivelmente devido à síntese e/ou atividade inibitória de citocinas pró-inflamatórias ou via inibição de expressão ou de função de moléculas de adesão. Nossos resultados sugerem que o edema anafilático nesse modelo de pata de rato seja independente da ação de histamina. A inibição do edema através de difenidramina, mas não através de meclizina (anti-H1 clássico), pode sugerir um mecanismo diferente para essa droga independente do efeito anti-histamínico. Assim nós especulamos que serotonina parece ser largamente responsável pelo edema imunológico em rato, através dos receptores 5-HT2, bem como, um possível envolvimento de outros mediadores, provavelmente citocinas.

5.2. Discussão dos resultados referentes aos efeitos dos sobrenadantes de células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina sobre a migração de eosinófilos

O sistema imune da mucosa intestinal ocupa importante posição em relação a decisões que diz respeito à resposta do hospedeiro a antígenos entéricos que são apresentados. Este processo de tomada de decisão de escolher a função efetora apropriada envolve um intercâmbio complexo entre diversos tipos de células presentes na mucosa intestinal, como macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos. Dentre essas células, os macrófagos e mastócitos são tipos imunocompetentes capazes de sintetizar e secretar uma ampla variedade de mediadores, tais como: metabólitos do ácido araquidônico, oxidantes e citocinas, que podem afetar o epitélio direta ou indiretamente (McKAY; PERDUE, 1993; PERDUE; McKAY, 1994; ROCHA *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 2000).

Atualmente, tem se tornado cada vez mais evidente que a habilidade de determinadas células da lâmina própria intestinal em produzir mediadores pró-inflamatórios é extremamente importante na infiltração celular (migração celular), lesão tecidual, ulceração, secreção e motilidade intestinal. Não obstante, a compreensão da complexa interação dessas células com seus mediadores, ainda, precisa ser melhor investigada.

Nesse estudo, inicialmente realizamos o isolamento das células totais da lâmina própria intestinal (CLPI) de ratos sensibilizados ou não, conforme protocolo descrito nos Materiais e Métodos. Após obtenção dessas células fez-se um estudo inicial para avaliar se o sobrenadante obtido de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina apresentava algum efeito sobre a migração de leucócitos (neutrófilos, mononucleares, eosinófilos e mastócitos) em cavidade peritoneal de ratos. Dessa forma, observou-se que havia um fator no sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados que apresentava efeito quimiotático para eosinófilos quando injetado na cavidade peritoneal de ratos normais (não sensibilizados) e que no tempo de 4 h pós-estímulo havia diferença significativa em relação aos pseudo-sensibilizados (controle). Contudo quando se aumentou o tempo de estímulo observou-se que o sobrenadante de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados também induzia migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal de ratos. Em ambos os casos o pico máximo de migração foi atingido no tempo de 24 h após os estímulos. Esses dados sugerem que a sensibilização *per si* dos ratos antecipa a resposta

migratória de eosinófilos. Por isso o tempo de 4 h para o estímulo na cavidade peritoneal foi utilizado em todos os experimentos de nosso estudo.

Com base nessas informações, foi planejado um rastreamento farmacológico, através da utilização de vários bloqueadores farmacológicos e alguns anticorpos monoclonais específicos, na tentativa de investigar que mediadores estariam envolvidos nessa resposta ou mais especificamente qual(is) mediador(es) seria(m) responsáveis pela atividade quimiotática para eosinófilos, presente no sobrenadante (Sob) das células totais da lâmina própria intestinal (CLPI) estimuladas com ovalbumina, de ratos sensibilizados.

Utilizamos inicialmente os antiinflamatórios clássicos. Observou-se que dexametasona inibiu a migração eosinofílica induzida por sobrenadante de CLPI estimuladas com ovalbumina, de ratos sensibilizados. Esse efeito inibitório de dexametasona pode ser explicado pelo bloqueio de metabólitos do ácido araquidônico, em especial leucotrieno B4 e PAF, e pelo bloqueio na liberação de fatores quimiotáticos, sobretudo citocinas liberadas pelo estímulo inflamatório (ROCHA *et al.*, 1997)

Glicocorticoides são importantes reguladores da função imune. Já são bem conhecidas suas funções antiinflamatórias e na inibição da resposta auto-imune, como também, sua habilidade em induzir apoptose em tímócitos imaturos. Porém, muitos de seus efeitos na imunidade foram derivados de estudos *in vitro* em células imunes, bem como, de efeitos *in vitro* e *in vivo* de glicocorticoides sintéticos, ambas as situações podem não representar os efeitos complexos manifestadas por esteróides endógenos adrenal *in vivo*. Como resultado, as ações de glicocorticoides na função imune têm sido baseada nas suas ações imunossupressoras. Uma visão mais precisa de glicocorticoides endógenos é que eles são moduladores sutis e complexos da função imune, não somente devido as suas respostas na inflamação e autoimunidade, mas também, estimulando e inibindo as respostas imunes do hospedeiro e influenciando na suscetibilidade das doenças e na sua progressão (BRUCE *et al*, 1997).

Dando prosseguimento a modulação farmacológica, observou-se que quinacrina, um inibidor de fosfolipase A2, indometacina, um inibidor preferencial da enzima cicloxigenase-1 (COX-1), montelucaste sódico, antagonista de receptor cis-leucotrieno-1, WEB 2086, antagonista do PAF, bloquearam potentemente a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de cultura de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados. Em contraste, NDGA, um inibidor duplo da ciclo e

lipoxigenase, com ação preferencialmente sobre a lipoxigenase, e meloxicam, um inibidor mais seletivo de cicloxigenase-2 (EBERHART; DUBOIS, 1995), não inibiram a migração eosinofílica. Estes resultados sugerem que prostaglandinas, fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrienos, desempenham importante papel na fisiopatologia da alergia intestinal induzida pelo sobrenadante de células do sistema imune intestinal.

O bloqueio acima descrito indica que os metabólitos do ácido araquidônico estão envolvidos no processo. Este fato foi confirmado pela redução da migração eosinofílica pela ação da dexametasona, a qual inibe a formação de derivados eicosanóides através da formação de lipocortina e, conseguinte, bloqueio da fosfolipase A2 (BERSCHNEIDER *et al.*, 1992).

Vale salientar o caráter imunoinibitório de muitas das ações das prostaglandinas como a supressão funcional de células T auxiliares e células B e a inibição da produção de IL-1 (ABRAMSON; WEISSMANN, 1989). Estas células e este mediador (IL-1) apresentam importante papel na inflamação. Nesse contexto, vale reforçar que a indometacina, promoveu um potente bloqueio na migração eosinofílica, mostrando, assim, que o referido sobrenadante atua por um mecanismo, dependente, pelo menos em parte, da síntese de prostaglandinas. Assim, baseando-se nesses resultados sugere-se que a indometacina e, provavelmente, seus análogos podem ser úteis no tratamento das doenças inflamatórias alérgicas.

Em adição, a prostaglandina D2 (PGD2) é o principal prostanóide envolvido na reação alérgica e seu papel nessa resposta inflamatória ainda está sendo investigado. GERVAIS *et al.* (2001) sugerem que PGD2 controla as funções de eosinófilos através de dois receptores (DP e CRTH2) farmacologicamente distintos com funções independentes, e ambos são detectáveis em eosinófilos circulantes. Os autores demonstraram que o bloqueio dos efeitos mediados por PGD2 pode reduzir a lesão causada por eosinófilos durante uma resposta alérgica, no entanto, parece ser requerida a inibição de ambos os receptores para que haja esse bloqueio. Mais recentemente, Monneret *et al.* (2003) demonstraram que PGD2 é o único prostanóide que ativa eosinófilos humanos nas reações alérgicas, através de dois receptores: o tipo DP2 e o receptor/quimiotático expresso sobre células T helper (Th2) - CRTH2. Ainda vale ressaltar que a PGD2 apresenta efeitos pró- e anti-inflamatórios via adenilciclase acoplada a receptores do tipo DP1.

Os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) são fármacos que compreendem um grupo heterogêneo de compostos que compartilham determinados efeitos

terapêuticos, agindo como analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. Propôs-se também que as AINEs inibam diretamente a ativação e função dos neutrófilos através da inibição de processos associados à membrana celular, independentemente do bloqueio da síntese de prostaglandinas (ABRAMSON; WEISSMANN, 1989).

Em estudos do trato gastrointestinal humano pouca ou nenhuma proteína ou atividade COX-2 tem sido demonstrada, enquanto abundante proteína e atividade COX-1 tem sido observada (SAKAMOTO, 1998). Estudos demonstraram a presença de COX1 no TGI, do esôfago ao cólon, e uma expressão de COX2 muito menor (SEIBERT, 1994), sendo a COX1 responsável pela maior quantidade de prostaglandinas gastrointestinais (SAKAMOTO, 1998).

Na resposta imuno-inflamatória há uma complexa integração envolvendo endotélio vascular, moléculas de adesão celular (selectinas), de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e de adesão de célula vascular 1 (VCAM-1) bem como integrinas leucocitárias, plaquetas e macrófagos, além de moléculas inflamatórias solúveis e mediadores neuroendócrinos. Nesse amplo contexto, algumas AINEs podem inibir a expressão de parte dessas moléculas de adesão celular (DIAZ-GONZALEZ; SANCHEZ-MADRID, 1998).

O recrutamento de células inflamatórias aos sítios de injúria envolve a participação de mediadores solúveis, de ação quimiotática, quais sejam, PAF, leucotrienos e citocinas que serão descritas mais adiante. Nesse estudo, houve um potente bloqueio da migração eosinofílica por montelucaste sódico, antagonista específico de receptor cisLT1.

Várias substâncias que inibem a formação ou a ação dos leucotrienos têm sido identificadas, caracterizadas e testadas em várias pesquisas clínicas. Estas drogas agem de duas maneiras: inibindo a síntese de leucotrienos através da redução da atividade da proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP) ou do bloqueio da própria 5-lipoxigenase (5-LO), ou antagonizando a ação dos cisteinil-leucotrienos (cisLTs) em seus receptores cisLT1 (DRAZEN, 1997). O sufixo "lucaste" tem sido usado para designar os antagonistas de receptores cisLT1. Montelucaste e zafirlucaste são potentes antagonistas de receptores cisLT1, com afinidade duas vezes maior para os receptores quando comparados aos seus ligantes naturais LTC₄, LTD₄ e LTE₄. Por razões ainda não esclarecidas, os antagonistas dos receptores cisLT1 têm se mostrado mais potente que os inibidores da própria 5-LO ou da atividade da FLAP. Embora atuem em locais distintos na cascata de formação e ação dos leucotrienos,

acredita-se que eles não propiciem benefício terapêutico aditivo, se usados simultaneamente.

Estudo recente revelou que o montelucaste reduz a concentração de leucotrienos no trato respiratório de crianças com asma persistente, ao mesmo tempo em que promove redução da concentração de proteína catiônica eosinofílica (ECP) e melhora clínica. Isto não ocorreu quando as mesmas crianças foram tratadas com cromoglicato sódico (VOLOVITZ *et al.*, 1999). A diminuição da concentração de leucotrienos nas vias respiratórias provavelmente deve-se à redução do influxo de eosinófilos provocada por esse composto. A ação antiinflamatória do montelucaste foi demonstrada recentemente, através da redução do óxido nítrico exalado por crianças asmáticas (BISGARD *et al.*, 1999). Em adição, IHAKU *et al.* (1999) demonstraram que montelucaste diminui: a resposta pulmonar a antígenos, eosinofilia tecidual e o número de células que expressam RNAm de IL-5, sugerindo que leucotrienos pode também regular a resposta alérgica modulando a inflamação através da síntese de citocinas.

Os eosinófilos constituem uma das principais fontes celulares de cisteinil-leucotrienos na inflamação alérgica. Os mecanismos envolvidos no recrutamento de eosinófilos por cisteinil-leucotrienos permanecem não definidos. Fregonese *et al.* (2002), demonstraram que LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (0,1-10 nM) induziram quimiotaxia de eosinófilos de forma dose-dependente, sendo que montelucaste (0,01 nM a 10 nM), anti-cisLT₁, significativamente inibiu a expressão de molécula de adesão (Mac-1) e a migração de eosinófilos induzidas por LTC₄, LTD₄ e LTE₄. Em contraste, o fármaco montelucaste não afetou a expressão de Mac-1 ou migração celular quando eosinófilos foram estimulados “por ativadores não específicos”, tais como fMLP ou C5a.

Existem evidências mostrando que antagonistas de receptor cisLT₁ possuem propriedades anti-inflamatorias *in vivo* em vias aéreas de asmáticos. Embora o mecanismo exato de ação ainda seja desconhecido, cisLTs deve regular a resposta celular envolvida na inflamação alérgica. TSUCHIYA; SAKAMOTO (2002) demonstraram que LTD₄ aumenta a adesão de eosinófilos em placas de cultura de tecidos, aumentando a expressão de moléculas de CD11b e de CD18 sobre a superfície de eosinófilos. E que o aumento de adesão induzido por LTD₄ foi bloqueado por pranlucaste, um antagonista de receptor cisLT₁, e por um anticorpo

anti- β 2 integrina. Os resultados sugerem que LTD4 diretamente aumenta a propriedade adesiva de eosinófilos via receptor cisLT1 e β 2 integrina.

Nesse estudo também foi avaliada a participação de aminas vasoativas (histamina e serotonina) na migração eosinofílica induzida por sobrenadante de CLPI. Para tanto, os ratos utilizados no modelo de migração foram pré-tratados com antagonista dual de receptores de histamina/serotonina (anti-H1/5-HT2; ciproheptadina), antagonistas de receptor de histamina (anti-H1; loratadina e difenidramina) e antagonista de receptor de serotonina (anti-5-HT2; metergolina) (FEITOSA *et al.*, 2002). Os dados deste protocolo experimental mostraram que a ciproheptadina e metergolina reduziram potencialmente a migração, enquanto loratadina e difenidramina reduziram parcialmente essa resposta. Assim, sugere-se o envolvimento das aminas vasoativas, histamina e serotonina, na migração eosinofílica induzida por sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados. Apesar de ambas participarem do processo, a serotonina parece ser mais importante do que a histamina na migração eosinofílica induzida por CLPI de ratos sensibilizados, tendo em vista que o bloqueio foi maior quando foram utilizadas as drogas anti-5HT2.

A histamina é um importante mediador nas funções circulatórias e gastrointestinal, na neurotransmissão e outras funções do cérebro. Existem quatro diferentes receptores para mediar seus vários efeitos biológicos (H1, H2, H3 e H4). Os receptores H1 e H2 são expressos sobre muitas células do sistema imune incluindo células dendríticas, células T e B, monócitos e eosinófilos. O receptor H4 é expresso sobre mastócitos, basófilos e eosinófilos (KINET, 2002).

Vale salientar que difenidramina inibiu a migração na dose de 10mg/kg, contudo não alterou a resposta quando usada na dose de 50mg/kg. Por isso, sugere-se que difenidramina em doses mais baixas (10mg/kg) tem ação anti-histamínica enquanto em doses maiores (50mg/kg) parece ter efeito sobre a inibição de recaptação de serotonina (YEH, 1999).

Por outro lado, o pré-tratamento com cetotifeno, estabilizador de mastócitos, causou uma potente inibição na resposta migratória. Em contraste, cromoglicato de sódio, também estabilizador de mastócitos, não inibiu esse efeito. Assim, sugere-se que cetotifeno deve ter bloqueado a resposta por outro mecanismo de ação independente de mastócitos. Hamasaki *et al.* (1996) investigaram o efeito de três drogas que inibem a liberação de mediadores químicos, incluindo os leucotrienos, em que os mecanismos envolvidos não estão claros. Os autores concluíram que

cetotifeno e oxatamida inibiram a produção de leucotrienos C4 e B4 por inibição da atividade de fosfolipase A2, enquanto azelastine inibe a produção de leucotrieno C4 por inibição da fosfolipase A2 e de leucotrieno C4 sintase.

Em outro estudo observou-se que cetotifeno reduz de forma significativa a lesão, secreção de fluidos, permeabilidade intestinal e níveis de PAF, LTC4 e LTB4 provocados pela toxina A do *Clostridium difficile* no íleo de ratos (POTHOULAKIS *et al.*, 1993).

O papel de células residentes na atividade estimuladora de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de células totais da lâmina própria foi avaliado através das seguintes observações: evidenciou-se que o aumento da população de macrófagos dos animais normais que receberam o estímulo na cavidade peritoneal pelo tratamento com tioglicolato, não alterou a atividade indutora da migração de eosinófilos por Sob de cultura de CLPI de ratos sensibilizados, em comparação aos animais não tratados com tioglicolato. Contudo, vale salientar que a migração eosinofílica induzida por Sob de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados foi potencializada pelo pré-tratamento com tioglicolato.

Dando procedimento a investigação sobre o envolvimento de células residentes no efeito quimiotático para eosinófilos, foi utilizado o protocolo de depleção de mastócitos através do pré-tratamento intraperitoneal subcrônico dos animais com o composto 48/80. Observou-se que a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal de animais depletados de mastócitos não foi alterada nos ratos que receberam Sob de CLPI de animais sensibilizados. Em adição, também se utilizou o mesmo protocolo de depleção de mastócitos para os animais sensibilizados utilizados na cultura de CLPI e observou-se que não houve alteração da resposta migratória. Esses dados sugerem que a migração eosinofílica induzida pelo Sob de CLPI de ratos sensibilizados parece ocorrer de forma direta, ou seja, independente de macrófagos e mastócitos residentes. Outra hipótese seria que a sensibilização *per se* já induziria um aumento dessas células residentes na cavidade peritoneal dos ratos sensibilizados.

Em contraste, a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de células totais da lâmina própria intestinal de ratos pseudo-sensibilizados foi potencialmente aumentada nos animais tratados com composto 48/80 utilizados na migração celular (FEITOSA *et al.*, 2000). Esses dados, juntamente com o anterior (pré-tratamento com tioglicolato dos ratos que receberam Sob de CLPI de ratos pseudo-sensibilizados) demonstram que o mecanismo fisiopatológico da migração induzida pelo Sob de CLPI

de ratos pseudo-sensibilizados com o adjuvante (hidróxido de alumínio) é diferente da induzida pelo Sob de CLPI de ratos sensibilizados, ou seja, parece ocorrer por via indireta dependente de células residentes, sendo que os macrófagos residentes modulam positivamente e os mastócitos residentes modulam negativamente a resposta migratória.

Na etapa seguinte dessa pesquisa, analisou-se o possível envolvimento de TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β) na migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de CLPI estimuladas com ovalbumina. Para tanto, foram delineados determinados protocolos experimentais, utilizando-se inibidores da síntese de TNF- α (talidomida e a pentoxifilina), o antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra), anticorpos monoclonais (anti-IL-1 β e anti- TNF- α (BERSCHNEIDER, 1992; MOREIRA *et al.*, 1993; ROCHA *et al.*, 1997, 1998). Por fim, após caracterizado(s) a presença de alguns mediadores a partir da modulação farmacológica, avaliamos a presença de TNF- α e IL-1 β no sobrenadante de células intestinais totais, através do método de ELISA, e mais adiante será relatado que também investigamos a presença dessas citocinas em células isoladas da lâmina própria intestinal através do método de ELISA, utilizando-se kits específicos para TNF- α e IL-1 β de rato.

Observou-se que, talidomida inibiu parcialmente a migração eosinofílica induzida por Sob de CLPI, enquanto pentoxifilina não afetou essa resposta. No tocante ao mecanismo de ação da talidomida, ela inibe de forma seletiva a síntese de TNF- α por monócitos humanos, *in vitro*, estimulados com LPS, por meio da degradação do RNA mensageiro dessa citocina (MOREIRA *et al.*, 1993). A talidomida, age inibindo a produção de TNF- α , suprime a atividade Th1 e aumenta a liberação de citocinas IL-4 e IL-10 de Th2. A capacidade da talidomida, inibidor da síntese de TNF- α (BERSCHNEIDER, 1992), de bloquear parcialmente a migração eosinofílica nesse estudo, indica o envolvimento desta citocina neste evento, provavelmente suprimindo a atividade Th1 e aumentando a liberação de citocinas IL-4 e IL-10 de Th2, com atividade anti-inflamatória. Este fato também pode ser confirmado pela diminuição da migração pela dexametasona (referida anteriormente), que além de sua ação inibitória sobre a liberação de derivados eicosanóides, também bloqueia a transcrição de RNAm para algumas citocinas, como TNF- α e IL-1 (BETTE *et al.*, 1991; BERSCHNEIDER *et al.*, 1992) inibindo as suas produções.

Além disso, o anticorpo anti-TNF- α também inibiu parcialmente a atividade quimiotática para eosinófilos induzida pelo sobrenadante de CLPI. Por outro lado, o

anticorpo anti-IL-1 β e o antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra), não inibiram essa resposta. Estes dados sugerem, pelo menos em parte, a participação de TNF- α , mas não de IL-1, na migração eosinófila, provavelmente sendo um dos fatores responsáveis pela atividade quimiotática ou fator modulador da migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de CLPI.

A pentoxifilina não inibiu a migração de eosinófilos por agir por um mecanismo diferente de talidomida. Quanto ao mecanismo de ação dessa droga, tem sido descrito que atua diminuindo a quantidade de RNA mensageiro para TNF- α , através da inibição da transcrição genética dessa citocina (MOREIRA *et al.*, 1995; BERGESE *et al.*, 1995), ou seja, a pentoxifilina, inibidor de fosfodiesterase, age por aumentar concentrações de AMP cíclico intracelular, interferindo, assim com a transcrição de TNF.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos celulares, em especial por macrófagos, que compõem a lâmina própria do intestino (MCKAY; PERDUE, 1993; MCKAY; PERDUE, 1994). Os resultados experimentais obtidos com talidomida e anti-TNF- α sugerem que, TNF- α parece ser parcialmente responsável pela atividade quimiotática para eosinófilos, além de leucotrienos e PAF (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Prostaglandinas, histamina e serotonina também possuem função importante na migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de células totais da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados. Vale salientar que esses últimos mediadores juntamente com LTD4 estão associados com reações de hipersensibilidade tipo I (OLSZEWSKI *et al.*, 1999).

Os dados acima mostram que a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de CLPI de ratos sensibilizados é um mecanismo complexo envolvendo múltiplos mediadores inflamatórios, do tipo prostaglandinas, leucotrienos, PAF, serotonina, histamina e TNF- α , tendo em vista que o estímulo envolve mediadores liberados por um "pool" de células da lâmina própria intestinal (FEITOSA *et al.*, 2002). Por isso, sentiu-se a necessidade do isolamento de células para avaliar a participação específica de cada tipo celular nesse modelo de migração estudado.

Na etapa seguinte desse estudo, passou-se a investigar dentre todas essas células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados, qual ou quais células estaria(m) envolvida(s) na migração de eosinófilos em cavidade peritoneal de ratos normais. Para tanto, foram isolados macrófagos, linfócitos, mastócitos e eosinófilos

da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados e estimulados com ovalbumina, sendo os sobrenadantes testados no modelo de cavidade peritoneal de ratos normais. Observou-se que os Sobs de macrófagos ou linfócitos estimulados com ovalbumina induziam migração eosinofílica, sendo a resposta de maior amplitude quando comparada a induzida por Sob de células totais da lâmina própria intestinal.

Como os macrófagos são células apresentadoras de antígenos, levantou-se a hipótese de que eles seriam responsáveis pelo início do processo e passou-se a investigar melhor a importância dessas células na resposta migratória e que mediadores liberados por macrófagos estariam envolvidos na patogênese da alergia intestinal ou, mais especificamente, na migração eosinofílica. Para tanto, alguns protocolos experimentais foram traçados, utilizando-se como estímulo migratório o sobrenadante de macrófagos (SobMΦs) da lâmina própria intestinal isolados de ratos sensibilizados, tais como: a utilização de alguns bloqueadores farmacológicos que já haviam inibido a migração eosinofílica na etapa anterior (quando utilizou-se Sob de CLPI). Além disso, avaliou-se as combinações tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando-se os Sobs de outras células, como linfócitos, mastócitos ou eosinófilos, para se verificar os efeitos inibitórios ou estimulatórios dos mediadores liberados por estas células sobre a migração induzida por Sob de macrófagos intestinais estimulados com ovalbumina.

A membrana celular dos macrófagos contém quantidades substanciais de fosfolipase A2, sendo o ácido araquidônico, o ácido graxo insaturado predominante entre seus fosfolipídios de membrana. A ativação da fosfolipase A2 nos macrófagos, com a conseqüente liberação do ácido araquidônico, faz com que esta célula seja uma fonte importante de metabólitos deste ácido (LESSOF, 1988). Em adição, a evidência indireta que favorece essa hipótese foi à redução observada na migração de eosinófilos, quando os macrófagos foram pré-tratados com dexametasona e indometacina, nesse estudo. Em adição, montelucaste sódico também inibiu a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de macrófagos intestinais. Esses efeitos inibitórios podem ser explicados pelo bloqueio de metabólitos do ácido araquidônico e pelo bloqueio na liberação de fatores quimiotáticos, liberados pelo estímulo imuno-inflamatório. Portanto, a estimulação de macrófagos da lâmina própria intestinal envolve a ativação de fosfolipase A2 com a conseqüente liberação de ácido araquidônico.

Dando prosseguimento a investigação utilizando-se as drogas que haviam inibido a migração de eosinófilos induzida pelo Sob de CLPI, os macrófagos foram

pré-tratados com metisergida, ciproheptadina e difenidramina, e também houve redução na migração eosinofílica. A produção de prostaglandinas, leucotrienos e serotonina constitui uma característica importante das reações alérgicas (LESSOF, 1988). Por outro lado, difenidramina que foi utilizada na concentração de 10^{-6} M citada na literatura (STAHL *et al.*, 1992) pode ter agido por uma via independente de histamina. Eeper-Woodford *et al.* (1993) demonstraram que difenidramina atenua a atividade de TNF derivada de macrófagos alveolares pulmonares. Assim, especulamos nesse estudo um efeito semelhante sobre inibição de TNF para essa droga. Em contraste, cetotifeno (estabilizador de mastócitos) e WEB-2086 (anti-PAF) não inibiram a migração eosinofílica induzida por Sob de macrófagos de ratos sensibilizados.

Baseando-se em informações que apontam o envolvimento de citocinas, possivelmente quimiocinas na hipersensibilidade intestinal, e como já está bem demonstrado na literatura a liberação de citocinas e quimiocinas por macrófagos (ROCHA *et al.*, 1997, 1998, 2000) e desde que se observou um potente efeito inibidor de dexametasona, investigou-se o envolvimento de algumas citocinas primárias desencadeadoras das cascatas. Portanto, na etapa seguinte dessa pesquisa, analisou-se através de ELISA o possível envolvimento de TNF- α e IL-1 β na migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de macrófagos estimulados com ovalbumina.

Para confirmação do envolvimento de citocinas, foram detectados através do ELISA, um aumento dos níveis de TNF- α e de IL-1 β no sobrenadante de macrófagos isolados da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados (FEITOSA *et al.*, 2002). Estes dados comprovam a participação destas citocinas na migração eosinofílica induzida por macrófagos, sendo provavelmente o TNF- α um fator quimiotático para eosinófilos nesse modelo estudado, e a IL-1 β liberada por M Φ s um possível fator amplificador da resposta. A habilidade da IL-1 β em estimular a síntese e liberação de outros mediadores com propriedades quimoatraentes, como leucotrienos e interleucina-8, têm sido apontada como um mecanismo importante na fisiopatologia da lesão associada às doenças inflamatórias intestinais (DINARELLO; WOLFF, 1993; SARTOR, 1994). Nesse estudo sugere-se que IL-1 β deve ter agido na amplificação da resposta por um mecanismo semelhante, ou seja, estimulando a síntese e liberação de outros mediadores quimoatraentes e que os M Φ s intestinais são células importantes nesse processo.

Dentre as células imunocompetentes que compõem a mucosa intestinal, os macrófagos têm se destacado pela sua elevada capacidade de sintetizar e liberar rapidamente IL-1 e TNF que, por sua vez, possuem uma influência marcante na fisiopatologia da lesão e secreção intestinal (MORTEAU *et al.*, 1993; THEODOROU *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1997, 1998).

As citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β), desempenham papéis fundamentais para a migração celular (DINARELLO, 1997). Lukacs *et al.* (1995) demonstraram que TNF- α age como uma citocina que atua no processo inflamatório inicial e que regula subsequente tanto a infiltração neutrofílica como o recrutamento de eosinófilos nos pulmões e vias aéreas.

Em adição, Erger; Casale (1998) mostraram que o TNF- α é necessário para a migração eosinofílica transendotelial induzida pelo fator estimulador de colônia macrófago-granulócito (FEC-MG). Tem sido mostrado que essa citocina é um fator-chave na adesão de granulócitos e migração transendotelial. Contudo, os neutrófilos não migram através do endotélio pré-tratado com TNF- α em resposta a fator estimulador de colônia macrófago-granulócito. Segundo os autores, os anticorpos anti-ICAM-1, mas não anti-VCAM-1 significativamente inibiram essa resposta. Então, concluíram que a migração transendotelial eosinofílica induzida pelo fator estimulador de colônia macrófago-granulócito, é suportada por TNF- α e dependente da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1).

As moléculas de adesão celular são expressas sobre células endoteliais quando estimuladas por várias citocinas pró-inflamatórias. Miki *et al.* (1996) demonstraram que o TNF- α induz a expressão de E-selectinas e ICAM-1 em células endoteliais de veia umbilical humana. Eles mostraram que a histamina, através de receptores H1, aumentou de forma dose-dependente a expressão de E-selectinas e ICAM-1 induzida pelo TNF- α em células endoteliais de veia umbilical humana.

Os macrófagos também auxiliam na regulação das respostas imunológicas, através da secreção de IL-1, como co-fator importante para a secreção de IL-2, que é essencial para a ativação e proliferação dos linfócitos (LESSOF, 1988). Embora o sobrenadante de linfócitos isolados da lâmina própria intestinal também tenha induzido migração eosinofílica, sugere-se que os macrófagos sejam as células iniciadoras do processo (**Figura 36**).

Além disso, já está muito bem demonstrado na literatura o efeito inibidor de dexametasona sobre a liberação de citocinas e quimiocinas por macrófagos (ROCHA

et al., 1997, 1998, 2000). Nesse estudo observou-se pelos resultados do ELISA que dexametasona inibiu TNF α liberado por macrófagos, mas não inibiu IL-1 β .

Como os sobrenadantes de macrófagos ou linfócitos induziram migração eosinofílica, numa maior amplitude em relação à migração induzida pelo Sob de células totais da lâmina própria, resolveu-se investigar um possível efeito inibidor da atividade quimiotática por mediadores liberados por mastócitos ou eosinófilos intestinais estimulados com ovalbumina. Para essas investigações foram traçadas algumas combinações de estímulos, tais como: macrófagos pré-incubados *in vitro* com Sob de mastócitos, eosinófilos ou linfócitos antes do estímulo ovalbumina. Estes Sobs de macrófagos pré-incubados foram testados no modelo de migração de eosinófilos em cavidades peritoneais de ratos normais. Além disso, também foram testadas as combinações *in vivo*. Para tanto, as cavidades peritoneais dos ratos foram pré-tratadas com Sobs de mastócitos, eosinófilos ou linfócitos estimulados com ovalbumina antes da administração i.p. do Sob de macrófagos estimulados com ovalbumina, para a contagem de eosinófilos. Esses resultados também foram comparados com os dados da migração eosinofílica induzida pelo Sob de CLPI.

Os dados sugerem que o sobrenadante de eosinófilos intestinais modula negativamente a migração eosinofílica tanto a induzida pelo sobrenadante de células totais intestinais como a induzida pelos macrófagos isolados, de forma mais potente para esta última. Enquanto o sobrenadante de mastócitos intestinais modulou negativamente somente a migração de eosinófilos induzida pelos macrófagos isolados.

Para melhor confirmação desse efeito modulatório negativo, observou-se através do ELISA que IL-1 β liberada por eosinófilos de ratos sensibilizados foi significativamente reduzida em relação a liberada por macrófagos de ratos sensibilizados e também reduzida em relação a liberada por eosinófilos de ratos normais (controle), bem como, a IL-1 β liberada por mastócitos de ratos sensibilizados foi parcialmente reduzida, mas não de forma significativa, em relação a liberada por macrófagos. Em adição, houve redução significativa de IL-1 β e TNF liberados por mastócitos de ratos sensibilizados em relação a liberada por mastócitos de ratos normais (controle). Em relação aos linfócitos não houve nenhuma diferença significativa para ambas as citocinas, sugere-se portanto que a citocina envolvida na migração eosinofílica induzida pelo Sob de linfócitos, estimulados com ovalbumina,

de ratos sensibilizados é diferente de TNF e IL-1 β , sendo, provavelmente, a IL-5 uma das citocinas mais importantes nessa resposta migratória.

DALLAIRE *et al.* (2002) propõem que os eosinófilos dos tecidos expressam mais receptores de membrana e liberam mais mediadores do que os do sangue, sugerindo que na migração dessas células do sangue para os tecidos ocorre a modulação de seu fenótipo e de suas funções.

Em adição, Rothenberg *et al.* (2001) sugerem que os eosinófilos são células residentes do sistema imune gastrointestinal cuja proliferação pode ser induzida por exposição antigênica através da ativação de células Th2, sendo regulada principalmente por IL-5 e eotaxina. Os autores propõem ainda que os eosinófilos são células que integram o sistema imune gastrointestinal e parecem ser importantes na resposta imune inflamatória. Além disso, especula-se que a IL-5 é a molécula crítica que estimula o desenvolvimento de eosinófilos e a sua migração (FOSTER *et al.*, 2002).

A expressão de IL-5 por células T CD4(+) tem frequentemente sido especulada como um importante vínculo de ligação entre a inflamação alérgica e a concomitante expansão ou recrutamento de eosinófilos. Vários achados sugerem que a IL-5 apresenta uma importante contribuição na acumulação de eosinófilos nos tecidos alérgicos. Crosby *et al.* (2002) sugerem que o tráfico de eosinófilos durante a resposta inflamatória alérgica pulmonar é uma consequência de eventos mediados por células T CD4(+) em adição a expressão de IL-5 por essas células e o estabelecimento de um gradiente de quimocinas pulmonares. Em adição, os resultados sobre os tratamentos com anti-IL-5 (em modelos animais e humano) demonstram suas importantes características sobre a eosinofilia tecidual (FOSTER *et al.*, 2002).

Os eosinófilos são primariamente tidos como células efetoras terminais das respostas alérgicas e na eliminação de parasitas. No entanto, estudos mais recentes e limitados sugerem um papel imunomodulatório para esses leucócitos durante essas respostas inflamatórias. Mackenzie *et al.* (2001) investigaram o potencial de eosinófilos em agir como células apresentadoras de antígenos (APC) e, portanto, na modulação da resposta alérgica por influenciar a função da célula Th2. Nesse trabalho, em resposta a provocação antigênica em pulmão alérgico, os eosinófilos rapidamente migraram para o sítio de deposição de antígenos (lúmen das vias aéreas). Em seguida, os eosinófilos do pulmão alérgico expressaram peptídeos do CPH classe II, moléculas co-estimulatórias de células T (CD80 e CD86), e

rapidamente internalizaram e processaram o antígeno que foi apresentado do lúmen das vias aéreas. Essas células (eosinófilos) que internalizaram antígenos promoveram a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 em coculturas com células Th2, cuja polarização ocorreu *in vitro* e induziram também produção de IL-5 de forma dose-dependente de células T CD4(+) antígeno-específicas isoladas de camundongos alérgicos. Em adição, esses eosinófilos com carga antigênica quando transferidos para camundongos não sensibilizados, sensibilizaram os animais induzindo uma doença alérgica com polarização para células Th2.

Os autores demonstraram a importância do eosinófilo não somente agindo como célula efetora terminal, mas também na modulação da inflamação alérgica por amplificar a resposta das células Th2 (MACKENZIE *et al.*, 2001). Com base nesses dados da literatura também se pode especular, nesta pesquisa, um efeito inibitório indireto induzido pelo sobrenadante de eosinófilos via modulação das células Th2 contidas no “pool” de células totais, com produção de citocinas predominantemente IL-4 e 13, que podem ter atividade anti-inflamatória, modulando, assim, negativamente a migração de eosinófilos induzida pelo sobrenadante de células totais da lâmina própria intestinal.

A migração celular é um evento central nas respostas imunes e inflamatórias. Vale lembrar, que uma intensa infiltração de eosinófilos e neutrófilos foi observada na hipoderme das patas injetadas com ovalbumina (4 h pós-estímulo) no nosso estudo de edema de pata com ratos sensibilizados. Considerando que o estímulo com ovalbumina, leva a migração de neutrófilos e eosinófilos para os tecidos extravasculares, é provável que a presença de eosinófilos nas fases iniciais da inflamação alérgica, apresente um papel importante na imunomodulação dessas respostas inflamatórias.

Em adição, recentemente vários estudos mostraram que IFN- α pode ser usado para o tratamento de pacientes com síndrome hipereosinofílica idiopática (SHI) refratária à terapia convencional. Aldebert *et al.* (1996) obtiveram bons resultados em pacientes com síndrome hipereosinofílica idiopática tratados por IFN- α com uma significativa associação entre a melhora clínica e o rápido controle da eosinofilia no sangue. Segundo esses autores, o IFN- α R foi encontrado sobre eosinófilos coletados de pacientes com várias desordens eosinofílicas. Além disso, IFN- α inibiu a liberação de grânulos protéicos eosinofílicos, tais como proteínas catiônicas eosinofílicas, IL-5 e a citotoxicidade mediada por eosinófilos.

Por outro lado, recentes estudos sugerem que as citocinas liberadas por mastócitos apresentam um importante papel na proteção dos tecidos. Por exemplo, mastócitos são importantes na proteção contra helmintos intestinais e infecções microbianas sistêmicas (ROTHWELL, 1989; MALAVIYA *et al.*, 1996). Interleucinas-4, 10 e 13 podem ser liberadas por mastócitos e são citocinas com um perfil de atividade Th2. Elas podem ter atividades antiinflamatórias tais como habilidade em reduzir a liberação de TNF- α por monócitos e macrófagos e em limitar a hiperalgesia inflamatória mediada por citocina (ZURAWSKI; DE VRIES, 1994; ARMSTRONG *et al.*, 1996; MIJATOVIC *et al.*, 1997; CUNHA *et al.*, 1999). Vale ressaltar que as citocinas liberadas por mastócitos agem sobre células B, monócitos ou macrófagos, mas não sobre células T (STENTON *et al.*, 1998) e que IL-4, IL-10 e IL-13 são constitutivamente liberadas por mastócitos murinos derivados da medula óssea cultivados com IL-3, na ausência de estimulação exógena (MARIETTA *et al.*, 1996).

Em adição, Bissonete (1996) demonstrou que a histamina liberada por mastócitos inibe através de receptores H2 e H3 a liberação de TNF- α liberado pelos próprios mastócitos. É provável que o efeito inibitório de mastócitos nessa resposta migratória ocorra não somente através de citocinas, como descrito anteriormente, mas também através de receptores de histamina H2 ou H3 (BISSONNETE, 1996; EZEAMUZIE; PHILIPS, 2000). Em adição, a presença de receptores H1 e H2 sobre eosinófilos tem sido bem estabelecida (SEDGWICK; BUSSE, 1990). Em geral, os receptores H1 são geralmente estimulatórios aumentando a quimocinese (CLARK *et al.*, 1977; WADEE *et al.*, 1980) e os receptores H2 geralmente inibitórios (WADEE *et al.*, 1980; SEDGWICK; BUSSE, 1990).

Confirmada a modulação negativa de mastócitos e eosinófilos sobre a migração eosinofílica induzida pelo Sob de macrófagos e baseado em dados da literatura, citados acima, sugeriu-se que a IL-4, e, provavelmente outras citocinas (IL-10, IL-13) e histamina, através dos receptores H2, liberadas por mastócitos são responsáveis por esse efeito inibitório. Além disso, sugere-se também que IFN- α , e provavelmente IL-4, produzidos por eosinófilos modulam negativamente tanto a migração induzida pelo Sob de macrófagos como a induzida pelo Sob de CLPI. Vale ainda especular que a redução da liberação de IL-1 β por eosinófilos e de IL-1 β e TNF- α por mastócitos nos ratos sensibilizados desse estudo, através do ELISA, podem ser importante nesse efeito inibitório, uma vez que essa redução pode ocorrer

em detrimento do aumento de outras citocinas inibitórias descritas anteriormente (por exemplo, IL-4 e IFN- α).

Vale lembrar que no presente estudo quando investigamos os mediadores envolvidos no edema de pata induzido pela ovalbumina em ratos sensibilizados sugerimos que o mastócito parece apresentar um efeito inibitório na resposta edematogênica, desde que cromoglicato de sódio (estabilizador de mastócitos) e composto 48/80 (depletor de mastócitos) aumentaram a resposta edematogênica (FEITOSA *et al.*, 2002).

Para finalizar a discussão sobre o efeito inibitório de Sob de eosinófilos e mastócitos intestinais sobre a migração de eosinófilos induzida por Sob de macrófagos, vale salientar que essa redução observada no número de eosinófilos também pode ser justificada em detrimento do aumento de migração de outras células para a cavidade peritoneal após os estímulos.

Quanto à migração induzida pelo sobrenadante de linfócitos nesse estudo, sugere-se que seja induzida por IL-5, e provavelmente pela citocina quimiotática IL-8, liberadas por linfócitos Th2 (OLIVEIRA *et al.*, 1996), conforme mostra a **Figura 36**.

Em relação à espécie de animais utilizada nesse estudo, vale justificar que os ratos oferecem vantagens para se estudar a biologia dos macrófagos, por várias razões: 1) No mercado existem disponíveis vários anticorpos monoclonais contra glicoproteínas de superfície de macrófagos. Eles não somente facilitam a demonstração da heterogeneidade entre os macrófagos, mas também permitem a caracterização de várias moléculas de superfície em termos de estrutura, regulação de expressão e função; 2) Um número substancial de macrófagos de ratos podem ser isolados de vários sítios (cavidade peritoneal, sangue, pulmão, lâmina própria intestinal e outros tecidos); 3) Vários modelos experimentais para doenças humanas têm sido desenvolvidos em ratos, tornando possível a avaliação da participação de macrófagos na patogênese das doenças (BERG *et al.*, 2001).

A **Figura 36** apresenta um modelo proposto para a modulação da migração de eosinófilos induzida por mediadores liberados por células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados. Nesse modelo são apresentados os mediadores encontrados no presente estudo e outros sugeridos conforme dados da literatura.

Em geral, os dados sugerem que a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de macrófagos da lâmina própria intestinal estimulados com ovalbumina, de ratos sensibilizados, é em parte dependente de citocina(s) liberada(s)

por essas células, tal como $\text{TNF}\alpha$. $\text{TNF}\alpha$ e leucotrienos parecem ser os fatores quimiotáticos e $\text{IL-1}\beta$ pode ser um fator amplificador da resposta migratória induzida pelo sobrenadante de MΦs intestinais por estimular a síntese e liberação de mediadores quimioatraentes. Em adição, prostaglandinas e 5-HT também são importantes nessa resposta migratória, provavelmente agindo em outra fase do processo.

Por fim, os resultados demonstram que macrófagos e linfócitos intestinais, estimulados com ovalbumina, de ratos sensibilizados estão envolvidos na migração de eosinófilos em cavidade peritoneal de ratos, sendo provavelmente os macrófagos as células iniciadoras do processo. E que essa resposta é multifatorial. Vários mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, são importantes na migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de MΦs intestinais no modelo estudado. Por outro lado, mastócitos e eosinófilos intestinais, parecem modular negativamente a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de MΦs intestinais.

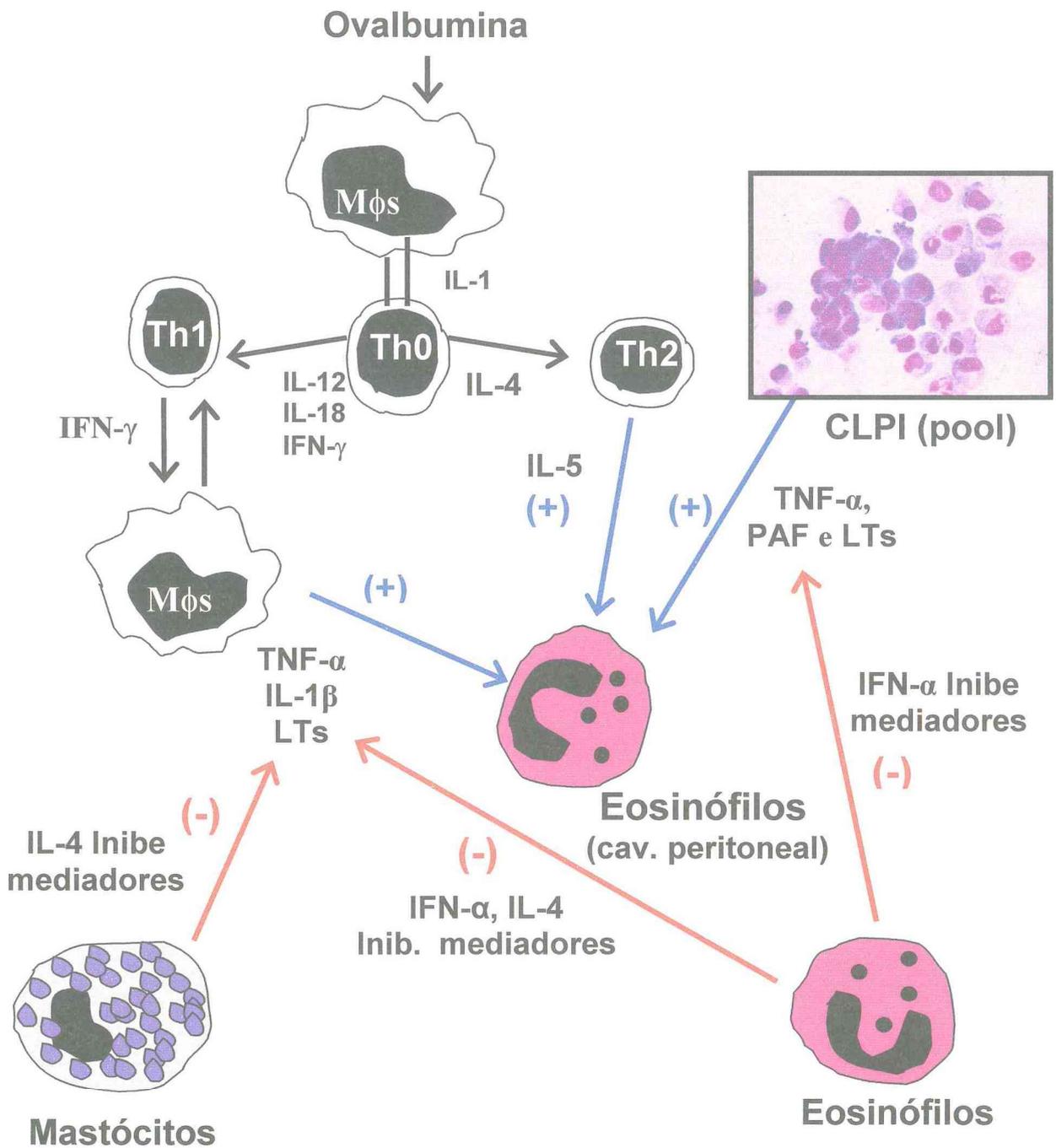


Figura 36 – Mecanismo proposto para a modulação da migração de eosinófilos induzida por sobrenadante de cultura de células da lâmina própria intestinal. Células da lâmina própria intestinal (LPI) de ratos sensibilizados, mais especificamente macrófagos e linfócitos de ratos sensibilizados, estimuladas com ovalbumina liberam fatores quimiotáticos (TNF- α e leucotrienos) para a migração de eosinófilos em cavidade peritoneal de ratos normais. Essa resposta é potencializada por IL-1 β liberada por macrófagos (M ϕ s) isolados da LPI, e inibida por mediadores liberados por mastócitos (IL-4 e provavelmente outras citocinas e histamina através de receptores H2), e por eosinófilos (IFN- α e IL-4) da LPI. Linfócitos isolados da LPI ativados por M ϕ s pré-ativados também liberam fatores quimiotáticos para eosinófilos na cavidade peritoneal de ratos, diferente de TNF- α e IL-1 β , provavelmente IL-5, de acordo com o esquema proposto acima. (Th = T auxiliar ou “helper”; LTs= leucotrienos)

6. CONCLUSÕES

*Para enamorar-se de uma alma, Deus não olha a sua grandeza,
mas a grandeza de sua humildade.*

São João da Cruz

6. Conclusões

- Os resultados demonstraram um potente efeito pró-inflamatório de ovalbumina no modelo de edema de pata de ratos sensibilizados com ovalbumina.
- O edema de pata parece não ser dependente do metabolismo do ácido araquidônico, desde que os inibidores de cicloxigenase e lipoxigenase e antagonista do PAF, não inibiram o edema imune no modelo estudado.
- Serotonina, através dos receptores 5-HT₂, parece ser o principal mediador responsável pelo edema imunológico em rato. Outros mediadores também parecem estar envolvidos, provavelmente citocinas diferentes de TNF.
- Os resultados da migração celular indicam que células da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados, estimuladas com ovalbumina, liberam fatores quimiotáticos para eosinófilos, em cavidade peritoneal de ratos.
- TNF- α e leucotrienos parecem ser os principais fatores quimiotáticos para eosinófilos na migração induzida pelo sobrenadante da cultura de células totais da lâmina própria intestinal estimuladas com ovalbumina de ratos sensibilizados.
- Prostaglandinas, PAF, histamina e 5-HT também parecem ser importantes nessa resposta migratória, provavelmente agindo de forma indireta.
- Macrófagos (M ϕ s) e linfócitos intestinais de ratos sensibilizados, estimulados com ovalbumina, foram as células mais importantes nessa resposta migratória, sendo provavelmente os macrófagos iniciadores do processo. Os dados indicam que TNF α e leucotrienos são os fatores quimiotáticos para a migração de eosinófilos induzida por macrófagos intestinais.
- Prostaglandinas, 5-HT e IL-1 β também são importantes na resposta migratória induzida pelo sobrenadante de M ϕ s intestinais de ratos sensibilizados. A IL-1 β

liberada por essas células potencializa a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de macrófagos.

- Mastócitos e eosinófilos intestinais de ratos sensibilizados, estimulados com ovalbumina, modulam negativamente a migração eosinofílica induzida pelo sobrenadante de macrófagos intestinais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

*De que adianta ao homem ganhar o mundo inteiro,
se vier perder a sua alma?*

Evangelho (Mateus 16, 26)

7. Referências bibliográficas

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, S. Lymphocyte specificity and activation. In: **Cellular and Molecular Immunology**. ABBAS, A. K. (Ed.) Philadelphia: Saunders, 2000.
- ABRAHAM, R.; OGRA, P. L. Mucosal microenvironment and mucosal response. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 5, suppl, p. 3-9, 1994.
- ABRAMSON, S. B.; WEISSMANN, G. The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Arthritis Rheum.**, v. 32, p. 1-9, 1989.
- ALDEBERT, D.; LAMKHIOUED, B.; DESAINT, C.; GOUNNI, A. S.; GOLDMAN, M.; CAPRON, A.; PRIN, L.; CAPRON, M. Eosinophils express a functional receptor for interferon alpha: inhibitory role of interferon alpha on the release of mediators. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2354-2360, 1996.
- AMORIM, C. Z.; CORDEIRO, R. S.; VARGAFTIG, B. B. Interference of antihistamines and anti-allergic drugs with antigen-induced paw edema in boosted and unboosted mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 216, n. 3, p. 429-434, 1996.
- ARRANG, J-M.; SCHWARTZ, J-C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by novel class (H₃) of histamine receptor. **Nature**, v. 302, p. 832-837, 1983.
- AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1445-1451, 1991.
- ARMSTRONG, L.; JORDAN, N.; MILLAR, A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF- α) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes **Thorax**, v. 51, p. 143-149, 1996.
- ASH, A. S. F.; SCHILD, H. O. Receptors mediating some actions of histamine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 27, p. 427-439, 1966.
- BABAK, M.; THOMAS, M. A Eicosanoids and the small intestine [Reviews]. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 61, n. 3-4, p. 125-143, 2000.
- BARRET, K. E. Immune-related intestinal chloride secretion.III. Acute and chronic effects of mast cell mediators on chloride secretion by a human colonic epithelial cell line. **J. Immunol.**, v.147, p. 959-964, 1991.
- BEFUS, D.; FIJIMAKI, H.; LEE, T. D. G.; SWIETER, M. Mast cell polymorphisms. Present concepts, future directions. **Dig. Dis. Sci.**, v. 33, p. 16S-24S, 1988.
- BERG, D. J.; WEINSTOCK, J. V.; LYNCH, R. Rapid induction of inflammatory bowel disease in NSAID-treated IL-10 deficient mice. **Gastroenterology**, v. 120, p. A685, 2001.

BERGESE, S.; PELLETIER, V. D.; WIDMER, M.; OROSZ, C. Regulation of endothelial VCAM-1 expression in murine cardiac grafts. Roles for TNF and IL4. **Am. J. Pathol.**, v. 14, n. 4, p. 989-998, 1995.

BERIN, M. C.; KILIAAN, A. J.; YANG, P. C.; GROOT, J. A.; TAMINIAU, J. A. J. M.; PERDUE, M. H. Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. **Gastroenterology**, v. 113, n. 3, p. 856-864, 1997.

BERSCHNEIDER, H. M. Fibroblast modulation of intestinal secretory responses. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 664, p. 140-147, 1992.

BERSCHNEIDER, H. M.; GORALSKA, M. Interleukin-1 α (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF) enhance the paracrine modulation of intestinal epithelial Cl⁻ secretion by fibroblasts. **Gastroenterology**, v. 102, p. A201, 1992.

BETTE, P.; OKSCHE, A.; MAULER, F. V.; EICHEL-STREIBER, C.; POPOFF, M. R.; HABERMANN, E. A comparative biochemical, pharmacological and immunological study of *Clostridium novyi* α -toxin, *C. difficile* toxin B and *C. sordellii* lethal toxin. **Toxicon**, v. 29, p. 877-887, 1991.

BEUBLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I. W.; LUEDKE, C.; CERAMI, A. Control of cachetin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, v. 232, p. 977-980, 1986.

BISCHOFF, S. C.; MAYER, J. H.; MANNS, M. P. Allergy and the gut. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 121, p. 270-283, 2000.

BISGAARD, H.; LOLAND, L.; OJ, J. A. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast. **Am. Respir. Crit. Care Med.**, v. 160, p. 1227-1231, 1999.

BISHOP, G. A.; HOSTAGÈR, B. S. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 278-285, 2001.

BISSONNETTE, E.Y. Histamine inhibits tumor necrosis factor alpha release by mast cells through H₂ and H₃ receptors. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 14, n. 6, p. 620-626, 1996.

BJARNASON, I.; ZANELLI, G.; SMITH, T.; SMETHURST, P.; PRICE, A. B.; GUMPEL, M. J.; LEVI, A. J. The pathogenesis and consequence of non steroidal anti-inflammatory drug induced small intestinal inflammation in man. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, v. 64, p. 55-62, 1987.

BJORKSTEN, B. The role of the gastrointestinal tract in the development of respiratory hypersensitivities. **Toxicol. Lett.**, v. 86, n. 2-3, p. 85-88, 1996.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A. M.; DURANT, C. J.; GANELLIN, C. R.; PARSONS, E. M. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. **Nature**, v. 236, p.385-390, 1972.

BLAND, P. W. Gut epithelium: food processor for the mucosal immune system? **Gut**, v. 42, p. 455-456, 1998.

BLAND, P. W.; WHITING, C. V. Antigen processing by isolated rat intestinal villus enterocytes. **Immunology**, v. 68, p. 497-502, 1989.

BORGES, W. G. Antileucotrienes. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v. 24, n. 3, 2001. Disponível em: <<http://www.sbai.org.br/arearestrita.php?path=/revista.php>>. Acesso em: 23 nov. 2002.

BRADDING, P.; FEATHER, I. H.; HOWARTH, P. H.; MUELLER, R.; ROBERTS, J. A.; BRITTEN, K.; BEWS, J. P.; HUNT, T. C.; OKAYANA, Y.; HEUSSER, C. H. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1381-1386, 1992.

BRAQUET, P.; TOUQUI, L.; SHEN, T. Y.; VARGAFTIG, B. B. Perspectives in platelet activating factors research. **Pharmacol. Rev.**, v. 39, n. 2, p. 97-145, 1987.

BURKS, A. W., SAMPSON, H. A. Food allergies in children. **Curr. Probl. Pediatr.**, v. 23, p. 230-252, 1993.

BUSINCO, L.; CANTANI, A. Food allergy in children: diagnosis and treatment with sodium cromoglycate. **Allergol. Immunopathol. (Madr)**, v. 18, n. 6, p. 339-348, 1990.

CALDERÓN, G.M.; TORRES-LÓPEZ, J.; LIN, T.J.; CHAVEZ, B.; HERNÁNDEZ, M.; MUÑOZ, O.; BEFUS, A.D.; ENCISO, J.A. Effects of Toxin A from *Clostridium difficile* on Mast Cell Activation and Survival. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2755-2761, 1998.

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 of the small intestine. **J. Immunol.**, v. 151, n. 4, p. 1765-1776, 1993.

CANETTI, C.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, n. 8, p. 1619-1628, 2001.

CARRADA BRAVO, T. Cholera immunology and the molecular biology of cholera toxin. Recent progress and future prospects. **Rev. Alerg.**, v. 40, n. 4, p. 91-94, 1993.

CASEY, FB.; TOKUDA, S. A comparative study of the mechanism of passive cutaneous anaphylaxis induced by mouse IgG, rabbit F(ab')₂ antibodies. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 44, n. 6, p. 737-744, 1973.

CASTAGLIUOLO, I.; RIEGLER, M.; PASHA, A.; LU, B.; GERARD, C.; GERARD, N. P.; POTHOUKAKIS, C. Neurokinin-1 (NK-1) receptor is required in *Clostridium difficile*-induced enteritis. **J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 8, p. 1547-1550, 1998.

CHANDRA, R. K. Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 66, p. 526S-529S, 1997.

CHANG, E. B.; MUSCH M. W.; MAYER, L. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. **Gastroenterology**, v. 98, p. 1518-1524, 1990.

CIANCIO, M. J.; CHANG, E. B. Epithelial secretory response to inflammation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 664, p. 210-221, 1992.

CLARK, R. A. F.; SANDLER, J. A.; GALLIN, J. I.; KAPLAN, A. P. Histamine modulation of eosinophil migration. **J. Immunol.**, v. 118, p. 137-145, 1977.

COHN, L.; TEPPER, J. S.; BOTTOMLY, K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. **J. Immunol.**, v. 161, n.8, p. 3813-3816, 1998

COLLINS, M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1683-1699, 1996.

COOKE, H. J. Neurobiology of the intestinal mucosa. **Gastroenterology**, v. 90, p. 1057-1081, 1986.

COSTA, J. J.; WELLER, P. F.; GALLI, S. J. The cells of the allergic response: mast cells, basophils and eosinophils. **JAMA**, v. 278, n. 22, p. 1815-1822, 1997.

CROITORU, K.; ERNST, P. B. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment revisited. **Reg. Immunol.**, v. 4, p. 63-69, 1992.

CROSBY, J. R.; SHEN, H. H.; BORCHERS, M. T.; JUSTICE, J. P.; ANSAY, T.; LEE, J. J.; LEE, N. A. Ectopic expression of IL-5 identifies an additional CD4(+) T cell mechanism of airway eosinophil recruitment. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 282, n. 1, p. L99-L108, 2002.

CROWE, S. E.; PERDUE, N. H. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. **Gastroenterology**, v. 103, p. 1075-1095, 1992.

CROWE, S. E.; SODA, K.; STANISZ, A. M.; PERDUE, M. H. Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. **Am. J. Physiol.**, v. 264, n. 27, p. G617-G623, 1993.

CRYER, B. NSAID gastrointestinal toxicity. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 16, p. 495-502, 2000.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; VEIGA, F. H.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, n. 1, p. 45-50, 1999.

DALLAIRE, M. J.; FERLAND, C.; LAVIGNE, S.; CHAKIR, J.; LAVIOLETTE, M. Migration through basement membrane modulates eosinophil expression of CD44. **Clin. Exp. Allergy**, v. 32, n. 6, p. 898-905, 2002.

De LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; de MENEZES ALENCAR, V. B.; VIDAL, F. D.; Da ROCHA, F. A.; De CASTRO BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 123-129, 2000.

DE MEO, M. T.; MUTLU, E. A.; KESHAVARZIAN, A.; TOBIN, M. C. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 34, n. 4, p. 385-396, 2002.

DA MOTTA, J. I.; CUNHA, F. Q.; VARGAFTIG, B. B.; FERREIRA, S. H. Drug modulation of antigen-induced paw oedema in guinea-pigs: effects of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and leucocyte depletion. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, n. 1, p. 111-116, 1994.

DIAZ-GONZALEZ, F.; SANCHEZ-MADRID, F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism for action for anti-inflammatory drugs. **Immunol. Today**, v. 19, p. 169-172, 1998.

DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 6, p. 1177-1184, 1991.

DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. The role of interleukin-1 in disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 106-113, 1993.

DIONNE, S.; RUEMMELE, F. M.; SEIDMAN, E. G. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: role of cytokines and immune cell-enterocyte interactions. **Nestle Nutr. Workshop Ser. Clin. Perform. Progr.**, v. 2, p. 41-57, discussion 58-61, 1999.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DRAZEN, J. M. Pharmacology of leukotriene receptor antagonists and 5-lipoxygenase inhibitors in the management of asthma. **Pharmacotherapy**, v. 17, p. 22S-30S, 1997.

DUNKLEY, M.; PABST, R.; CRIPPS, A. An important role for intestinally derived T cells in respiratory defence. **Immunol. Today**, v. 16, n. 5, p. 231-236, 1995.

EBERHART, C. E.; DUBOIS, R. N. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, v. 109, p. 285-301, 1995.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F.; FIERER, J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 69-74, 1993.

ELTON, E.; CHIOSSONE, D. C.; MCCAFFERTY, G. P.; RYAN, F. M.; SMITH, P. L. SK&F 104353: Selective antagonism of peptidoleukotriene-induced changes in electrolyte transport by rat ileal mucosa *in vitro*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 251, p. 484-489, 1989.

ENDRES, S.; FULLE, H. J.; SINHA, B.; STOLL, D.; DINARELLO, C. A.; GERZER, R.; WEBER, P. C. Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear cells. **Immunology**, v. 72, n. 1, p. 56-60, 1991.

ENERBACK, L.; LOWHAGEN, G.; LOWAGEN, O.; WINGREN, U. The effect of polymixin B and some mast cell constituents on mucosal mast cells in the duodenum of the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 214, p. 239-243, 1981.

ENERBACK, L. Mast cell heterogeneity. The evolution of the concept of a specific mucosal mast cell. *In*: BEFUS, A. D. *et al* (Eds). **Mast cell differentiation and heterogeneity**. New York: Raven, 1986. p. 1-26.

ERGER, R.A.; CASALE, T.B. Tumor necrosis factor alpha is necessary for granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor induced eosinophil transendothelial migration. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 115, n. 1, p. 24-32, 1998.

EZEAMUZIE, C. I.; PHILIPS, E. Histamine H₂ receptors mediate the inhibitory effect of histamine on human eosinophil degranulation. **British journal of Pharmacology**, v. 131, p. 482-488, 2000.

FANG, G.; LIMA, A.A.M.; THIELMAN, N.; FONTELES, M.; YOTSEFF, P.; LYERLY, D.; GUERRANT, R.L. Role of phospholipase A₂ in the histologic, epithelial and secretory responses to *Clostridium difficile*. **Biomed. J.**, v. 1, p. 1-5, 1994.

FARGEAS, M. J.; THEODOROU, V.; MORE, J.; WAL, J. M.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Boosted systemic immune and local responsiveness after intestinal inflammation in orally sensitized guinea pigs. **Gastroenterology**, v. 109, p. 53-62, 1995.

FASANO, A. Bacterial infections: small intestine and colon. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 4-9, 2001.

FEITOSA, R. F. G.; CARUBBI, E. K.; MONTEIRO, M. C. S. A.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. A. Effect of supernatant from intestinal lamina propria cells stimulated with ovalbumin on eosinophils migration. *In*: LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY, 16., Águas de Lindóia, 2000. **Resumos...** São Paulo. Abs. 19.010.

FEITOSA, R. F. G.; CARUBBI, E. K.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. A. Bloqueio farmacológico da migração eosinofílica induzida por sobrenadante de células da lâmina própria intestinal de ratos imunizados com ovalbumina. *In*: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPEUTICA EXPERIMENTAL, 36., 2002, Águas de Lindóia. **Resumos...** São Paulo. p. 166. Abs. 05.028.

FEITOSA, R. F. G.; CARUBBI, E. K.; ROCHA, M. F.; LIMA, A. A. Modulação farmacológica da migração eosinofílica por sobrenadante de macrófagos da lâmina própria intestinal de ratos sensibilizados com ovalbumina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPEUTICA EXPERIMENTAL, 36., 2002, Águas de Lindóia, 2002. **Resumos...** São Paulo. p. 166. Abs.05.029.

FEITOSA, R. F. G.; MELCIADES, G. B.; ASSREUY, A. M.; ROCHA, M. F.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. The pharmacological profile of ovalbumin-induced paw oedema in rats. **Mediators Inflamm.** v. 11, n. 3, p. 155-163, 2002.

FEITOSA, R. F.G; ROCHA, M.F.; LIMA, A. A. Isolamento de macrófagos, linfócitos e mastócitos da lâmina própria intestinal de ratos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 16., 2001, Caxambu, 200 **Resumos...** Minas Gerais, 2001. p. 248. 30.030.

FONTELES, M. C.; FANG, G.; THIELMAN, N. M.; YOTSEFF, P. S.; GUERRANT, R. L. Role of platelet activating factor in inflammatory and secretory effects of *Clostridium difficile* toxin A. **J. Lip. Med. Cell Sign.**, v. 11, p. 133-143, 1995.

FOSS, D. L.; MURTAUGH, M. P. Role of macrophage cytokines in mucosal adjuvanticity. **Adv. Vet. Med.**, v. 41, p. 83-104, 1999.

FOSTER, P. S.; HOGAN, S. P.; YANG, M.; MATTES, J.; YOUNG, I. G.; MATTHAEI, K. I.; KUMAR, R. K.; MAHALINGAM, S.; WEBB, D. C. Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. **Trends Mol. Med.**, v. 8, n. 4, p. 162-167, 2002.

FREGONESE, L.; SILVESTRI, M.; SABATINI, F.; ROSSI, G.A. Cysteinyl leukotrienes induce human eosinophil locomotion and adhesion molecule expression via a CysLT1 receptor-mediated mechanism. **Clin Exp. Allergy**, v. 32, n. 5, p. 745-755, 2002.

GALLAGHER, G. Interleukin 19, a inhibitory citocine. **Genes Immun.**, v. 1, p. 442-450, 2001.

GALPERIN, C.; GERSHWIN, M. E. Immunopathogenesis of gastrointestinal and hepatobiliary diseases. **JAMA**, v. 278, n. 22, p. 1946-1955, 1997.

GERSHON, M. D. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. **Alim. Pharmacol. Therap.**, v. 13, suppl. 4, p.15-30, 1999.

GERVAIS, F. G.; CRUZ, R. P.; CHATEAUNEUF, A.; GALE, S.; SAWYER, N.; NANTEL, F.; METTERS, K.M.; O'NEILL, G.P. Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 108, n. 6, p. 982-988, 2001.

GORDON, J. R.; BURD, P. R.; GALLI, S. J. Mast cell as a source of multifunctional cytokines. **Immunology Today**, v. 20, p. 227-237, 1990.

GRISHAM, M. B.; GAGINELLA, T. S.; VON RITTER, C.; TEMAI, H.; BE, R. M.; GRANGER, D. N. Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. **Inflammation**, v. 14, p. 531-542, 1990.

GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E.; ANDRONCAROLO, M. G. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 737-742, 1997.

GUO, Y., MOCHIZUKI, T.; MORII, E.; KITAMURA, Y.; MAEYAMA, K. Role of mast cell histamine in the formation of rat paw edema: A microdialysis study. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 331, n. 2-3, p. 237-243, 1997.

HALPERN, G. M.; SCOTT, J. R. Non-IgE antibody mediated mechanisms in food allergy. **Ann. Allergy**, v. 58, p. 14-27, 1987.

HAMASAKI, Y.; SHAFIGE, M.; YAMAMOTO, S.; SATO, R.; ZAITU, M.; MURO, E.; KOBAYASHI, I.; ICHIMARU, T.; TASAKI, H.; MIYAZAKI, S. Inhibition of leukotriene synthesis by azelastine. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 76, n. 5, p. 469-475, 1996.

HARDCASTLE, I.; HARDCASTLE, P. T. Comparison of the intestinal secretory response to 5-Hydroxytryptamine in the rat jejunum and ileum in-vitro. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 49, p. 1126-1131, 1997.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity [Review]. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.

HARWIG, S. S. L.; TAN, L.; QU, X-D.; CHO, Y.; EISENHAEUER, P. B.; LEHRER, R. I. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A₂. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 603-610, 1995.

HAWKEY, C. J. Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy: Causes and treatment. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 31, p. 124-127, 1996.

HELM, R. M.; BURKS, A. W. Mechanisms of food allergy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, n. 6, p. 647-653, 2000.

HERRICK, C. A.; MACLEOD, H.; GLUSAC, E.; TIGELAAR, R. E.; BOTTOMLY, K. Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on il-4. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 6, p. 765-775, 2000.

HERSHBERG, R. M.; FRAMSON, P. E.; CHO, D. H. Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 204-215, 1997.

HERZ, U.; LACY, P.; RENZ, H.; ERB, K. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 12, p. 632-640, 2000.

HEUSSER, C.; JARDIEU, P. Therapeutic potential of anti-IgE antibodies. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p. 805-814, 1997.

HIRSCHBRUCH, M. D., TORRES, E. A. F. S. Reações adversas em alimentos: alergia e intolerância alimentar. **Hig. Alim.**, v. 11, n. 50, p. 8-10, 1997.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C.; LYCKE, N.; SVENNERHOLM, A. M. Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier, and adjuvant. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20, n. 5, p. 42-54, 1994.

HOGABOAM, C.; SNIDER, D.; COLLINS, S. M. Activation of T lymphocytes by syngeneic murine intestinal smooth muscle cells. **Gastroenterology**, v. 110, p.1456-1466, 1996.

HONRUBIA, M. A.; RODRIGUEZ, J.; DOMINGUEZ, R.; LOZOYA, E.; MANAUT, F.; SEIJAS, J. A.; VILLAVERDE, M. C.; CALLEJA, J. M.; CADAVID, M. I; MAAYANI, S.; SANZ, F.; LOZA, M. I. Synthesis, affinity at 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} serotonin receptors and structure-activity relationships of a series of cyproheptadine analogues. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 45, p. 842-848, 1997.

IHAKU, D; CAMERON, L; SUZUKI, M; MOLET, S; MARTIN, J; HAMID, Q. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, inhibits the late airway response to antigen, airway eosinophilia, and IL-5-expressing cells in Brown Norway rats. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 104, n. 6, p. 1147-1154, 1999.

JAHNOVÁ, E.; HORVÁTHOVÁ, M.; GAZDIK, F. Expression of adhesion molecules and effect of disodium cromoglycate treatment in asthmatics. **Physiol. Res.**, v. 47, n. 6, p. 439-443, 1998.

JARDIEU, S. Anti-IgE therapy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, p. 779-782, 1995.

JONES, D. H.; CLEGG, J. C.; FARRAR, G. H. Oral delivery of micro-encapsulated DNA vaccines. **Dev. Biol. Stand.**, v. 92, p.149-155, 1998.

JOHNSTON Jr., R. B. Monocytes and macrophages. **N. Eng. J. Med.**, v. 318, p. 747-752, 1988.

JUTEL, M.; WATANABE, T.; KLUNKER, S.; AKDIS, M.; THOMET, O. A.; MALOLEPSZY, J.; ZAK-NEJMARK, T.; KOGA, R.; KOBAYASHI, T.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H₁ and H₂ receptors. **Nature**, v. 413, n. 6854, p. 420-425, 2001.

KANDIL, H. M.; BERSCHNEIDER, H. M.; ARGENZIO, R. A. Tumour necrosis factor α changes porcine intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gut**, v. 35, p. 934-940, 1994.

KANDIL, H.; BERSCHNEIDER, H.; ARGENZIO, A. TNF- α alters intestinal ion transport through a paracrine mechanism involving prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 102, p. A217, 1992.

KANETA, S.; KANBARA, H.; FUJIHIRA, E.; MITSUYA, M. Mouse Ig-E-mediated paw anaphylaxis in mice and rats. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 80, p. 333, 1986.

KANWAR, S.; WALLACE, J. L.; BEFUS, D.; KUBES, P. Nitric oxide modulates mucosal barrier function: a potential role for the mast cell (Abstract). **Gastroenterology**, v. 104, p. A1044, 1992.

KELLERMANN, S. A.; MCEVOY, L. M. The Peyer's patch microenvironment suppresses T cell responses to chemokines and other stimuli. **J. Immunol.**, v. 167, n. 2, p. 682-690, 2001.

KELLY, C. P. Immune response to *Clostridium difficile* infection. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, n. 11, p. 1048-1053, 1996.

KERNEIS, S.; BOGDANOVA, A.; KRAECHENBUHL, J-P.; PRINGAULT, E. Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. **Science**, v. 277, p. 949-952, 1997.

KIM, D. Y.; CAMILLERI, M. Serotonin: A Mediator of the Brain-Gut Connection. **The Am. J. Gastroenterol.**, v. 95, p. 2698-2709, 2000.

KINET, J-P. Allergy and hypersensitivity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, p. 685-687, 2002.

KITA, H. The eosinophil: a cytokine producing cell? **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 97, p. 889-892, 1996.

KIYONO, H.; KWEON, M. N.; HIROI, T.; TAKAHASHI, I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. **Acta Odontol. Scand.**, v. 59, n. 3, p. 145-153, 2001.

KHAN, I.; BLENNERHASSETT, M. G.; KATAEVA, G. V.; COLLINS, S. M. Interleukin 1 beta induces the expression of interleukin 6 in rat intestinal smooth muscle cells. **Gastroenterology**, v. 108, p. 1720-1728, 1995.

KNUTSON, T. W.; KNUTSON, L. F.; HOGAN, D. L. Human proximal duodenal ion and water transport. **Dig. Dis. Sci.**, v. 40, p. 241-246, 1995.

KONDA, Y.; NISHISAKI, H.; NAKANO, O.; MATSUDA, K.; WADA, K.; NAGAO, M.; MATOZAKI, T.; SAKAMOTO, C. Prostaglandin protect isolated guinea pig chief cells against ethanol injury via an increase in diacylglycerol. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1897-1903, 1990.

KUBENA, K. S.; MCMURRAY, D. N. Nutrition and the immune system: a review of nutrient-nutrient interactions. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 96, p. 1156-1164, 1996.

KUSAGAMI, K.; KUROIWA, A.; HARUTA, J. Interleukin-6 activities in lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 100, p. A591, 1991.

KUWABARA, N.; KONDO, N.; FUKUTOMI, O.; AGATA, H.; ORII, T. Relationship between interferon-gama, interleucina-4 e produção de IgE de linfócitos de pacientes sensíveis a ovo de galinha. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 198-204, 1995.

KWEON, M. N.; YAMAMOTO, M.; KAJIKI, M.; TAKAHASHI, I.; KIYONO, H. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 2, p. 199-206, 2000.

LAKE, A. M. Experimental models for the study of gastrointestinal food allergy. **Ann. Allergy**, v. 51, p. 226-228, 1983.

LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carragenin-induced rat paw oedema by crotafotol, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 655-677, 1995.

LEE, T. D. G.; SHANAHAN, F.; MILLER, H. R. P.; BIENENSTOK, J.; BEFUS, A. D. Intestinal mucosal mast cells: Isolation from rat lamina propria and purification using unit gravity velocity sedimentation. **Immunology**, v. 55, p. 721-727, 1985.

LEE, H. Z.; WU, C. H. Serotonin-induced protein kinase C activation in cultured rat heart endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 403, p. 195-202, 2000.

LEEPER-WOODFORD, S. K.; FISHER, B. J.; SUGERMAN, H. J.; FOWLER, A. A. Pharmacologic reduction in tumor necrosis factor activity of pulmonary alveolar macrophages. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 8, n. 2, p. 169-175, 1993.

LEFEVRE, M. E.; HAMMER, R.; JOEL, D. D. Macrophages of the Mammalian Small Intestine: A Review. **J. Reticuloend. Soc.**, v. 26, n. 5, p. 553-573, 1979.

LESSER, M. L.; BROWN, K. I.; HELSON, L. Statistical methods for measuring and comparing treatment efficacy application to nude mice experimentations. **Exp. Cell Biol.**, v. 418, p. 126-137, 1980.

LESSOF, M. H. **Alergia: aspectos clínicos e imunológicos**. São Paulo: Roca, 1988. 492 p.

LEVI-SCHAFFER, F.; GARE, M.; SHALIT, M. Unresponsiveness of rat peritoneal mast cells to immunologic reactivation. **J. Immunol.**, v. 145, p. 3418-3424, 1990.

LIKURA, M.; TAKAISHI, T.; HIRAI, K.; YAMADA, H.; LIDA, M.; KOSHINO, T.; MORITA, Y. Exogenous nitric oxide regulates the degranulation of human

basophils and rat peritoneal mast cells. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 115, p. 129-136, 1998.

LIMA, A. A. M. Cholera: molecular epidemiology, pathogenesis, immunology, treatment and prevention. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 7, p. 592-601, 1994.

LIMA, A. A. M.; INNES, D. J.; CHADEE, K.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; GUERRANT, R. L. *Clostridium difficile* toxin A interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. **Lab. Investig.**, v. 61, p. 419-425, 1989.

LIMA, A. A. M.; LIMA, N. L. Epidemiology, therapy and prevention of infection with *Shigella* organisms and *Clostridium difficile*. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 6, p. 63-71, 1993.

LIMA, A. A. M.; LYERLY, D. M.; WILKINS, T. D.; INNES, D. J.; GUERRANT, R. L. Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine *in vivo* and on cultured cells *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 582-588, 1988.

LISTON, H.; BENNETT, L.; USHER, B.; NAPPI, J. The association of the combination of sumatriptan and methysergide infarction in a premenopausal woman. **Arch. Intern. Med.**, v. 159, p. 511-513, 1999.

LIU, C.; MA, X-J.; JIANG, X.; WILSON, S. J.; HOFSTRA, C. L.; BLEVITT, J.; PYATI, J.; LI, X.; CARRUTHERS, N.; LOVENBERG, T. W. Cloning and Pharmacological Characterization of a Fourth Histamine Receptor (H4) Expressed in Bone Marrow. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, n. 3, p. 420-426, 2001.

LUCEY, D. R.; NICHOLSON, W. A.; WELLER, P. F. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 86, p. 1348-1351, 1989.

LUKACS, N. W.; STRIETER, R. M.; CHENSUE, S. W.; WIDMER, M.; KUNKEL, S. L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. **J. Immunol.**, v. 154, n.10, p. 5411-5417, 1995.

LYNCH, K. R.; O'NEILL, G. P.; LIU, Q.; IM, D. S.; SAWYER, N.; METTERS, K. M.; COULOMBE, N.; ABRAMOVITZ, M.; FIGUEROA, D. J. ZENG, Z.; CONNOLLY, B. M.; BAI, C.; AUSTIN, C. P.; CHATEAUNEUF, A.; STOCCO, R.; GREIG, G. M.; KARGMAN, S.; HOOKS, B.; HOSFIELD, E.; WILLIAMS, D. L.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; CASKEY, C. T.; EVANS, J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotrien CysL receptor. **Nature**, v. 399, n. 6738, p.789-793, 1999.

MACKENZIE, J.R.; MATTES, J.; DENT, L.A.; FOSTER, O.S. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. **J. Immunol.**, v. 167, n. 6, p. 3146-3155, 2001.

MALAVIYA, R.; IKEDA, T.; ROSS, E.; ABRAHAM, S. N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. **Nature**, v. 381, p. 77- 80, 1996.

MALING, H. M.; WEBSTER, M. E.; WILLIAMS, M. A.; SAUL, W.; ANDERSON, W. J. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: Antagonists and mechanisms of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.191, p. 300-310, 1974.

MAYER, L. Current concepts in mucosal immunity. I. Antigen presentation in the intestine new rules and regulations. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. G7-G9, 1998.

MAYER, L.; EISENHARDT, D.; SALOMON, P. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.100, p. 3-12, 1991.

MARIETTA, E. V.; CHEN, Y.; WEIS, J. H. Modulation of expression of the antiinflammatory cytokines interleukin-13 and interleukin-10 by interleukin-3. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 49-56, 1996.

MARSHALL, J. S.; LEAL-BERUMEN, I.; NIELSEN, L.; GLIBETIC, M.; JORDANA, M. Interleukin (IL)-10 inhibits long-term IL-6 production but not preformed mediator release from rat peritoneal mast cells. **J. Clin. Invest.**, v. 97, p. 1122-1128, 1996.

MARSHALL, J. S. Repeated antigen challenge in rats induces a mucosal mast cell hyperplasia. **Gastroenterology**, v. 105, p. 391-398, 1993.

MCCAIN, R. W.; DESSYPRIS, E. N.; CHRISTMAN, J. W. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 in vitro. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 8, n. 1, p. 28-34, 1993.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R. H.; KITSON, R. P.; MILLER, H. M.; SPENCER, L.; JAY, M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions (Review Article). **Brain Res. Rev.** v. 23, n. 1, p. 133, 1987.

MCKAY, D. M.; BIENENSTOCK, J.; PERDUE, M. H. Inhibition of antigen-induced secretion in the rat jejunum by interferon alpha/beta. **Reg. Immunol.**, v. 5, n. 1, p. 53-59, 1993.

MCKAY, D.M.; BIENENSTOCK, J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. **Immunol. Today**, v. 15, p. 533, 1994.

MCKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. Cells and mediators. **Dig. Dis. Sci.**, v. 38, p. 1377-1387, 1993.

MCKAY, D. M.; BAIRD, A. W. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. **Gut**, v. 44, p. 283-289, 1999.

MEENAM, J.; GROOL, T. A.; HOMMES, D. W.; DIJKHUIZEN, S.; TEN KATE, F. J.; WOOD, M.; WHITTAKER, M.; TYTGAT, G. N.; VAN DEVENTER, S. J.

Lexipafant (BB-882), a platelet activating factor receptor antagonist, ameliorates mucosal inflammation in an animal model of colitis. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, p. 569-573, 1996.

MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cells in innate immunity. **Immunol. Rev.**, v. 173, p. 131-140, 2000.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.

METCALFE, D. D. Food allergy. **Prim. Care**, v. 25, n. 4, p. 819-829, 1998.

MELO FILHO, A. A.; SOUZA, M. H. L. P.; LYERLY, D. M.; CUNHA, F. Q.; LIMA, A. A. M.; RIBEIRO, R. A. Role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. **Toxicon**, v. 35, p. 743-752, 1997.

MENDES, D. M.; CAMARGO, M. F.; AUN, V. V.; FERNANDES, M. F. M.; AUN, W. T.; MELLO, J. F. Eosinophilia. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v. 23, n. 2, p. 84-91, 2000.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.

MIJATOVIC, T.; KRUYIS, V.; CAPUT, D.; DEFRANCE, P.; HUEZ, G. Interleukin-4 and -13 inhibit tumour necrosis factor-alpha mRNA translational activation in lipopolysaccharide-induced mouse macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 14394-14398, 1997.

MIKI, I.; KUSANO, A.; OHTA, S.; HANAI, N.; OTOSHI, M.; MASAKI, S.; SATO, S.; OHMORI, K. Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. **Cell Immunol.**, v. 171, n. 2, p. 285-288, 1996.

MILLER, H. R. P.; WOODBURY, R. G.; HUNTLEY, J. F.; NEWLANDS, G. Systemic release of mucosal mast cell protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunology**, v. 49, p. 471-479, 1983.

MOHAJER, B.; MA, T. Y. Eicosanoids and the small intestine. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 61, n. 3-4, p. 125-143, 2000.

MONNERET, G.; COSSETTE, C.; GRAVEL, S.; ROKACH, J.; POWELL, W.S. 15R-methyl-prostaglandin D2 is a potent and selective CRTH2/DP2 receptor agonist in human eosinophils. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 304, n. 1, p. 349-355, 2003.

MOREIRA, A. L.; SAMPAIO, E. P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K. A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, v. 77, p. 1675-1680, 1993.

MORTEAU, O.; PONS, L.; BUENO, L. Platelet-activating factor and interleukin-1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. **Gastroenterology**, v. 104, p. 47-56, 1993.

MOWAT, A. M.; VINEY, J. L. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immunol. Rev.**, v. 156, p. 145-166, 1997.

MUDDE, G. C.; REISCHUL, I. G.; CORVAIA, N.; HREN, A.; POELLABAUER, E. M. Antigen presentation in allergic sensitization. **Immunol. Cell Biol.**, v. 74, n. 2, p. 167-173, 1996.

NAGATA, M.; SAITO, K.; TSUCHIYA, K.; SAKAMOTO, Y. Leukotriene D4 upregulates eosinophil adhesion via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, n. 4, p. 676-680, 2002.

NEUTRA, M. R.; KRAEHENBUHL, J. P. Mucosal immunization via M cells for production of protective secretory IgA antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n. 5, suppl., p. 10-13, 1994.

NEUTRA, M. R.; PRINGAUL, T. E.; KRAEHENBUHL, J. P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 14, p. 275-300, 1996.

NISIJIMA, K.; YOSHINO, T.; YUI, K.; KATOH, S. Potent serotonin (5-HT)_{2A} receptor antagonists completely prevent the development of hyperthermia in a animal model of the 5-HT syndrome. **Brain Res.**, v. 890, p. 23-31, 2001

NOVEMBRE, E.; DE MARTINO, M.; VIERUCCI, A. Foods and respiratory allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 81, n. 5, pt. 2, p. 1059-1065, 1988.

NYLANDER, O.; ANDERSSON, H.; WILANDER, E.; SABABI, M. Prostaglandins reduce hydrochloric acid-induced increase in duodenal mucosal permeability by a mechanism not related to stimulation of alkaline secretion. **Acta Physiol. Scand.**, v. 153, n. 4, p. 365-374, 1995.

OGLE, C. K.; WU, J-Z.; MAO, X.; SZCZUR, K.; ALEXANDER, J. W.; OGLE, J. D. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. **Inflammation**, v. 18, p. 511-523, 1994.

OHTSUKA, Y.; YAMASHIRO, Y.; MAEDA, M.; OGUECHI, S.; SHIMIZU, T.; NAGATA, S.; YAGITA, H.; YABUTA, K.; OKUMURA, K. Food antigen activating intraepithelial and lamina propria lymphocytes in food-sensitive enteropathy in mice. **Pediatr. Res.**, v. 39, n. 5, p. 862-866, 1996.

OLIVEIRA, S. H.; COSTA, C. H.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB₄, TNF- α , IL-8 and PAF. **Inflamm. Res.**, v. 51, n. 3, p. 144-153, 2002.

- OLIVEIRA, S. H.; FACCIOLI, L. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Participation of interleukin-5 and interleukin-8 in the eosinophil migration induced by a large volume of saline. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 111, n. 3, p. 244-252, 1996.
- OLIVER, M. R.; TAN, D. T. M.; KIRK, D. R.; RIOUX, K. P.; SCOTT, R. B. Colonic and jejunal motor disturbances following colonic antigen challenge of sensitized rat. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1996-2005, 1997.
- OLSZEWSKI, M. A.; ROBINSON, N. E.; ZHU, F. X.; ZHANG, X. Y.; TITHOF, P. K. Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 3 pt. 1, p. L522-529, 1999.
- OSHIBA, A.; HAMELMANN, E.; HACZKU, A.; TAKEDA, K.; CONRAD, D. H.; KIKUTANI, H.; GELFAND, E. W. Modulation of Antigen-Induced B and T Cell Responses by Antigen-Specific IgE Antibodies. **J. Immunol.**, v. 159, p. 4056-4063, 1997.
- OWEN, D. A. A. Vascular changes during acute inflammation responses in rat hindpaws. In: WILLOUGHBY, D. A.; GIROUD, J. P.; VELO, G. P. (Eds.). **Perspectives in Inflammation**. London: MTP, 1977. p. 491-495.
- PAVLI, P.; MAXWELL, L.; VAN DE POL, E. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 104, p. 124, 1996.
- PEARCE, F. L.; BEFUS, A. D.; GAUDIE, J.; BIENENSTOCK, J. Mucosal mast cell II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. **J. Immunol.**, v. 128, p. 2481-2485, 1982.
- PEARL, E. R. Food allergy. **Care Pract.**, v. 1, n. 2, p. 154-167, 1997.
- PERDUE, M. H.; MCKAY, D. M. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 2, pt. 1, p. G151-G165, 1994.
- PERDUE, M. H.; CHUNG, M.; GALL, D. G. Effect of intestinal anaphylaxis on gut function in the rat. **Gastroenterology**, v. 86, p. 391-397, 1984.
- PERDUE, M. H. Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 1 pt. 1, p. G1-G5, 1999.
- PIERCE, P. A.; XIE, G. X.; PEROUTKA, S. J.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. 5-Hydroxytryptamine-induced synovial plasma extravasation is mediated via 5-hydroxytryptamine 2A receptors on sympathetic efferent terminals. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 275, p. 502-508, 1995.
- PIERRE, P.; DENIS, O.; BAZIN, H.; MBONGOLO, E.; VAERMAN, J. P. Modulation of oral tolerance by cholera toxin and its B subunit. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 2, p. 3179-3182, 1992.

POLLICE, P. F.; ROSIER, R. N.; LOONEY, R. J.; PUZAS, J. E.; SCHWARZ, E. M.; O'KEEFE, R. J. Oral pentoxifylline inhibits release of tumor necrosis factor- α from human peripheral blood monocytes : a potential treatment for aseptic loosening of total joint components. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 83A, p. 1057-1061, 2001.

POTHOULAKIS, C.; KARMELI, F.; KELLY, C.P.; ELIAKIM, R.; JOSHI, M. A.; O'KEAN, C. J.; CASTAGLIULO, I.; LaMONT, J. T.; RACHMILEWITZ, D. Ketotifen inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 105, p. 701-707, 1993.

QUELETTE, A. J. Paneth Cells and Innate Immunity in the Crypt Microenvironment. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1779-1784, 1997.

RACUSEN, L. C.; BINDER, H. J. Effect of prostaglandins on ion transport across isolated colonic epithelium. **Dig. Dis. Sci.**, v. 25, p. 900-904, 1980.

RAITHEL, M.; SCHENEIDER, H. T.; HAHN, E. G. Effect of substance P on histamine secretion from gut mucosa in inflammatory bowel disease. **Scand. J. Gastroentero.**, v. 34, p. 496-503, 1999.

REINECKER, H. C.; MACDERMOTT, R. P.; MIRAU, S.; DIGNASS, A.; PODOLSKY, D. K. Intestinal epithelial cells both express and respond to Inteleukin 15. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1706-1713, 1996.

RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of macrophage neutrophil chemotactic factor. **J. Exp. Pathol.**, v. 71, p. 717-725, 1990.

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RIOUX, K. P.; WALLACE, J. L. Long-term antigen challenge results in progressively diminished mucosal mast cell degranulation in rats. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1516-1523, 1996.

ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 77, p. 761-767, 1979.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J. Protection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROCHA, M. F. G.; MAIA, M. E. T.; BEZERRA, L. R. P. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. *Clostridium difficile* Toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha, and leucotrienes. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 7, p. 2740-2746, 1997.

ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; FLORES, C. A.; STEINER, T. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory factor released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin-1 β . **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4910-4919, 1998.

ROCHA, M. F.; SIDRIM, J. J.; SOARES, A. M.; JIMENEZ, G. C.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. Supernatants from macrophages stimulated with microcystin-LR induce electrogenic intestinal response in rabbit ileum. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 87, n. 1, p. 46-51, 2000.

ROTHENBERG, M.E.; MISHRA, A.; BRANDT, E.B.; HOGAN, S.P. Gastrointestinal eosinophils. **Immunol. Rev.**, v. 179, p.139-155, 2001.

ROTHWELL, T. L. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. **Int. J. Parasitol.**, v. 19, 139-168, 1989.

RUMSAENG, V.; METCALFE, D. D. Asthma and food allergy. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 1 pt. 2, p. S153-S160, 1998.

_____. Food allergy. **Semin. Gastrointest. Dis.**, v. 7, p. 134-143, 1996.

SABRÁ, A.; DEL CASTILLO, R.; SABRÁ, S.; MADI, K. Alergia Alimentar nos Temas de Pediatria nº 59 , **Nestlé - Serviço de Informação Científica**, 1995.

SAKAMOTO, C. Roles of COX1 and COX2 in gastrointestinal pathophysiology. **J. Gastroenterology**, v. 33, p. 618-624, 1998.

SAMPSON, H. A. Food allergy. **JAMA**, v. 278, n. 22, p. 1888-1894, 1997.

SANDERSON I. Nutrição e expressão dos genes. In: NESTLÉ. **Doença Inflamatória Intestinal**. 1999. p.23-24. (Nestlé Nutrition Workshop Series Clinical & Performance Programme nº 2).

SANDERSON, I. R. Nutrition and gene expression. *In*: WALKER, W. A.; WATKIN, J. A. (Eds.). **Nutrition in pediatrics**. 2nd ed. New York: B.C Decker, 1997. p. 213-232.

SANTOS NETO, M. S.; SILVA, A. C.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. O sobrenadante de macrófagos estimulados com a toxina A do *Clostridium difficile* reduz a absorção de água e eletrólitos no modelo *in vivo* de perfusão intestinal de rato. In: REUNIÃO ANUAL DA FesBE, 11., 1996. **FesBE 1996**. 12.079, p. 203.

SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v. 106, p. 533-539, 1994.

SARTOR, R. B.; CHAPMAN, E. J.; SCHWAB, J. H. Increased interleukin-1 β concentrations in resected inflammatory bowel disease (IBD) tissue. **Gastroenterology**, v. 94, p. A399, 1988.

SARTOR, R. B. Mucosal Immunology and Mechanisms of Gastrointestinal Inflammation. In: FELDMAN, F.; FRIEDMAN, L.; SLEISENGER, M. **Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management**. 7. ed. New York: Saunders, 2002. v. 1, cap. 2, p. 21-51.

SCHMIDT, M.; RÜMENAPP, U.; BIENEK, C.; KELLER, J.; VON EICHELSTREIBER, C.; JACOBS, K. H. Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 2422-2426, 1996.

SCOTT, R. B.; GALL, D. G.; MARIC, M. Mediation of food protein-induced jejunal smooth muscle contraction in sensitized rats. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 22, p. 6-14, 1990.

SCOTT, R. B.; TAN, D. T. M.; MIAMPAMBA, M.; SHARKEY, K. A. Anaphylaxis-induced alterations in intestinal motility: role of extrinsic neural pathways. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. G812-G821, 1998.

SCHREIBER, S.; RAEDLER, A.; STENSON, W. F.; MACDERMOTT, R. P. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 21, p. 451-502, 1992.

SPILLER, R. C. Effects of serotonin on intestinal secretion and motility. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 99-103, 2001.

STADNYK, A. W.; WATERHOUSE, C. C. M. Epithelial cytokines in intestinal inflammation and mucosal immunity. **Cur. Opin. Gastroenterol.**, v. 13, p. 510-517, 1997.

SEDER, R. A.; MOSMANN, T. M. Differentiation of effector phenotypes of CD4+ and CD8+ T cells. In: PAUL, W. E. (Ed.) **Fundamental Immunology**, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p. 879-908.

SEDGWICK, J. B.; BUSSE, W. B. Histamine regulation of granulocyte function. In: ROCKLIN, R. S. **Histamine and H2 antagonists in inflammation and immunodeficiency**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 107-136.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of COX2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SENO, H.; SAWADA, M.; FUKUZAWA, H.; MORITA-FUJISAWA, Y.; TAKAISHI, S.; HIAI, H.; CHIBA, T. Involvement of tumor necrosis factor alpha in intestinal epithelial cell proliferation following Paneth cell destruction. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 37, n. 2, p. 154-160, 2002.

SHANAHAN, F.; DENBURG, J. Á.; FOX, J.; BIENENSTOK, J.; BEFUS, A. D. Mast cell heterogeneity. Effects of neuroenteric peptides on histamine release. **J. Immunol.**, v. 135, p. 1331-1337, 1985.

SHIDA, T. A comparison of the pharmacological actions between DSCG (disodium cromoglycate) and BDP (beclomethasone dipropionate) in the treatment of bronchial asthma. **Nippon Rinsho**, v. 54, n. 11, p. 3011-3016, 1996.

SHIMIZU, T.; BEIJER, E.; RYD, W.; STRANDVIK, B. Leukotriene B4 and C4 generation by small intestinal mucosa in children with coeliac disease. **Digestion**, v. 55, n. 4, p. 239-242, 1994.

SIGAL, L. H.; RON, Y. **Immunology and inflammation** – basic mechanisms and clinical consequences. New York: McGraw-Hill, 1994.

SMITH, P. L.; CHIOSSONE, D. C.; MCCAFFERTY, G. P. Characterization of LTC4 effects on rabbit ileal mucosa in vitro **Arch. Pharmacol.**, v. 341, p. 94-100, 1990.

SMITH, P. L. Effects of the neuroimmune mediators, peptidoleukotrienes, endothelin, and interleukin-1 on intestinal ion transport. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 664, p. 260-274, 1992.

SNYDER, F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. C697-C708, 1990.

SORENSEN, R. U.; PORCH, M.C. Alergia e infecção. In: SEMINÁRIO NESTLÉ NUTRITION, 45., 2001. **Nutrição, imunidade e infecção da infância.**

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SOUZA, M. H. L. P.; MELO-FILHO, A. A.; ROCHA, M. F. G.; LYERLY, D. M.; CUNHA, F. Q.; LIMA, A. A. M.; RIBEIRO, R. A. The involvement of macrophage-derived tumor necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. **Immunology**, v. 91, p. 281-288, 1997.

SPLANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 4, p. 622-647, 1992.

STACK, W. A.; KEELY, S. J.; O'DONOGHUE, D. P.; BAIRD, A. W. Immune regulation of human colonic electrolyte transport *in vitro*. **Gut**, v. 36, p. 395-400, 1995.

STAHL, F.; GARUS, H.J.; LEPPLE-WIENHUES, A.; WIEDERHOLT, M. Effect of histamine on the membrane potential of cultured human nonpigmented ciliary epithelial cells. **Ger. J. Ophthalmol.**, v. 1, n. 1, p. 62-66, 1992.

STEAD, R. H.; TOMIOKA, M.; QUINONEZ, G.; SIMON, G. T.; FELTEN, S. Y.; BIENENSTOCK, J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 2975-2979, 1987.

STENTON, G. R.; VLIAGOFTIS, H.; BEFUS, A. D. Role of intestinal mast cell in modulating gastrointestinal pathophysiology. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 81, p. 1-15, 1998.

STOK, W.; VAN DER HEIJDEN, P. J.; BIANCHI, A. T. Conversion of orally induced suppression of the mucosal immune response to ovalbumin into stimulation by conjugating ovalbumin to cholera toxin or its B subunit. **Vaccine**, v. 12, n. 6, p. 521-526, 1994.

SUDO, N.; SAWAMURA, S.; TANAKA, K.; AIBA, Y.; KUBO, C.; KOGA, Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an production system fully susceptible to oral tolerance induction. **J. Immunol.**, v. 159, p. 1739-1745, 1997.

TABATA, Y.; INOUE, Y.; IKADA, Y. Size effect on systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of biodegradable microspheres. **Vaccine**, v. 14, n. 17-18, p. 1677-1685, 1996.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.**, v. 246, p. C1-C9, 1984.

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G. H.; GOEDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. **Cell**, v. 74, p. 845-853, 1993.

TATEISHI, H.; MITSUYAMA, K.; TOYONAGA, A.; TOMOYOSE, M.; TANIKAWA, K. Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. **Digestion**, v. 58, n. 3, p. 271-81, 1997.

TAYLOR, S. L.; LEMANSKE, R. F.; BUSH, R. K.; BUSSE, W. W. Food allergens: structure and immunologic properties. **Ann. Allergy**, v. 59, p. 93-99, 1987.

TRACEY, K. J.; CERAMI, F. A tumor necrosis factor: an update review of its biology. **Crit. Care Med.**, v. 21, p. S415-422, 1993.

TERANO, A.; OTA, S.; MACH, T.; HIRAISHI, H.; STACHURA, J.; TARNAWSKI, A.; IVEY, K. J. Prostaglandin protects against taurocholate-induced damage to rat gastric mucosal cell culture. **Gastroenterology**, v. 92, p. 669-677, 1986.

TERPEND, K.; BOISGERAULT, F.; BLATON, M. A.; DESJEUX, J. F.; HEYMAN, M. Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon- γ . **Gut**, v. 42, p. 538-545, 1998.

THEODOROU, V.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Integrative neuroimmunology of the digestive tract. **Vet. Res.**, v. 27, p. 427-442, 1996.

THEODOROU, V.; EUTAMENE, H.; FIORAMONTI, J.; JUNIEN, J. L.; BUENO, L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: Involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1493-1500, 1994.

THIVIERGE, M.; STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. **J. Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2855-2860, 2001.

THOMSON, A. B. R.; CYRTA, E. J.; FARIA, J.; WILD, G. E. The Small bowel. **Curr. Gastroenterol.**, v. 17, p. 83-111, 1997.

TREVETHICK, M. A.; OAKELY, I.; CLAYTON N. M., STRONG, N. M. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage in experimental animals: Unerlying pathological mechanism. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, p. 1455-1459, 1995.

TRICHARD, C.; PAILLIERE-MARTINOT, M. L.; ATTAR-LEVY, D.; RECASSENS, C.; MONNET, F.; MARTINOT, J. L. Binding of antipsychotic drugs to cortical 5-HT_{2A} receptors: a PET study of chlorpromazine, clozapine, and amisulpride in schizophrenic patients. **Am. J. Psychiatry.**, v. 155, p. 505-508, 1998.

TROMP, S. C.; TALGELDER, G. J.; SLAAF, D. W.; RENEMAN, R. S.; VAN VELZEN, S.; ENGLS, W.; VAN BREDA, E.; oude EGBRINK, M. G. The role of mast cells and histamine in leukocyte-endothelium interactions in four rat strains. **Pflugers Arch.**, v. 436, n. 2, p. 255-261, 1998.

TSUCHIYA, K.; SAKAMOTO, Y. Leukotriene D₄ upregulates eosinophil adhesion via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, n. 4, p. 676-678, 2002.

TSUME, Y.; TAKI, Y.; SAKANE, T.; NADAI, T.; SEZAKI, H.; WATABE, K.; KOHNO, T.; YAMASHITA, S. Quantitative evaluation of the gastrointestinal absorption of protein into the blood and lymph circulation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 19, n. 10, p. 1332-1337, 1996.

VAN HALTEREN, A. G. S.; VAN DER CAMMEN, M. J. F.; BIEWENGA, J.; SAVELKOUL, H. F. J.; KRAAL, G. IgE and mast cell responses on intestinal allergen exposure: A murine model to study the onset of food allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 99, p. 94-99, 1997.

VARELLAL, P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VOLKMAN, A. Disparity in origin of mononuclear phagocyte populations. **J. Reticuloend. Soc.**, v. 19, p. 249, 1976.

VOLOVITZ, B.; TABACHNIK, E.; NUSSINOVITCH, M.; SHTAIF, B.; BLAU, H.; GIL-AD, I.; WEIZMAN, A.; VARSANO, I. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, reduces the concentration of leukotrienes in the respiratory tract of children with persistent asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 104, p. 1162-1167, 1999.

WADEE, W. W.; ANDERSON, R.; SHER, R. In vitro effects of histamine on eosinophil migration. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 63, p. 322-329, 1980.

WALLACE, J. L.; MCKNIGHT, W.; MIYASAKA, M.; TAMATANI, T.; PAULSON, J.; ANDERSON, D. C.; GRANGER, D. N.; KRIBES, P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. G993-G998, 1993.

WANG, J. P.; CHEN, Y. H.; KUO, S. C. Inhibition of hind-paw edema and cutaneous vascular plasma extravasation by 2-chloro-3-methoxy-carbonylpropionamido-1,4-naphthoquinone (PPIDI) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 354, p. 779-784, 1996.

WASERMAN, S.; DOLOVICH, J.; CONWAY, M.; MARSHALL, J. S. TNF-alpha dysregulation in asthma: relationship to ongoing corticosteroidtherapy. **Can. Respir. J.**, v. 7, n. 3, p. 229-237, 2000.

WASSERMAN, S. I.; BARRETT, K. E.; HUOTT, P. A.; BEUERLEIN, G.; KAGNOFF, M. F.; DHARMSATHAPHORN, K. Immune-related intestinal Cl⁻ secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. C53-C62, 1988.

WELLER, P. F. The immunobiology of eosinophils. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1110-1118, 1991.

WERSHIL, B. K.; CASTAGLIUOLO, I.; POTHOUAKIS, C. Direct evidence of mast cell involvement in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice. **Gastroenterology**, v. 114, n. 5, p. 956-964, 1998.

WESTERHOLM-ORMIO, M.; GARIOCH, J.; KETOLA, I.; SAVILAHTI, E. Inflammatory cytokines in small intestinal mucosa of patients with potential coeliac disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 128, n. 1, p. 94-101, 2002.

WILHELM, D. L. The mediation of increased vascular permeability in inflammation. **Pharmacol. Rev.**, v. 14, p. 251-280, 1962.

WOERLY, G.; ROGER, N.; LOISEAU, S.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, A.; CAPRON, M. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma). Inhibition by immunoglobulin A complexes. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 487-496, 1991.

WOLF, C.; SCHUNACK, W. Synthesis and pharmacology of combined histamine H1-/H2-receptor antagonists containing difenidramina and cyproheptadine derivatives. **Arch. Pharm.**, v. 329, p. 87-94, 1996.

WOOD, J. D. Enteric nervous system, serotonin, and the irritable bowel syndrome, **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 91-97, 2001.

YAMAMOTO, S.; KIYONO, H.; YAMAMOTO, M.; IMAOKA, K.; FUJIHASHI, K.; VAN GINKEL, F. W.; NODA, M.; TAKEDA, Y.; MCGHEE, J. R. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2 type responses for enhanced mucosal immunity. **Proc. Natl. Acad. Sei. USA.**, v. 94, n. 10, p. 5267-5272, 1997.

YAMAKI, K.; THORTACIUS, H.; XIE, X.; LINDBOM, L.; HEDQVIST, P.; RAUND, J. Characteristics of histamine-induced leucocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, n. 3, p. 390-399, 1998.

YEH, S. Y.; DERSCH, C.; ROTHMAN, R.; CADET, J. L. Effects of antistamines on 3, 4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of serotonin in rats. **Synapse**, v. 33, n. 3, p. 207-217, 1999.

YU, L. C. H.; PERDUE, M. H. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. **Immunol. Rev.**, v. 179, p. 61-73, 2001.

ZUANY-AMORIM, C.; CRÉMINON, C.; NEVERS, M. S.; NAHOR, I. M. A.; VARGAFTIG, B. B.; PRETOLANI, M. Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4⁺ T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity. **J. Immunol.**, v. 157, n. 1, p. 377-384, 1996.

ZUANY-AMORIM, C.; CORDEIRO, R. S.; VARGAFTIG, B. B. Involvement of leukotrienes in allergic inflammation in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 257, n. 3, p. 211-218, 1994.

ZURAWSKI, G.; DE VRIES, J. E. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. **Immunol. Today**, v. 15, p. 19-26, 1994.