

Mariléia Chaves Andrade



**Participação da reação de
hipersensibilidade imediata no
desencadeamento da aversão à ingestão de
clara de ovo em camundongos imunizados
com ovalbumina**

Dissertação apresentada ao
departamento de Bioquímica e
Imunologia como pré-requisito
para obtenção do título de mestre

Orientadora: Denise Carmona Cara Machado

Co-orientador: Nelson Monteiro Vaz

1999

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPEMIG, PRPq-UFMG.

`A Denise, em todas as suas versões,
Chefe, Orientadora e
principalmente Amiga, que me acolheu
com carinho de Mãe e me enriqueceu
a cada dia com seus ensinamentos
científicos e pessoais. Nossos
caminhos não se cruzaram por acaso.

À minha mãe, pela força em forma de Mulher, capaz de superar todas as dificuldades com a maior dignidade;

Aos meus irmãos, pelas palavras amigas, pelo aprendizado adquirido em todos esses anos, e por contribuírem para minha formação como ser humano. Devo à vocês tudo o que sou;

Aos meus "filhos", Buick e Vick, que compreenderam minhas longas ausências e sempre me receberam com um olhar doce, terno e verdadeiro.

Agradecimentos

Uma vida não se constrói sozinha. Quero agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente, estiveram envolvidas na construção da minha vida científica:

À Denise pelo imenso aprendizado científico, por respeitar a minha legitimidade, pela convivência infinitamente prazerosa e principalmente pela amizade, o meu mais comovido agradecimento;

Ao Prof. Nelson Vaz, por me abrir as portas da ciência e por iniciar um trabalho tão fascinante cujo tema nos envolveu e nos levou a dar continuidade;

A vida nos reserva gratas surpresas. Tenho imenso prazer de ter conhecido uma pessoa que é uma das responsáveis por eu estar desenvolvendo este trabalho:

À você Ju, que é pura emoção, que se envolve com o trabalho de todos, que com uma competência fenomenal consegue tocar o nosso laboratório, e que além de tudo é uma grande amiga, o meu agradecimento mais carinhoso;

Agradeço a Ana, pela figura humana, pela poetisa, pelo exemplo de profissionalismo, pela genialidade científica, que mesmo longe nos enriquece com contribuições teóricas e práticas;

Farei uma dedicação a cada amiga(o) do Laboratório de Imunobiologia demonstrando o meu imenso agradecimento pelo companheirismo nos experimentos trabalhosos, respeito pelo trabalho alheio, e principalmente pelo prazeroso convívio:

Ao Alysson, a loucura que nos diverte, a eficiência tão importante, a vontade de estar aprimorando e conhecendo cada vez mais;

À Bia Senra, por suas gargalhadas gostosas e seu jeito exótico de ser que tanto nos divertiu;

À Elaine, uma pessoa singular, de uma perseverança admirável e uma vontade de viver a ciência que comove, obrigada por sua amizade e pelos elogios dispensados a minha pessoa;

À Família Marçal, Ildinha e Ilma, por cuidarem do nosso LIB com tanto carinho, e por nos incluírem como membros da sua família;

À Frank, palavras como competência, dinamismo, companheirismo são alguns dos seus atributos. Obrigada por tudo;

À Michele, pelo seu olhar doce, pela sua amizade, pela sua disponibilidade em ajudar, por tanta sintonia que há entre nós duas e que você faz questão de manter;

À Sabine, pelas nossas longas conversas sobre imunologia, religião, relacionamentos, cachorros, etc... nas gostosas caronas de volta pra casa nos finais de tarde e noite;

À Vanessa, pela competência profissional, pela amizade verdadeira e pelo carinho com que sempre me tratou;

À Virlânia, que mesmo com pouco contato nos últimos tempos, preenche o nosso LIB com seu jeito "tenso" de ser;

Às duas pessoas que estiveram diretamente envolvidas no meu trabalho:

Ana Carla Finelli, que desenvolveu toda parte histológica e,

Bruno França, que me acompanhou em toda parte experimental, o meu agradecimento consciente de que essa tese também pertence a vocês;

Ao Bruno Verdolin e Aurelizia Xavier, que apesar da convivência restrita ultimamente, continuam presentes em nossas lembranças;

À Valéria, Claudinha, Soraia e Cida que apesar de não dividirmos o espaço físico sempre farão parte da nossa grande família;

Ao laboratório do Professor Cristiano Gontijo, com um agradecimento especial à Flávia Márcia: "Todos somos um só";

À Celise, pelo apoio fundamental na parte burocrática;

Ao André Klein, pela amizade recente e verdadeira, pela análise crítica de parte desta tese, com dicas importantes que tanto contribuíram na elaboração da mesma;

Aos meus verdadeiros amigos da graduação Heltão, Júnior, Alexandre, Wendell, Cecília, Inessa, Paulinha, Guilherme, Marcelo, Adalberto, Renatinha, dentre outros: Toda amizade verdadeira faz parte de uma duradoura estória; já fazem 7 anos que começamos a construir a nossa;

Aos amigos do Curso de "Bases", Aldinha, Hélia, Dani, Ju Pimenta, Analina, Rê, Magdinha, Ana Paula, Stefânia, Luíza, Sabine, Fernanda e André Talvani. Sofremos juntos e isso fortaleceu a nossa amizade.

Aos amigos do Teatro, especialmente ao Zé Lúcio, por fazerem da arte uma estória a mais na minha vida, contada de maneira tão criativa e prazerosa;

Ao Wagner Tafuri, um agradecimento especial pela valiosa amizade e pelas fotos tiradas com tanto esmero;

Ao Alvinho e Ricardo pelas novas amizades conquistadas nesse ano;

A todos do Departamento de Patologia Geral - ICB, por me receberem com tanto carinho e pelos materiais utilizados no desenvolvimento dessa dissertação;

Ao laboratório de Gnotobiologia do ICB, por cederem os animais isentos de germes, especialmente à Jacqueline Alvarez-Leite por acreditar em nosso trabalho, e à Mariana Gontijo pela ajuda experimental;

Ao Departamento de Imunofarmacologia, por ceder a biotina e pela ajuda na técnica de biotinilação da ovalbumina;

À Sônia Jancar, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), pelas dicas fundamentais na organização geral dos resultados;

"...Aprendi que se depende sempre
De tanta muita gente
Toda pessoa é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas

É tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá
É tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho
Por mais que pense estar..."

Caminhos do Coração, **Gonzaguinha**

Sumário

Introdução	1
1.1. Seleção de dietas	2
1.1.1. Fatores Comportamentais	2
1.1.2. Fatores Biológicos	3
a. equilíbrio nutricional	3
b. idade	5
c. sexo	6
d. fatores hormonais	6
e. neurotransmissores	6
1.1.3. Fatores Patológicos	8
a. distúrbios digestivos	8
b. câncer	8
c. doenças renais	9
d. transplantes de medula	10
1.2. Sistema imune e seleção de dietas	10
1.3. Alergia	15
1.3.1. Tolerância Oral	16
animais isentos de germes	17
animais idosos	18
variações no protocolo de exposições orais do antígeno	18
Objetivos	20
Material e Métodos	22
3.1. Animais	23
3.1.1. Procedência, Manejo e Manutenção dos Camundongos GF	23
3.2. Antígeno	24
3.3. Tratamento Imunogênico	24
3.4. Tratamento Tolerogênico	25
3.5. Consumo do antígeno: Teste de Aversão	25
3.6. Sangria e Obtenção do soro	27
3.7. Titulação dos anticorpos no soro	27
3.7.1. anticorpos totais	27
3.7.2. isotipos dos anticorpos anti-Ova.....	28
3.7.3. dosagem de IgE	28
3.8. Coleta do muco intestinal	29
3.9. Medida de IgA secretória	30
3.10. Indução e avaliação do aumento de permeabilidade vascular	30
3.11. Análise morfológica da aversão	32
3.11.1. Necrópsia e confecção de lâminas	32
3.11.2. Colorações de rotina	33
3.11.3. Morfometria	33
3.12. Análise Estatística	33
3.13. Soluções utilizadas	34

Resultados	36
4.1. Avaliação do consumo do antígeno	37
4.1.1. Consumo de clara opcional	37
4.1.2. Consumo de clara não opcional	37
4.2. Manutenção da aversão nos animais imunes	39
4.3. Produção de IgA no muco intestinal após o teste de aversão	41
4.4. Variações no protocolo de indução da tolerância oral e desencadeamento da aversão à ingestão de clara	42
4.5. Correlação entre produção de anticorpos específicos no soro e ingestão de clara.....	44
4.5.1. Anticorpos totais	44
4.5.2. Padrão isotípico no soro antes do teste de consumo de clara	45
a. IgM	46
b. IgG1	46
c. IgG2a	47
d. IgG2b	48
e. IgG3	49
f. IgA.....	49
g. IgE.....	50
4.6. Resposta Alérgica	51
4.7. Avaliação morfológica	54
Após 2 horas de ingestão de clara opcional	54
Após 24 horas de ingestão de clara opcional e não opcional por camundongos convencionais.....	54
Após 24 horas de ingestão de clara opcional e não opcional por camundongos isentos de germes (GF).....	55
4.8. Avaliação morfométrica	60
Discussão	61
5.1. Importância do status imunológico na aversão à ingestão de clara	62
5.2. Artíficos biológicos e aversão à ingestão de clara	64
5.2.1. Tolerância oral	64
5.2.2. Envelhecimento e ausência da flora intestinal	64
5.3. Avaliação da presença de IgE no tecido	69
5.4. Aversão impediu o desencadeamento de lesão no intestino dos animais sensibilizados	72
5.5. Possível controle da inflamação nos animais que evitaram a clara	76
5.6. Uma proposta de mecanismos envolvidos na aversão à ingestão de clara.....	78
Conclusões	80
Referências Bibliográficas	82

Lista de Figuras

Figura 1.1- Títulos de anticorpos anti-Ova e ingestão de clara de ovo adocicada	14
Figura 3.1 - Protocolo Experimental Básico- Consumo opcional de clara	26
Figura 3.2- Protocolo do teste de permeabilidade vascular	32
Figura 4.1.1- Consumo opcional de clara de ovo	38
Figura 4.1.2- Consumo não opcional de clara de ovo	38
Figura 4.2- Cinética do consumo de clara adocicada durante 10 dias em animais CVj e CVi	40
Figura 4.3- Título de IgA total no muco intestinal	42
Figura 4.4- Correlação entre produção de anticorpos totais anti-Ova e consumo de clara adocicada em animais CVj submetidos a diferentes tratamentos tolerogênicos.....	43
Figura 4.5.1- Correlação entre produção de anticorpos totais e ingestão de clara	45
Figura 4.5.2.a- Produção de anticorpos IgM	46
Figura 4.5.2.b- Produção de anticorpos IgG1	47
Figura 4.5.2.c- Produção de anticorpos IgG2a	48
Figura 4.5.2.d- Produção de anticorpos IgG2b	48
Figura 4.5.2.e- Produção de anticorpos IgG3	49
Figura 4.5.2.f- Produção de anticorpos IgA	50
Figura 4.5.2.g- Produção de anticorpos IgE	50
Figura 4.6.1- Permeabilidade vascular à albumina plasmática corada pelo azul de Evans em animais GFj normais, tolerantes e imunes	52
Figura 4.6.2- Permeabilidade vascular à albumina plasmática corada pelo azul de Evans em animais CVj normais, tolerantes e imunes	52
Figura 4.6.3- Permeabilidade vascular à albumina plasmática corada pelo azul de Evans em animais CVi normais, tolerantes e imunes	53
Figura 4.7.1. Fotomicrografia da língua de camundongos CVj	56
Figura 4.7.2- Fotomicrografia do duodeno de camundongos CVj após 2 horas de consumo opcional de clara.....	57

Figura 4.7.3- Fotomicrografia do duodeno de camundongos CVj após 24 horas de consumo opcional e não opcional de clara	58
Figura 4.7.4- Fotomicrografia do duodeno de camundongos GFj após 24 horas de consumo opcional e não opcional de clara	59
Figura 4.9- Análise morfométrica das porções do intestino de animais CVj	60

Resumo

Em vida livre, o modo como um animal seleciona sua dieta é um tema bastante complexo. Na literatura são descritos diversos fatores agrupados em comportamentais, biológicos e patológicos, que podem interferir nesse processo. Como o contato diário de macromoléculas da dieta com a mucosa intestinal pode ter várias repercussões imunológicas, é possível que o sistema imune também esteja interferindo na escolha alimentar de um animal. Já havia sido descrito que animais imunizados com ovalbumina que tiveram opção de escolher entre ingerir uma solução de clara de ovo adocicada ou água, rejeitaram a solução que continha o antígeno ao qual eles foram imunizados, ao contrário dos animais normais. Como essa resposta comportamental coincidiu com o aumento dos títulos de anticorpos específicos no soro, a proposta deste trabalho foi verificar a possível participação da resposta de hipersensibilidade imediata na aversão à ingestão de clara de ovo induzida imunologicamente. Foi analisada a correlação entre títulos de anticorpos anti-ovalbumina, em especial IgG1 e IgE, e a aversão, em camundongos imunizados, normais e tornado tolerantes através de diversos protocolos de tolerância oral. Por interferirem na resposta tolerogênica, a ausência de flora intestinal, o envelhecimento e variações no protocolo de exposição oral do antígeno, foram utilizados como artifício biológico para a análise das correlações. Em todos os modelos experimentais utilizados (camundongos convencionais jovens-CVj, idosos-CVi e isentos de germes-GFj), observamos uma correlação entre presença de IgE específica no soro e desencadeamento da aversão à ingestão de clara. Essa correlação positiva foi também observada analisando a IgE no tecido, através de um teste funcional do aumento da permeabilidade vascular denunciada pelo extravasamento do azul de Evans. Em todos os modelos experimentais, a injeção sistêmica de ovalbumina resultou em maior quantidade do corante extravasado nas porções proximais do intestino, principalmente duodeno. Mesmo o intestino tendo se mostrado mais sensível que outros órgãos às intervenções sistêmicas do antígeno, a mucosa intestinal dos animais que tiveram opção de ingerir água ou clara durante 2 ou 24 horas, não apresentou qualquer alteração morfológica em GFj, CVj e CVi imunes comparados com normais e tolerantes. Mesmo quando os animais não tiveram outra opção líquida, a ingestão de clara de ovo só promoveu alterações patológicas discretas em camundongos GF (período de 24 h) ou camundongos convencionais (10 dias). Portanto, concluímos que, em animais sensibilizados, etapas iniciais da hipersensibilidade imediata podem desencadear alterações sensíveis na mucosa intestinal capazes de sinalizar para o sistema nervoso central a conseqüente ingestão de clara.

Lista de Abreviaturas e Siglas

- APC- células apresentadoras de antígeno
AV- altura das vilosidades
CTA- aversão condicionada ao sabor
CV- Convencional
DNCB- dinitroclorobenzeno
DTH- hipersensibilidade do tipo retardada
EAE- encefalomielite autoimune experimental
ECF-A- fator quimiotático para eosinófilo
E.L.I.S.A.- *Enzyme linked Immunosorbent Antigen*
ETM- espessura total da mucosa
ETM-AV- profundidade da cripta
FAE- epitélio associado ao folículo
FDC- células dendríticas foliculares
GALT- tecido linfóide associado ao intestino
GF- isento de germe
HEVs- vênulas de endotélio alto
IFN- interferon
Ig- imunoglobulina
IL- interleucina
i.p.- intraperitoneal
LPS- lipopolissacarídeo
MHC- complexo principal de histocompatibilidade
NCF-A- fator quimiotático para neutrófilo
OPD- ortofenileno-diamino
Ova- ovalbumina
PBS-salina tamponada com fosfato
PLC- fosfolipase C
s.c.- subcutâneo
SCID- imunodeficiência combinada grave
SCO- solução de clara de ovo
SRBC- eritrócitos de carneiro
TGF- transforming growth factor
Th-T-helper- linfócito T auxiliar
TNF- fator de necrose tumoral
TMA- *Trimellitic Anhydride*
TNF- fator de necrose tumoral

Introdução

Introdução

1.1. Seleção de dietas

A seleção de dieta, baseada na escolha livre de alimentos, é uma característica fundamental do comportamento e um fator determinante para a sobrevivência animal. Uma vez que animais são capazes de sobreviver e reproduzir na presença de uma variedade de condições alimentares e ambientais, a escolha alimentar tem que garantir essas condições por resultar em conteúdos nutricionais adequados e livres de substâncias tóxicas (RIBEIRO *et al.*, 1998). Na literatura, descrevem-se diversos fatores que podem interferir na preferência ou aversão a um alimento. Podemos agrupar esses fatores em: comportamentais, biológicos e patológicos.

1.1.1. Fatores Comportamentais

A interação do homem com o meio ambiente interfere ativamente na preferência por determinados alimentos. DACOSTA e WILSON (1996) demonstraram, por exemplo, que para muitos alimentos, preferências alimentares de jovens negras ainda refletem as preferências das mulheres negras mais velhas. Entretanto, estudando a seleção de dieta da prole de fêmeas de macaco *Rhesus*, que foram alimentadas com uma variação do conteúdo proteico da dieta durante o período pré natal, HILLMAN e RIOPELLE (1977) observaram que o padrão de seleção da mãe não interferiu no da prole.

Características inatas podem estar envolvidas na escolha ou aversão a um sabor. Muitos onívoros, incluindo ratos e humanos, têm uma tendência para aceitar sabores adocicados e evitar sabores amargos. Podemos associar esse comportamento com o fato de que, em geral, alimentos energéticos são adocicados e substâncias tóxicas são amargas. Essas preferências inatas são observadas em crianças, cujos testes são realizados logo após o desmame, em que expressões faciais demonstram rejeição para o sabor amargo e aceitação para o sabor doce (ROZIN, 1990).

Também, muitas vezes, a preferência ou aversão por um determinado alimento deriva de um aprendizado. Experimentalmente, o fato do animal entrar em contato com um determinado macronutriente antes de ser submetido à escolha alimentar, pode influenciar no comportamento alimentar. Ratos pré-expostos, quatro dias antes do teste, a uma dieta suplementada com carboidrato

ou proteína ou gordura, quando submetidos futuramente a uma escolha livre, apresentam um padrão de escolha específico ao nutriente previamente exposto. O grupo pré-tratado com proteína chega a comer quantidades maiores que os grupos pré-tratados com carboidrato ou gordura (REED *et al.*, 1992). KERN e colaboradores (1993) sugerem que essa aprendizagem pode estar relacionada com o benefício energético do alimento para o organismo. Em seus experimentos, quando crianças em jejum, que condicionadas a beber um iogurte saboroso rico em gordura, foram expostas posteriormente à dietas de conteúdo nutricional variado, preferiram uma dieta com alta densidade de gordura. Esses resultados demonstram que humanos têm capacidade de aprender sobre os efeitos dos alimentos ingeridos.

↘ Na área de estudo comportamental encontramos uma série de trabalhos sobre a aversão a um sabor adquirida por condicionamento. Nesses trabalhos, os autores relatam que se um sabor desconhecido, sacarina por exemplo, for oferecido a um animal concomitante a um estímulo digestivo indesejável (injeção com cloreto de lítio no peritônio), o animal passará a evitar esse sabor em uma nova exposição (GARCIA, 1985).

1.1.2. *Fatores Biológicos*

A seleção de dietas pode ter um papel fundamental para manter adequada a quantidade de substâncias importantes para o crescimento e desenvolvimento animal. Está bem descrito que a preferência por um dado nutriente pode refletir as necessidades orgânicas do animal por macro ou micronutrientes.

a. equilíbrio nutricional

Vários autores têm demonstrado que animais e humanos frente a multiplicidade de alimentos com composição variada de macronutrientes (proteína, gordura e carboidrato), exibem a capacidade de regular a proporção de proteína e carboidrato que consomem (ASHLEY e ANDERSON, 1975a,b; LEATHWOOD e ASHLEY, 1983 a,b; LIEBERMAN e WURTMAN, 1989). Essa necessidade de ingestão de nutrientes nos quais o animal está carente é denominado apetite específico.

DEUTSCH e colaboradores (1989) mostraram que ratas tratadas com uma dieta de quantidades proteicas abaixo do necessário durante a gravidez (4% de

proteínas do leite em vez de 12%), quando submetidas ao teste de escolha alimentar, já nos primeiros minutos preferiram uma dieta rica em proteína.

Quando se varia a quantidade de proteína da dieta, ratos Lou (VEYRAT-DUREBEX e ALLIOT, 1997) e Wistar jovens (ASHLEY *et al.*, 1979) selecionaram a dieta de modo a comerem quantidades relativamente constantes desse nutriente, necessárias para manter o crescimento em condições adequadas.

Não somente a quantidade da proteína interfere na seleção de dieta, mas também o seu estado ácido-base. Gatos adultos, adaptados a 3 tipos de dietas pouco proteicas mas que se diferenciam na natureza dos eletrólitos (ácidas, básicas e neutras), receberam ofertas de dietas que variavam na concentração desses eletrólitos. Os gatos escolheram preferivelmente uma dieta neutra ou neutra-a-básica, tendendo assim a restaurar ou manter a homeostase ácido-base para cada situação (COOK, 1996).

Ainda em experimentos realizados por DEUTSCH e colaboradores (1989), ratos privados de proteínas que não tiveram oportunidade de selecionar uma dieta proteica, quando futuramente expostos a diversas dietas escolheram uma proporção significativamente maior de várias proteínas como glúten, zeína, fibrina e ovalbumina se comparados com animais controles. Essa preferência não foi revertida pelo menos até a primeira meia hora do teste. Quando esses animais foram mantidos em uma dieta aromatizada artificialmente e posteriormente receberam esta mesma dieta ou outra de sabor novo, nos primeiros minutos houve uma preferência pela nova dieta mas depois eles mudaram e mantiveram o padrão de escolha para a dieta conhecida.

A tendência a equilibrar os micronutrientes na dieta também já foi verificada. Alguns experimentos demonstraram que ratos conseguem perceber pequenas modificações na concentração de um determinado aminoácido essencial e ajustam sua dieta de modo a restaurarem essa deficiência. MORI e colaboradores (1991) demonstraram que ratos privados do aminoácido lisina, com opção de escolher entre uma dieta contendo ou não L-lisina e uma solução palatável de glutamato monossódio, preferiram inicialmente a solução contendo o aminoácido do qual estavam deficientes. Mais tarde, eles trocaram a sua preferência para a solução saborosa de glutamato monossódio. Essa sensibilidade às mudanças na concentração de aminoácido na dieta foi também observada por HRUPKA e colaboradores (1997), utilizando treonina como aminoácido

limitante. Diante de dietas preparadas com pequenas quantidades a menos de treonina (de 0.003 até 0.012%) ou uma dieta controle (0.200%), os animais selecionaram contra as dietas com menor quantidade do aminoácido.

Foi também observado, em animais carentes, um apetite específico para nutrientes e vitaminas, que são essenciais para a manutenção do funcionamento do organismo. Um trabalho recente, realizado pelo grupo de SWEENEY (1998), demonstrou que a restrição de fosfato inorgânico (Pi) na dieta estimulou um apetite para Pi quando ratos Wistar jovens foram ofertados com uma solução aquosa de fosfato de potássio.

b.idade

O envelhecimento é acompanhado de modificações na escolha alimentar, principalmente com relação ao conteúdo proteico. KIM e colaboradores (1991), usando 3 dietas isocalóricas que variavam na quantidade de proteína e carboidrato, verificaram que, em ratos, o consumo de carboidrato foi constante durante todo o período do teste (9 semanas), mas que o de proteína foi dependente da idade, sendo pequeno durante a primeira semana e aumentando no decorrer do teste. Os autores demonstraram também, que houve uma variabilidade individual muito grande com a maturação. O mesmo pôde ser observado por YOKOGOSHI e colaboradores (1985), ao estudarem a preferência de ratos jovens (21 semanas) e idosos (50 semanas) para dietas com quantidades fixas de proteína (18%) e variáveis de carboidrato (15% ou 75%). Esses autores puderam observar que ratos jovens tendem a consumir quantidades similares de proteínas e carboidratos (proporção proteína: carboidrato - 0.29: 0.35), enquanto que nos idosos houve uma maior variabilidade individual, de modo que metade dos animais escolheram mais proteína com relação ao carboidrato, enquanto a outra metade manteve o padrão juvenil. VEYRAT-DUREBEX e ALLIOT (1997) demonstraram que a seleção de dietas em ratos Lou também variou com a maturação, mas nessa raça, o consumo de proteína foi diminuindo com a idade.

Em humanos também foi observado uma diferença no comportamento alimentar com relação à idade. Sob condições experimentais controladas, como mesma rotina alimentar, LIEBERMAN e WURTMAN (1989) demonstraram que, indivíduos jovens consumiram quantidades maiores de carboidrato e gordura, mas não de proteína, em comparação com indivíduos velhos.

c. *sexo*

LIEBERMAN e WURTMAN (1989) observaram uma diferença no consumo alimentar de acordo com o sexo, em que indivíduos do sexo masculino, independente da idade, consumiram mais proteínas que indivíduos do sexo feminino.

Sabe-se que durante o ciclo estral em ratos há um aumento da preferência por glicose e sacarina (KANAKA *et al.*, 1979). A hipótese para esta resposta gustatória diferencial pode estar ligada a níveis de hormônios ovarianos e da hipófise na época da ovulação. O comportamento alimentar é também modificado na gravidez. Na mulher, o início da gravidez é acompanhado por um mal estar e uma aversão a determinados alimentos. No primeiro trimestre, há uma modificação do limiar de sensibilidade do paladar que faz com que a gestante passe a achar desagradável cheiros e sabores que antes eram palatáveis. Segundo PROFET (1992), a náusea e o vômito do primeiro trimestre da gestação estão envolvidos na proteção do embrião contra uma ampla variedade de teratogênicos (toxinas que causam defeitos congênitos) e abortíferos (toxinas que induzem o aborto), abundantes em alimentos. A troca de preferência ao sabor também foi observada em ratas prenhes (WILSON, 1987). Há também uma mudança na preferência alimentar durante o ciclo menstrual, com um nítido aumento do consumo de fibras (DAVIES *et al.*, 1993).

d. *fatores hormonais*

TEMPEL e colaboradores (1993;1992) demonstraram que hormônios, como os corticosteróides da suprarenal, têm efeito seletivo no consumo de macronutrientes, e que uma excisão cirúrgica da glândula provoca redução no consumo de alimentos. Implantes de aldosterona e corticosterona no PVN hipotalâmico em ratos previamente adrenalectomizados, foram efetivos em estimular o consumo alimentar, sendo que, a corticosterona potencializou especificamente o consumo de carboidrato e a aldosterona o de gordura, sem nenhuma interferência no consumo de proteína (TEMPEL *et al.*, 1993).

e. *neurotransmissores*

TEMPEL e colaboradores (1988) também demonstraram a influência de neurotransmissores no consumo seletivo de macronutrientes. Em ratos

saciados, a injeção de galanina no PVN causou um aumento preferencial no consumo de dieta gordurosa, com um aumento significativamente menor no consumo de carboidrato, e nenhuma ingestão de proteína. Quando a dieta gordurosa foi removida, houve uma troca para o consumo seletivo de carboidrato.

Vários autores demonstraram que as proporções de proteína e carboidrato na dieta podem afetar a síntese e liberação de neurotransmissores, e estes podem ocasionar mudanças no organismo de modo a influenciarem o comportamento alimentar (FERNSTROM e WURTMAN, 1972; ASHLEY e ANDERSON, 1975b; WURTMAN e WURTMAN, 1979). A serotonina, ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT), é um neurotransmissor que vem sendo proposto estar relacionado com mudanças no consumo alimentar. Os níveis de serotonina no cérebro dependem dos níveis de triptofano no plasma, seu aminoácido precursor. O consumo de um alimento rico em carboidrato resulta em aumento dos níveis de triptofano no plasma com relação a outros aminoácidos (leucina, isoleucina, valina, tirosina e fenilalanina). Aumentando a captação de triptofano no cérebro, há um aumento da síntese de serotonina, que por algum mecanismo ainda desconhecido, controla o consumo alimentar. Já o consumo de um alimento rico em proteína provoca o inverso: há uma elevação dos níveis dos outros aminoácidos com relação ao triptofano. Como consequência, a síntese de serotonina é diminuída ou não alterada (LIEBERMAN e WURTMAN, 1989).

Alguns experimentos (ASHLEY, 1985) demonstraram evidências de que o consumo de proteína está relacionado com essas mudanças nos padrões de aminoácidos no plasma afetando o metabolismo de serotonina. Injeções sistêmicas de para-clorofenilalanina (p-CPA), uma droga que inibe a síntese de serotonina, ou injeções intraventriculares de uma neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT), causaram diminuição do consumo de proteína em ratos Wistar jovens. Outros mecanismos, que não aqueles mediados por serotonina, podem estar envolvidos no controle do consumo alimentar. KIM e colaboradores (1991) não encontraram correlação entre o nível de serotonina (5-HT) no cérebro, nem do seu metabólito 5-HIAA (YOKOGOSHI *et al.*, 1985) com o consumo de proteína e carboidrato.

1.1.3. Fatores patológicos

Tem sido descrito que em situações patológicas como câncer, transplantes de medula, distúrbios digestivos ou doenças renais, há uma mudança na preferência por alimentos.

a. distúrbios digestivos

RIBEIRO e colaboradores (1998) estudaram a preferência alimentar em ratos com função gastrointestinal prejudicada por tratamento cirúrgico (enterectomia) ou alimentação (mal nutridos), que tinham a possibilidade de escolher entre dietas contendo ou a proteína intacta (caseína), ou com diferentes graus de hidrólise, ou com uma mistura de aminoácidos simulando a composição da caseína. Eles demonstraram que nos dois primeiros dias do teste, todos os animais preferiram a dieta contendo caseína intacta. A partir do 2º dia, nos grupos enterectomizados e mal nutridos houve uma diminuição no consumo de caseína intacta e aumento do consumo da dieta com aminoácidos. Esses resultados sugerem que esses animais poderiam "reconhecer" suas dificuldades de ingestão e absorção e então optar por fontes mais facilmente absorvíveis. Já em animais com função gástrica normal, a capacidade para digerir e absorver nutrientes não é um fator limitante em termos de ingestão.

b. câncer

Mudanças na percepção do paladar em pacientes que sofrem de câncer foi relatada por vários autores (AMES *et al.*, 1993; DeWYS e WALTERS, 1975; BARTOSHUK, 1990). DeWYS e WALTERS observaram que é frequente a diminuição da sensibilidade do limiar ao sabor adocicado e o aumento da sensibilidade ao sabor amargo em pacientes com diferentes tipos de câncer, e que quanto mais grave o tumor maior a sensibilidade ao sabor amargo. Essas anormalidades do paladar podem ser importantes na perda de peso e consequente desenvolvimento de caquexia observada nesses pacientes.

Já nos estudos conduzidos por AMES e colaboradores (1993), não foi observada diferença na sensibilidade ao sabor adocicado entre pacientes com câncer de mama e pacientes normais quando foi oferecido a eles açúcar, tanto em solução aquosa quanto em forma de alimento. Entretanto, indivíduos com

câncer comeram menos que indivíduos normais, havendo diferença no consumo de energia total por afetar o consumo de vários nutrientes, tanto macro (proteína e gordura) como micro (cálcio, fosforo e zinco).

A introdução de uma nova dieta durante o crescimento de um tumor pode resultar em severas aversões ao alimento específico, interferindo diretamente na seleção de dietas. TRENEER e BERNSTEIN (1987), verificaram que, mesmo removendo células do tumor de Leydig em ratos Wistar que haviam desenvolvido uma forte aversão a uma nova dieta consumida durante o crescimento do tumor, os animais continuaram apresentando aversão por um período de 4 a 25 dias. Da mesma forma que o crescimento de um tumor pode ser importante na seleção de dietas, foi observado que a dieta pode também influenciar o crescimento de tumores resultantes de transplantes, reduzindo-os ou até mesmo retardando-os. ZHANG e colaboradores (1997) demonstraram que ratos com uma determinada neoplasia, quando supernutridos com uma dieta rica em selênio (Se), sobreviveram mais que ratos neoplásicos alimentados com uma dieta normal. É sabido que um nível muito alto de danos no DNA ocorre durante o metabolismo normal, e que a deficiência de micronutrientes que protegem contra esses danos é a principal contribuição para o desenvolvimento do câncer em humanos. Uma dieta com baixos teores de agentes mitogênicos diminui a incidência de câncer (SHIGENAGA e AMES, 1993).

c. doenças renais

A capacidade em identificar a presença de sal na dieta é descrita como uma característica inata de humanos (HURLEY *et al.*, 1987) e ratos (RICHTER, 1943). Isso implica que uma fome específica para sal existe quando uma necessidade fisiológica está presente. Entretanto, estudos em humanos que não tenham uma necessidade específica, geralmente suportam a teoria que o apetite ao sal é aprendido (MATTESS, 1984). Por exemplo, pacientes com doenças renais apresentaram um aumento da sensibilidade ao sabor salgado, principalmente depois do tratamento com hemodiálise (FERNSTROM *et al.*, 1996; FARLEIGH *et al.*, 1987; DOBELL *et al.*, 1993), e ao sabor amargo após tratamento com diálise peritoneal (FERNSTROM *et al.*, 1996; DOBELL *et al.*, 1993). DOBELL também verificou uma aversão relativa a alimentos doces nos pacientes com deficiência renal crônica. PATEL (1998) verificou que a intervenção da dieta teve grande

importância no ganho de peso de pacientes após esses serem submetidos ao transplante renal.

d. transplantes de medula

Uma outra situação clínica de interesse é a modificação no paladar que ocorre nos primeiros meses após transplante de medula alogênica. A maioria dos pacientes se queixa do aumento ou da diminuição da sensibilidade ao sabor salgado e ácido, durante a fase aguda da reação enxerto vs. hospedeiro. Outros relatam completa augesia. Os pesquisadores não correlacionam as alterações do paladar com a severidade das lesões na mucosa oral (MARIONE *et al.*, 1991). VAJKOCZY e colaboradores (1997) demonstraram que a dieta pode ter grande importância nos xenotransplantes. Eles observaram que a suplementação de vitamina E na dieta de ratos melhorou a resposta angiogênica e neutralizou a rejeição microvascular depois do xenotransplante de ilhotas pancreáticas.

1.2. Sistema imune e seleção de dietas

Se a atividade do sistema imune for vista como uma rede interconectada de relações (idiotípicas) entre linfócitos, como propôs JERNE em 1974, os eventos iniciados no tecido linfóide intestinal estarão ligados a todos os demais eventos imunológicos e influenciarão seu desenrolar (CARA, 1995). A mucosa intestinal representa a maior área de contato do organismo com o meio externo (300-400 m² no ser humano adulto contra 4,5 m² da pele) e é estimulada diariamente com uma quantidade enorme de antígenos derivados da alimentação. Deste modo, a dieta representa uma fonte muito importante de interferências na atividade imunológica, de tal forma que o tipo de alimento e a quantidade ingerida poderão ter repercussões variadas no organismo. (A variedade de reações imunes que pode ocorrer em seguida à absorção do antígeno pelo epitélio intestinal depende da natureza do antígeno, da via de entrada pelo organismo e da história imunológica do indivíduo (NICKLIN, 1987).) Frequentemente, a introdução natural de um antígeno, como na alimentação, desencadeia uma hiporresponsividade do organismo ao antígeno ingerido caracterizando um estado dito tolerância oral. Depois de uma refeição, é fisiológica a presença de células secretando anticorpos (IgG, IgM e principalmente IgA), a grande quantidade de linfócitos na *lamina propria*, e a expressão de moléculas de classe II do MHC na mucosa intestinal normal

(BRANDTZAEG *et al.*, 1987). Não se sabe ao certo porque alguns antígenos induzem a quebra desse equilíbrio fisiológico, desencadeando patologias graves que podem causar severas consequências gastrointestinais (SANDERSON e WALKER, 1995).

A camada única de célula epitelial da mucosa constitui a interface entre o lúmen e o lado interno do trato gastrointestinal. Além de ser um local de digestão e absorção de vários nutrientes essenciais, a mucosa intestinal ainda funciona como uma barreira contra a entrada de materiais potencialmente patogênicos derivados de produtos bacterianos ou de antígenos derivados da alimentação (KATO e OWEN, 1994). Nesse contexto, os eventos que ocorrem na superfície da mucosa são cruciais para a manutenção do organismo. A produção de muco, que funciona como uma barreira física contra a penetração de microorganismos, a ação de enzimas proteolíticas, o peristaltismo e os eventos imunológicos iniciados na mucosa intestinal são de fundamental importância no controle da absorção de antígenos (BRANDTZAEG, 1995). Respostas imunes na superfície das mucosas são desencadeadas no tecido linfóide associado ao intestino (GALT, *Gut Associated Lymphoid Tissue*). Este é constituído por folículos linfóides organizados, as Placas de Payer presentes no intestino delgado, e pelo tecido linfóide difuso formado pelos linfócitos intraepiteliais e pelos linfócitos, B e T, da *lamina propria*. Através de células especializadas denominadas células M (*Microfold*), presentes no epitélio associado ao folículo (FAE, *Follicle-Associated Epithelium*), ocorre a principal via de entrada de macromoléculas ao intestino. Essas células apresentam em sua superfície várias cavidades por onde passam macromoléculas intactas, que entram em contato direto com linfócitos T e B, e macrófagos localizadas na grande invaginação da sua membrana basal. Ao serem ativados, os linfócitos migram para o linfonodo mesentérico e retornam ao intestino via circulação sanguínea, através das HEVs (*High Endothelial Venules*), como plasmócitos secretando na *lamina propria* principalmente IgA, que se liga às moléculas antigênicas dificultando sua penetração no organismo. Esse é um dos principais mecanismos de controle da entrada de materiais antigênicos (SANDERSON e WALKER, 1995).

Há várias comprovações de que a dieta tem interferência no sistema imune. MALKOVSKY e colaboradores (1983) observaram que camundongos alimentados com uma dieta convencional suplementada com vitamina A ou seus derivados, apresentaram uma reatividade imunológica aumentada durante a reação enxerto vs. hospedeiro. É possível transferir essa reatividade

através da injeção de células linfóides de animais alimentados com a dieta suplementada de vitamina A, em camundongos singênicos mantidos na dieta convencional. Camundongos com imunodeficiência combinada grave (SCID, *Severe Combined ImmunoDeficiency*) reconstituídos com linfócitos de humanos, quando submetidos a uma dieta deficiente de vitamina A, apresentaram uma menor resposta humoral à toxina tetânica quando comparados com controles (MOLRINE *et al.*, 1995). A suplementação de vitamina A na dieta desses animais reconstituiu a resposta de IgG anti-toxina a níveis normais. FERNANDES e colaboradores (1976) verificaram que camundongos NZB alimentados com uma dieta de baixo conteúdo proteico (6% caseína), comparados com os animais mantidos em dieta normal, apresentaram produção de anticorpos contra SRBC (*Sheep Red Blood Cells*) e imunidade celular mais vigorosa, além de melhor capacidade de produzir reações GvH.

Frente à grande diversidade de materiais potencialmente antigênicos, principalmente advindos da dieta, que entram em contato diariamente com a mucosa do trato gastrointestinal, é natural que o organismo possua mecanismos que controlem a entrada desses moléculas. Da mesma forma que componentes da dieta têm repercussões imunológicas, existem evidências de que o sistema imune participa da seleção de dietas. Em muitas situações descritas anteriormente, é evidente o envolvimento do sistema imune:

_ Nas doenças, há uma ativação frequente do sistema imune de várias maneiras. Por exemplo, no câncer, as células tumorais são antigenicamente diferentes das células normais, por expressarem proteínas que anteriormente não eram expressas. O organismo então se torna sensibilizado a esses novos antígenos, levando à formação de anticorpos e linfócitos contra as células cancerosas. Doenças renais, como glomerulonefrite membranosa, parecem ser causadas por auto-anticorpos circulantes contra antígenos localizados no lado epitelial de capilares glomerulares;

_ Nos transplantes, é proposto que a reação enxerto vs. hospedeiro seja desencadeada pela resposta imune a aloantígenos apresentados pelo MHC (*Major Histocompatibility Complex*) do órgão transplantado;

_ Na gravidez, vários mecanismos imunossupressivos são responsáveis pela tolerância materno-fetal. Dentre eles, está a ausência de expressão de antígenos de classe I ou II na placenta durante a pré implantação do embrião.

Com a formação da placenta, o feto é protegido do sistema imune da mãe através do trofoblasto e também produz uma grande quantidade de fatores imunossupressivos, que incluem hormônios como estradiol e progesterona (STITES e TERR, 1992);

_ Na aprendizagem, a aversão condicionada ao sabor pode ser desencadeada tanto por estímulos não imunológicos, por exemplo, a injeção de cloreto de lítio, como imunológicos. O desconforto com o qual o animal associará ao sabor doce da sacarina, pode ser desencadeado pela injeção de ciclofosfamida (BERNSTEIN, 1985) ou de ovalbumina em camundongos sensibilizados com esse antígeno (MARKOVIC *et al.*, 1988).

Como o sistema imune está envolvido nessas situações em que foi demonstrado haver uma modificação da preferência alimentar, acreditamos que ele possa estar participando dessas mudanças na sensibilidade do paladar, atuando de forma ativa na seleção de dietas.

Em 1981, VAZ e colaboradores demonstraram que a imunização ativa de camundongos resultou em mudanças comportamentais com o desenvolvimento de aversão específica à ingestão do antígeno imunizante, apresentado como grãos de amendoim ou milho *in natura*, ou líquidos como solução de ovalbumina adocicada. PLATA-SALAMAN (1988) demonstrou que ocorre uma diminuição no consumo alimentar depois da administração periférica ou central de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina (IL) 1 β e TNF- α (*Tumour Necrosis Factor*). A administração de fatores que induzem a liberação de citocinas, como LPS (*Lipopolysaccharide*), também resulta na supressão do consumo de alimentos (CALAPAI *et al.*, 1991; McCARTHY *et al.*, 1984). AUBERT e colaboradores (1995) demonstraram ainda que, injeções de LPS ou IL-1 β , 1 hora antes do teste de seleção de dieta afetaram o consumo de macronutrientes em ratos Wistar, fazendo com que os animais comessem relativamente mais carboidrato e menos proteína quando comparados com controles injetados com salina.

Continuando os estudos de VAZ (1981), CARA (1995) e CARA e colaboradores (1994;1997) estudaram a mudança da preferência alimentar induzida imunologicamente. Os autores observaram que, frente à opção de escolher entre água e uma solução de clara de ovo adocicada com sacarina, camundongos normais e tolerantes à ovalbumina ingeriram preferencialmente

a solução adocicada (80%). Entretanto, animais previamente tornados imunes à ovalbumina desenvolveram aversão à ingestões de clara de ovo, ingerindo aproximadamente 10% da solução (**Figura 1.1**). Deste modo, os pesquisadores demonstraram ser possível interferir no comportamento alimentar através de intervenções imunológicas.

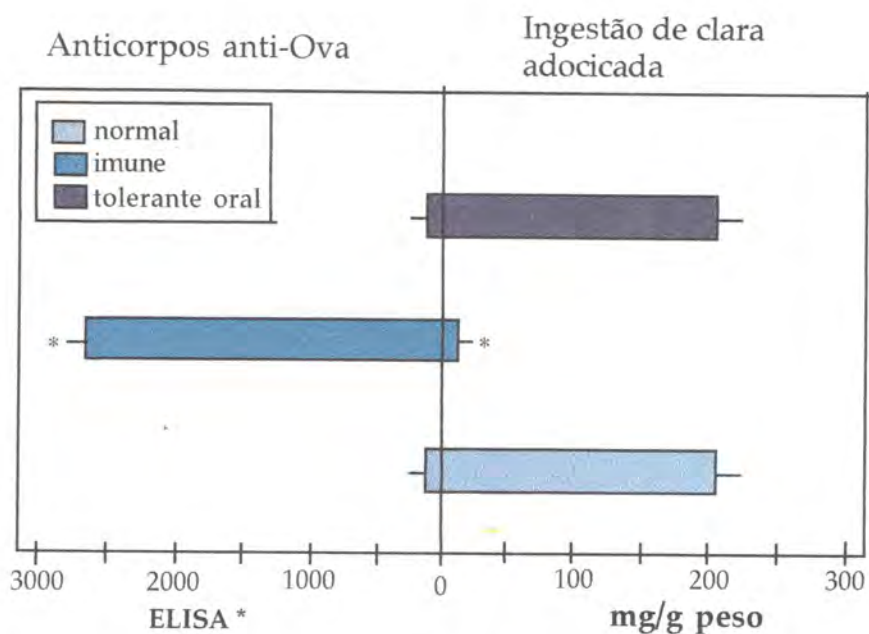


Figura 1.1. Títulos (ELISA*) de anticorpos anti-Ova e ingestão de clara adocicada (mg/g peso) durante 24h, 7 dias após imunização secundária com Ova. O tratamento tolerogênico constituiu de uma gavagem com 20 mg de Ova 7 dias antes da imunização primária. Cada barra representa a média + ou - EPM para grupos de 5 camundongos B6D2F1. * $p < 0,01$ comparado com grupo controle (Teste t de Student). Fonte: Cara, D.C., 1995

CARA e colaboradores demonstraram também que, o fenômeno da aversão imunológica é observado nas primeiras 2-6 horas de exposição ao antígeno, e surge simultaneamente com o aparecimento de anticorpos específicos no soro, já sendo evidenciado no 14º dia após a imunização primária.

Diante desse resultado mostrado na **Figura 1.1**, em que os animais imunes que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-Ova no soro rejeitaram a solução de clara de ovo, e os animais tolerantes, com baixos títulos de anticorpos específicos preferiram beber a solução do antígeno, o fenômeno da aversão nos pareceu correlacionado com a produção de anticorpos. E mais, por ser desencadeado já nas primeiras horas de exposição ao antígeno, podemos sugerir que a ingestão do antígeno em animais imunizados desencadeia reações

alérgicas e que essas reações estão envolvidas na aversão à posterior ingestão do antígeno.

Como já comentado, há alguns trabalhos demonstrando que agressões imunológicas, como anafilaxia ou tratamento com drogas imunossupressoras, afetam a seleção de dietas. BERNSTEIN (1985) demonstrou que ratos acostumados a comer uma determinada dieta, desenvolveram uma aversão condicionada a essa mesma dieta depois de injetados com ciclofosfamida, uma droga imunossupressora. MARKOVIC e colaboradores (1988) e DJURIC e colaboradores (1988) realizaram estudos de aversão condicionada ao sabor induzida pelo choque anafilático. Nesses experimentos, a injeção de Ova concomitantemente com a ingestão de um sabor novo (sacarina) em animais previamente sensibilizados com o antígeno, condicionou os animais a rejeitarem a sacarina. A explicação é que, com a injeção do antígeno, houve um quadro de alergia que gerou um desconforto.

1.3. Alergia

A alergia pode ser definida como um evento imunológico que resulta em alterações funcionais e morfológicas em alguns órgãos, desencadeadas pela ligação de um determinado antígeno (dito alérgeno) nas IgE ligadas em receptores de alta afinidade presentes na superfície de mastócitos e basófilos em indivíduos atópicos, ou seja, que apresentam predisposição genética para formar essa classe de imunoglobulina.

Os alérgenos mais comuns são: grãos de pólen, partículas derivadas de ácaros, produtos de animais caseiros e de outros animais, drogas, veneno de vespa e abelha, e certos alimentos como leite de vaca, chocolate, peixe, camarão, dentre outros (GUYTON e HALL, 1997). A alergia originada por ingestão de determinado alimento, ou alergia alimentar, parece estar relacionada com a idade do indivíduo (sendo mais frequente em crianças), e sua história familiar.

A ligação do alérgeno com duas moléculas de IgE inicia uma cascata de eventos bioquímicos, culminando com a liberação de mediadores presentes em mastócitos e basófilos. Em questão de minutos já aparecem os sintomas resultantes dessa reação. Por isso, a alergia é comumente chamada de hipersensibilidade imediata. A ingestão de alimentos específicos em indivíduos

alérgicos pode levar a um quadro de inflamação não só no trato digestivo, como também na pele e vias aéreas (ISHIZAKA, 1994). Esse quadro inflamatório é caracterizado por alterações na permeabilidade vascular e aumento da permeabilidade a macromoléculas no trato gastrointestinal. Esses efeitos seriam desencadeados na fase imediata da reação, principalmente pela ação da histamina e leucotrienos liberados pelos mastócitos. A fase tardia requer vários mediadores, entre eles o fator de ativação de plaquetas (PAF, *Platelet Activating Factor*), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas) e IL-5 principalmente. Além disso, se caracteriza pelo recrutamento de células inflamatórias da corrente sanguínea, especialmente neutrófilos e eosinófilos (STITES e TERR, 1992).

FRANK e GRUSKAY (1982) demonstraram que crianças que foram amamentadas no peito tiveram aproximadamente metade da incidência de alergia ao leite de vaca ou de soja. Certamente, componentes do leite materno (como IgA, TGF- β) impediram que a sensibilização ao antígeno do leite ou da soja ocorresse. Tem sido descrito, na literatura, que a ingestão de um antígeno pode ou não causar sensibilização. Como já mencionado, na maioria das vezes a introdução de um antígeno por via oral desencadeia um fenômeno denominado tolerância oral.

1.3.1. Tolerância Oral

A tolerância oral é caracterizada, em uma imunização parenteral subsequente, pelos baixos títulos de anticorpos específicos quando comparados com os títulos de anticorpos de um animal que não recebeu a ingestão prévia do antígeno, ou seja, que foi somente imunizado. Vários autores têm demonstrado que a IgE é extremamente sensível à supressão desencadeada pela administração oral do antígeno (NGAN e KIND, 1978; SAKLAYEN *et al.*, 1984). Por causa disso, a terapêutica tem tentado utilizar de eventos fisiológicos, como a tolerância oral, para prevenção de várias doenças autoimunes e alérgicas. Um exemplo é a supressão da encefalomielite autoimune experimental (EAE, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) pela administração oral de proteína básica de mielina (MEYER *et al.*, 1996). NAKAO e colaboradores (1997) observaram que o tratamento com altas doses de ovalbumina por via oral em animais previamente sensibilizados, diminuiu o recrutamento de eosinófilos e de linfócitos do fenótipo Th2 além da produção de IL-4 e IgE anti-Ova. Esses achados sugerem que a tolerância oral pode ser uma estratégia biologicamente

relevante em doenças mediadas por linfócitos Th2. Um trabalho recente conduzido por LEISHMAN e colaboradores (1998) demonstrou que a administração de antígeno em camundongos primados foi capaz de suprimir uma resposta celular, medida por DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*), com supressão também de citocinas, tanto Th1 quanto Th2, mas não suprimiu a resposta humoral. Portanto, como mecanismos que induzem essa supressão imune depois da ingestão de antígenos ainda estão sendo explorados, é preciso cautela para usar a tolerância oral na clínica.

Vários fatores são importantes na indução de tolerância oral:

_ ligados aos animais: idade (STROBEL *et al.*, 1981; FARIA, 1993); raça e linhagem (MOWAT *et al.*, 1987; VAZ *et al.*, 1987; LAMONT *et al.*; 1988); *status* imunológico (HANSON *et al.*, 1979; PENG *et al.*, 1989); flora intestinal (KYONO *et al.*, 1982; WANNEMUEHLER *et al.*, 1982);

_ ligados ao antígeno: natureza e dose (BRUCE e FERGUSON, 1986; MOWAT, 1998; PENG *et al.*, 1989);

_ relacionados a variações de protocolo nas exposições digestivas ao antígeno: a frequência (SAKLAYEN *et al.*, 1984), o intervalo entre as exposições orais (FARIA *et al.*, 1993), a forma de administração (STOKES *et al.*, 1983; VERDOLIN *et al.*, 1993; FLANAGAN *et al.*, 1996).

Alguns desses fatores, como presença de flora intestinal, forma de introdução do antígeno via oral e idade, foram utilizados em nosso trabalho.

Animais isentos de germes

Animais isentos de germes (*Germfree* - GF) são muito usados em pesquisas para verificar o papel da flora intestinal em diversas situações. Alguns aspectos relacionados à imunidade tem-se demonstrado ser comparáveis em animais GF e convencionais (CV), segundo TLASKALOVA e colaboradores (1983). Outros autores demonstraram uma capacidade reduzida de animais GF para expressar certas reações imunológicas mediadas por células (VEDA *et al.*, 1975). Como a flora bacteriana intestinal afeta diretamente o desenvolvimento do tecido linfóide associado à mucosa do intestino, animais GF apresentam

várias alterações no sistema imune de mucosa quando comparados com animais convencionais. Podemos citar: menor celularidade da *lamina propria*, redução ou ausência das Placas de Payer, diminuição dos linfócitos intraepiteliais.

Alguns autores demonstraram que a tolerância oral pode ser induzida em animais GF (MOREAU e CORTIER, 1988), enquanto outros não conseguiram desencadear esse fenômeno (KYONO *et al.*, 1982; WANNEMUEHLER *et al.*, 1982). Segundo SUDO e colaboradores (1997), animais GF apresentaram uma cinética de produção de anticorpos diferente de convencionais (CV). Eles observaram que mesmo com altas doses do antígeno por via oral (5mg Ova/dia, durante 4 dias), animais GF não desenvolveram tolerância oral pra IgE ou IgG específicos, pelo menos até a 7ª semana após o desafio oral. Eles demonstraram também que a elevação de anticorpos IgE e IgG1 específicos no soro de animais GF ocorreu mais lentamente que em animais CV.

Animais idosos

O envelhecimento é acompanhado de modificações operacionais do sistema imune. Uma dessas modificações e que nos interessou mais diretamente pelo objetivo do nosso trabalho, foi o declínio da produção de anticorpos a antígenos e a diminuição da susceptibilidade à tolerância oral. Resultados experimentais, obtidos por FARIA e colaboradores (1993;1998) e LAHMANN (1992), demonstraram que animais B6D2F1 com 25 semanas de idade foram menos susceptíveis à indução de tolerância oral, e totalmente refratários à partir de 70 semanas. A partir dessa idade, FARIA (1998) demonstrou também que os animais se tornam menos susceptíveis à imunização sistêmica.

Variações no protocolo de exposições orais do antígeno

FICKER (1998) demonstrou que a forma de exposição do antígeno (ingestão voluntária ou involuntária), é um fator importante para a indução de tolerância oral em animais B6D2F1 jovens e idosos. Ela demonstrou que a administração gradual do antígeno (ingestão voluntária) foi muito mais eficiente na indução de tolerância oral que a administração *in bolus* (gavagem).

Esses diferentes tratamentos orais repercutiram diretamente na produção de anticorpos específicos.

É importante deixar claro que fizemos uso de artifícios biológicos (ausência da flora intestinal e idade) e experimentais (variações no protocolo de pré tratamento oral), que possibilitassem uma flexibilidade com relação à produção de anticorpos, para estudarmos a correlação entre os diversos isotipos e aversão à ingestão da clara.

Objetivos

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar a participação do processo alérgico no desencadeamento da aversão à ovalbumina induzida imunologicamente, usando como modelos experimentais animais isentos de germes jovens (Germfree-GFj) e Convencionais Jovens (CVj) e Idosos (CVi).

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Analisar a correlação entre os títulos de anticorpos totais e de isotipos séricos anti-ovalbumina e aversão à ingestão de solução de clara de ovo (clara), sob as seguintes variações:

- diferentes protocolos de indução de tolerância oral;
- presença de flora intestinal;
- envelhecimento.

2.2.2. Analisar a correlação entre a presença de IgA secretória no muco intestinal e a aversão à ingestão de clara em animais GFj, CVj e CVi;

2.2.3. Avaliar a correlação entre a aversão à ingestão de clara e a presença de anticorpos, IgE ou IgG1 no baço, fígado, rim, pulmão, estômago e intestino (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) de animais CVj, CVi e GFj, pelo teste de aumento da permeabilidade vascular através do extravasamento do Azul de Evans;

2.2.4. Analisar eventuais alterações histopatológicas no intestino de camundongos normais (N), tolerantes (T) e imunes (I), GFj e CV, jovens e idosos, após o teste opcional ou não opcional da ingestão de clara.

Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos convencionais jovens (CVj), entre 8 e 12 semanas, e idosos (CVi) de 90 semanas, das linhagens B6D2F1 (F1(C57BL/6 e DBA/2), de ambos os sexos. Os animais foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas - CEBIO, e mantidos no Biotério do laboratório de Imunobiologia - ICB - UFMG.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos com ração padrão para camundongos e água *ad libidum*.

Foram utilizados também camundongos isentos de germes jovens (*Germfree* - GFj), fêmeas com aproximadamente 8 semanas de idade, e seu congênito convencional, da linhagem SWISS/NIH (não isogênicos), cedidos e mantidos pelo laboratório de Gnotobiologia do Instituto de Ciências Biológicas (sob os cuidados da Professora Jacqueline Alvarez-Leite) em condições alimentares e ambientais totalmente estéreis.

Em nossos resultados, será citado somente o CVj da linhagem B6D2F1 e não SWISS/NIH por motivo de redundância de dados.

3.1.1. Procedência, Manejo e Manutenção dos Camundongos GF

Os camundongos GFj foram obtidos de matrizes importadas (Taconic, Madison, USA).

Para evitar contaminação, foram mantidos em ambiente estéril, dentro de isoladores flexíveis importados (Standard Safety Equipment Co., Pallatine, USA). No isolador, o ar estéril entra passando por um filtro e sai por outro, sendo este último para evitar contaminação através de algum refluxo de ar na saída, durante o manejo nos isoladores.

A água foi esterelizada a 127°C, a 1.5 pressão atm em autoclave. Os materiais utilizados dentro do isolador, como papel higiênico (usado como cama), gaiolas, instrumentais etc., foram esterelizados em cilindros em autoclave com vácuo.

A dieta usada foi esterelizada pelo calor, sendo um pouco mais vitaminada para compensar as perdas pela alta temperatura.

Um esterilizante químico de superfície foi também usado, o ácido peracético. Este ácido não tem poder de penetração e é considerado tóxico, irritando olhos, nariz e pele.

Os camundongos convencionais (CV) da mesma linhagem (NIH), foram criados em ambiente aberto no biotério do laboratório de Imunobiologia.

3.2. Antígeno

Como antígeno, para as imunizações e gavagens, utilizamos a ovalbumina (Ova, albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co., St.Louis, MO, USA).

Para os experimentos com animais GFj, as soluções de antígeno em salina foram filtradas em filtro estéril, não pirogênico de 0,4 μm (Nalgene, 25 mm surfactante), para se evitar a contaminação por bactérias.

Para o teste de aversão à ingestão do antígeno, utilizamos uma solução filtrada em gaze de clara de ovo diluída a 20% em água.

3.3. Tratamento Imunogênico

O protocolo de imunização parenteral consistiu de injeções subcutâneas (sc) do antígeno. Na imunização primária, o animal recebeu 0,2 ml de salina fisiológica 0,85%, contendo 10 μg de Ova (5x cristalizada) em 1mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$. Na imunização secundária, foi dada uma injeção similar de Ova, sem adjuvante, em 0,2 ml de salina, 14 dias após a primeira imunização. O teste de aversão (descrito posteriormente) foi realizado 7 dias após a imunização secundária.

Nos experimentos com GFj, o $\text{Al}(\text{OH})_3$ foi autoclavado como processo de esterelização.

3.4. Tratamento Tolerogênico

Por gavagem (intubação gástrica)

Os camundongos receberam (sem anestesia) uma única gavagem de 0,2 ml de salina fisiológica contendo 20mg de Ova (5x cristalizada). A solução de antígeno foi administrada diretamente no estômago, através de uma agulha de ponta romba acoplada a uma seringa, 7 dias antes da imunização primária (sc).

Por ingestão voluntária

Foi utilizada uma solução de Ova a 4 mg/ml diluída em água como única fonte de líquido por um período de 24 horas (1 dia de ingestão voluntária). Como normalmente cada camundongo ingere cerca de 5 ml de água por dia, cada um recebeu então cerca de 20 mg de Ova em um período de 24 horas.

Uma outra forma de pré tratamento oral foi oferecida aos animais através da exposição de uma solução de clara de ovo diluída a 1:5 em água, como única fonte líquida disponível durante 24 horas (1 dia de ingestão voluntária).

3.5. Consumo do antígeno: Teste de Aversão

A solução de clara de ovo (clara) foi oferecida para os camundongos sob duas formas: opcional e não opcional. A preparação foi feita retirando-se a clara de ovo, filtrando e diluindo a 20% em solução salina. Nos testes opcionais adicionamos sacarina na concentração de 0,5%.

Na forma opcional, os camundongos foram separados em gaiolas individuais, ou colocados dois em uma mesma gaiola, separados por uma divisória gradeada, 7 dias antes do teste. Nessas gaiolas, receberam ração para camundongo *ad libidum* e foram expostos a duas mamadeiras (com capacidade para 10 ml) contendo água de torneira, sendo colocadas uma de cada lado da gaiola. No primeiro dia do teste, uma das mamadeiras recebeu a clara adocicada e a outra água. A posição da mamadeira com líquido adocicado foi alternada a cada dia para se controlar a preferência por posições. Em alguns experimentos, para se avaliar a cinética da aversão, o teste foi realizado durante 10 dias. A quantidade de líquido ingerido de cada mamadeira foi determinada a cada 24 horas de exposição e expressa como mg de solução ingerida. As mamadeiras

eram todas do mesmo tamanho e formato. Na forma não opcional, os camundongos receberam somente uma mamadeira contendo clara não adocicada.

Tanto para o teste opcional como não opcional, camundongos GFj foram mantidos em microisoladores e a clara de ovo 20% adocicada com 0,5% de sacarina foi preparada no fluxo laminar, para se evitar ao máximo o risco de contaminação.

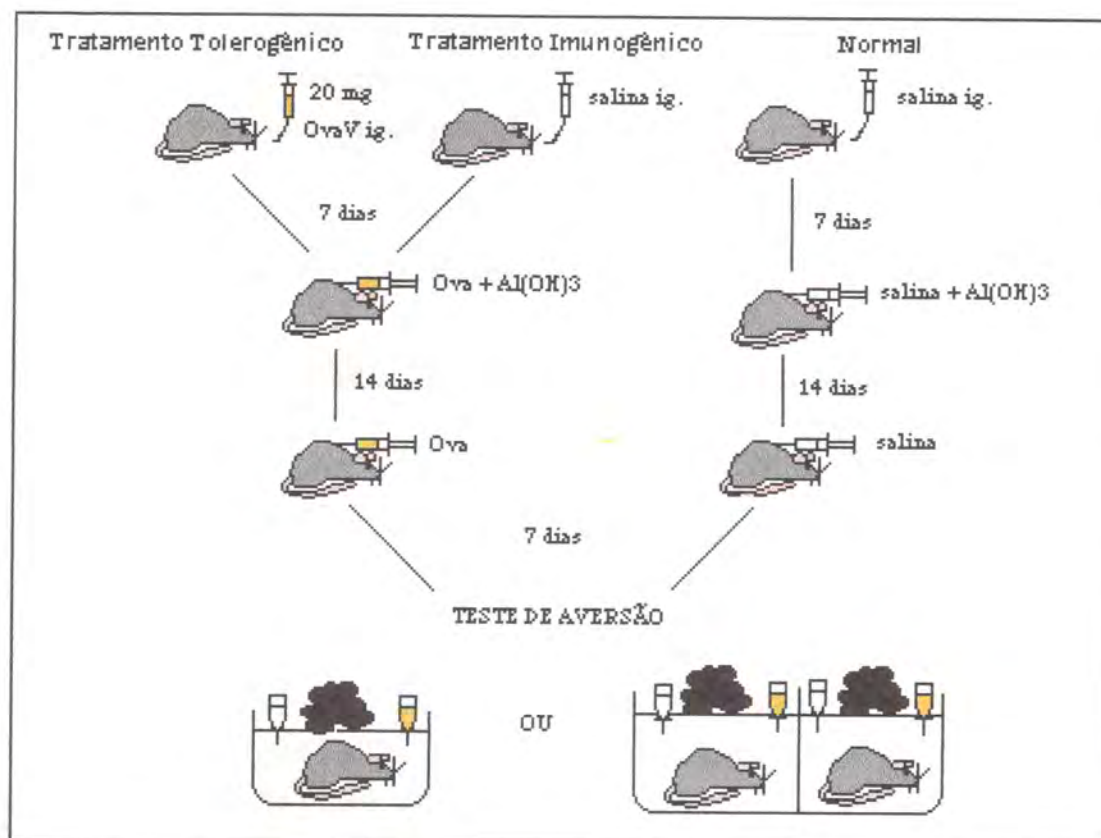


Figura 3.1. Protocolo Experimental Básico - Consumo opcional de clara

Trabalhamos com 3 grupos experimentais:

- 1) o grupo submetido ao tratamento tolerogênico através de 1 ingestão intragástrica com 20 mg de Ovalbumina diluída em salina (0,2 ml de solução). Nesta etapa, os outros grupos receberam salina. Sete dias depois do pré-tratamento, esses animais receberam, por via subcutânea, a imunização primária através da injeção de 0,2 ml de solução contendo 10 µg de Ova + Al(OH)₃ 1mg/ml. Catorze dias depois, foi realizada a imunização secundária através da injeção de 10µg de Ova solúvel;
- 2) o grupo submetido ao tratamento imunogênico, que recebeu as mesmas imunizações descritas para o grupo 1;
- 3) o grupo normal que recebeu 0,2 ml de salina em todos os tratamentos, com exceção da imunização primária, onde recebeu também Al(OH)₃.

Os animais de todos os grupos foram separados em gaiolas individuais ou 2 animais por gaiola separados por uma grade divisória, no dia seguinte à imunização secundária. O teste de aversão, iniciado 7 dias após a secundária, consistiu de expormos aos animais duas mamadeiras: uma contendo água e outra contendo uma solução de clara de ovo adocicada com 0,5% de sacarina.

3.6. Sangria e Obtenção do soro

Para análise da produção de anticorpos específicos no soro, foram feitas sangrias de teste. Nos experimentos de cinética da aversão, sangrias retro-orbitais foram feitas 6 dias após a imunização secundária (ou seja, 1 dia antes do teste de aversão). Sangrias através do plexo axilar em animais anestesiados com éter foram realizadas em todos os experimentos, após o último dia de teste de aversão. Depois de sangrados, os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. O soro foi retirado e diluído a 1:10 em salina fisiológica, em tubos individuais. As amostras foram congeladas a -20°C até a dosagem das imunoglobulinas específicas por ELISA.

3.7. Titulação dos anticorpos no soro

3.7.1. Anticorpos Totais

A dosagem de anticorpos totais foi feita através do teste de E.L.I.S.A. (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que resumidamente segue a metodologia descrita a seguir: Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4°C , com $2\mu\text{g}$ de Ova diluídos em $100\mu\text{l}$ por poço de tampão carbonato $\text{pH}=9,6$ (*Coating buffer*). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA- solução salina-Tween) e incubadas, por uma hora, com $200\mu\text{l}$ de uma solução de caseína a 0,25% em PBS (PBS-caseína), por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas a 37°C , por 1 hora, com $100\mu\text{l}$ /poço de seis diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5, diluições 1:100 a 1:3200). As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora a 37°C , com $100\mu\text{l}$ /poço de uma solução de um soro poliespecífico de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongo marcado com peroxidase (*Goat anti-mouse Ig-HRP* - Southern Biothecnology Associates, Birmingham, AL, USA) na diluição 1:25.000. As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com $100\mu\text{l}$ /poço de tampão citrato ($\text{pH}=5,0$) contendo H_2O_2 e ortofenileno-diamino (OPD) para dar cor, por reação enzimática catalizada. Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de

20 μl /poço de H_2SO_4 a 2N. A absorbância do comprimento de onda de 492 nm foi aferida por leitor automático (Model 450 microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). Os valores de absorbância de cada soro teste, em cada uma das seis diluições seriadas, foram submetidos a um somatório. O somatório das densidades ópticas de cada diluição foi expresso como ELISA*.

3.7.2. Isotipos dos anticorpos anti-Ova

Para dosagem dos isotipos específicos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA foi usada uma adaptação da técnica do ELISA descrita acima, padronizada por estudantes do Laboratório de Imunobiologia. As etapas iniciais são iguais, entretanto, para a dosagem de isotipos, após a incubação com o soro durante 1 hora, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas por 1 hora a 37°C com anticorpos de cabra (*Goat anti-mouse* IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA-UNLB, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA), diluídos a 1:20.000. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora a 37°C com anticorpos de coelho anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (*Rabbit anti-goat IgG - HRP*, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA). A reação imunoenzimática ocorreu como descrito anteriormente, assim como a leitura do resultado.

3.7.3. Dosagem de IgE

Para dosagem de IgE no soro dos animais, através de pesquisa bibliográfica, padronizamos uma adaptação da técnica de E.L.I.S.A, como descrito a seguir.

Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* a 4°C, com 100 μg de Ova diluídos em 100 μl por poço de tampão carbonato pH=9,6 (*Coating buffer*). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA- solução salina-Tween) e incubadas, por 1 hora, com 200 μl de uma solução de caseína a 0,25% em PBS (PBS-caseína), por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas a 4°C *overnight*, com 100 μl /poço de seis

diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5 , diluições 1:100 a 1:3200). No dia seguinte, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora a 37°C, com 100 µl/poço de uma solução de um soro de rato anti-IgE de camundongo não marcado (*Rat anti-mouse IgE*- UNLB, Southern Biothecnology Associates, Birmingham, AL, USA) na diluição 1:8000. As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora a 37°C, com 100 µl/poço de uma solução de um soro poliespecífico de cabra anti-imunoglobulinas totais de rato marcado com peroxidase (*Goat anti-Rat Ig* - HRP, Southern Biothecnology Associates, Birmingham, AL, USA) na diluição 1:1000. As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100 µl/poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H₂O₂ e ortofenileno-diamino (OPD) para dar cor, por reação enzimática catalizada. Após 45 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl/poço de H₂SO₄ a 2N. A absorbância do comprimento de onda de 492 nm foi aferida por leitor automático (Model 450 microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). Os valores de absorbância de cada soro teste, em cada uma das seis diluições seriadas, foram submetidos a um somatório. O somatório das densidades ópticas de cada diluição foi expresso como ELISA*.

3.8- Coleta do muco intestinal

Utilizamos a técnica descrita por ELSON e EALDING (1984), com algumas modificações.

Removemos o intestino dos animais e o colocamos em tampão PBS pH 7,4 gelado. Em seguida o intestino foi dividido ao meio e cada metade lavada com 5ml do mesmo tampão, e o conteúdo intestinal colocado em tubos Falcon de 10 ml. O conteúdo intestinal mais o lavado foram então centrifugados a 4°C por 30 minutos a 2000 rpm. Após essa etapa, coletamos o sobrenadante, diluímos à concentração de 1:20 em PBS 1x, para posterior dosagem de IgA secretória.

3.9- Medida de IgA secretória

Esta técnica foi feita pelo ensaio de ELISA conforme descrito por CHALLACOMBE e colaboradores (1992).

Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas overnight a 4°C, com 5 µl de *Goat anti-mouse Ig-UNLB* (Southern Biotechnology) diluídos em 100 µl por poço de tampão carbonato pH=9,6 (*Coating buffer*). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas com 100 µl/poço de seis diluições seriadas do muco a ser testado, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5, diluições 1:100 a 1:3200). As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora a 37°C, com 100 µl/poço de goat anti-mouse IgA (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA). As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora a 37°C, com 100 µl/poço de *Streptavidin-HRP* (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA). Depois dessa etapa, as placas foram incubadas, no escuro, com 100 µl/poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H₂O₂ e ortofenileno-diamino (OPD) para dar cor, por reação enzimática catalizada. Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl/poço de H₂SO₄ a 2N. A absorbância do comprimento de onda de 492 nm foi aferida por leitor automático (Model 450 microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão *Mouse IgA-UNLB*, além de um controle da própria placa (branco). Os valores de absorbância de cada soro teste, em cada uma das seis diluições seriadas, foram submetidos a um somatório. O somatório das densidades ópticas de cada diluição foi expresso como ELISA*.

3.10. Indução e avaliação do aumento de permeabilidade vascular

Para verificação indireta da presença de IgE nos mastócitos de vários tecidos, alterações na permeabilidade vascular da mucosa intestinal foram avaliadas pelo método de extravasamento de albumina corada pelo azul de Evans (JANCAR *et al.*, 1991). Camundongos CV, jovens e idosos, e GFj, submetidos ao tratamento tolerogênico, imunogênico e normais receberam na veia da cauda, 7 dias após a imunização secundária com Ova solúvel, 100 μg de Ova (5x cristalizada) em azul de Evans (40 mg/Kg). Após 10 minutos, os animais foram sacrificados e exsanguinados. Foram retirados vários órgãos para análise do extravasamento do azul de Evans, como: pulmão, fígado, baço, rim, estômago e intestino delgado, dividido em duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Cada órgão (inclusive as porções do intestino), foi dividido em 2 fragmentos. Esses fragmentos foram pesados, sendo que um deles foi colocado em formamida (4ml/g de peso úmido a 20°C por 24h) para extração do corante, e o outro levado para secagem em estufa a 60°C por 48 horas. A densidade óptica das amostras foi determinada pelo Leitor de ELISA (Automated Microplate Reader EL-800 Bio-Tek instruments®, Inc.) utilizando-se filtro 630 nm. A quantidade do corante/ml de formamida foi calculada através da comparação das densidades ópticas de cada amostra com as obtidas pela curva padrão de diluições seriadas do corante (0,15-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A intensidade do edema foi expressa em μg de azul de Evans/g de tecido seco, através da correção feita com o peso do outro fragmento deixado na estufa, que determinou a porcentagem de água no tecido.

TESTE DE PERMEABILIDADE VASCULAR

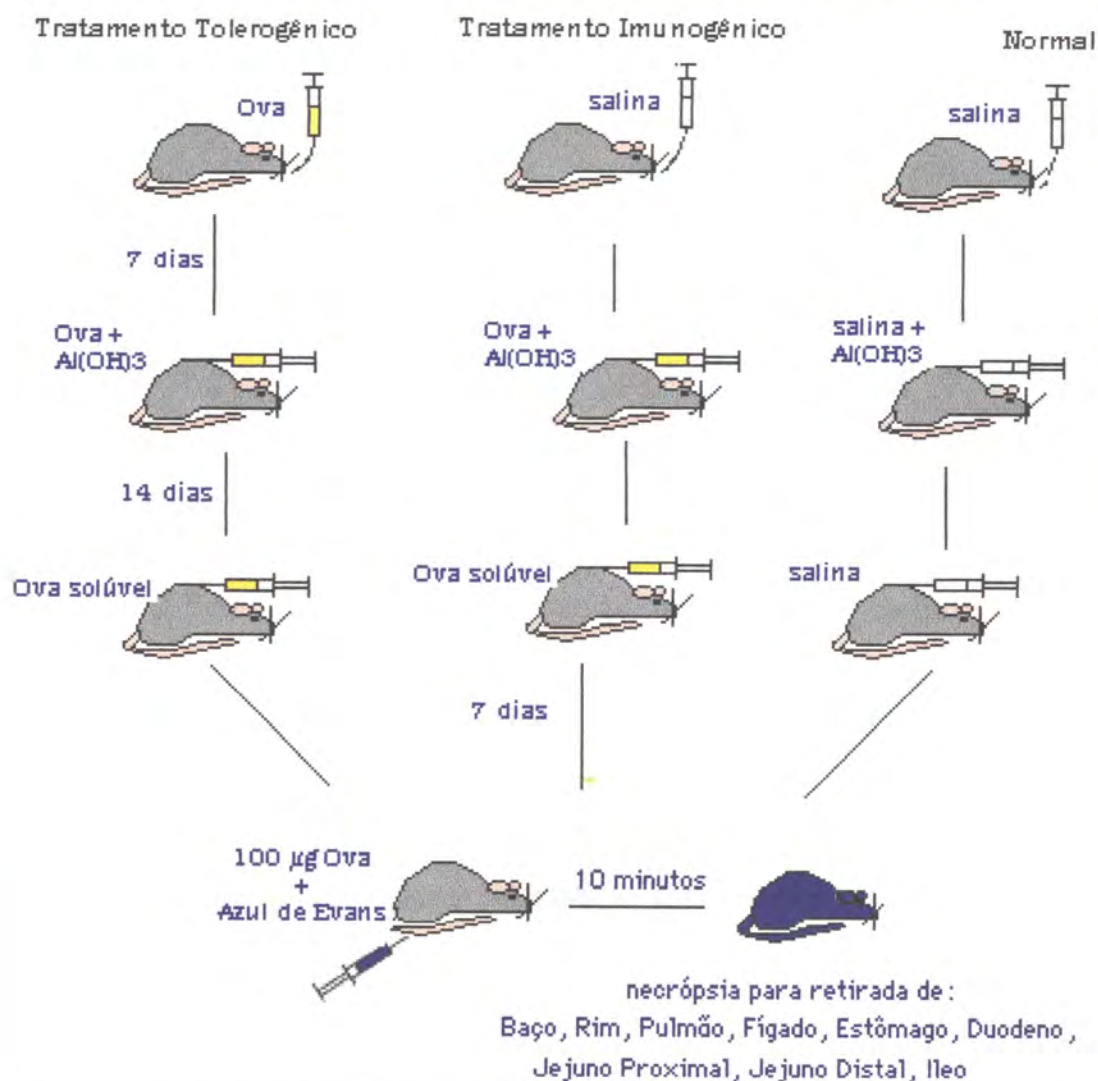


Figura 3.2. Protocolo do teste de permeabilidade vascular. Animais CVj, CVi e GFj submetidos aos tratamentos tolerogênico, imunogênico e normal receberam 7 dias depois da imunização secundária com 10 µg de ova solúvel por via subcutânea, uma injeção na veia da cauda com 100 µg de Ova diluída em azul de Evans (40mg/kg). Dez minutos depois, os animais foram sacrificados e retirados vários órgãos para análise da quantidade de corante extravasada.

3.11. Análise Morfológica da Aversão

3.11.1. Necrópsia e confecção de lâminas

Alguns órgãos foram retirados para análise histológica do fenômeno da aversão. Para obtenção dos órgãos, no último dia do teste de aversão, os animais foram anestesiados em éter etílico, sangrados para análises de anticorpos no soro, e depois sacrificados para realização da necrópsia. Foram retirados

fragmentos de língua, baço, fígado e intestino delgado. Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção foi baseado segundo FERRARIS e colaboradores (1992). O intestino delgado foi lavado com PBS 1x, para retirada das fezes, e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido de 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente.

A preparação para análise histológica do intestino, consistiu em enrolar cada porção sobre um palito, fazendo uma espécie de "rocambole", com a porção proximal no interior. Em seguida, todas as porções do intestino delgado e os outros órgãos foram fixados em formol tamponado a 10% e, posteriormente, desidratados em soluções crescentes de álcool usando um processador de tecidos automático Titertek. Os órgãos foram, então, incluídos em parafina e secções transversais de 4 μ m foram obtidas usando um micrótomo Spencer.

3.11.2. Colorações de rotina

Para análise geral dos tecidos, os cortes em lâmina foram corados com hematoxilina e eosina, e as características morfológicas determinadas usando microscópio Olympus.

3.11.3. Morfometria

A análise morfométrica do intestino foi feita segundo KALLAS e colaboradores (1995), através das seguintes medidas: ETM (espessura total da mucosa), AV (altura das vilosidades) e ETM-AV (profundidade da cripta), utilizando um processador de imagens acoplado a um microscópio óptico.

3.12. Análise Estatística

Os dados numéricos dos parâmetros medidos nos experimentos (ELISA*) foram utilizados para se analisar a significância entre os grupos. Através do Teste ANOVA foi feita a avaliação geral entre diversos grupos, e pelo Teste t de *Student* bicaudal e TuKey, a análise pareada.

3.13. Soluções utilizadas

No ELISA:

Salina Fisiológica (0,85%)

- Salina 10x - 100 ml
- Água bidestilada - 900 ml

Tampão carbonato (Coating Buffer)

- Carbonato de sódio (Na_2CO_3) - 0.015 M
 - Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) - 0.035 M pH 9.6.
- Conservar a 4°C e usar no máximo durante 3 dias.

PBS-caseína

- Fosfato de potássio (KH_2PO_4) - 0.0015 M
- Fosfato de sódio (Na_2HPO_4) - 0.0081 M
- Cloreto de sódio (NaCl) - 0.1369 M
- Cloreto de potássio (KCl) - 0.0027 M
- Caseína - 0.25%

pH 7.2. Usar água destilada a 90°C, agitar e filtrar; armazenar a -20°C.

Tampão citrato

- Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) - 0.1 M
 - Fosfato de sódio (Na_2HPO_4) - 0.2 M
- pH 5.0

Salina-tween

- Cloreto de sódio (NaCl) - 0.145 M
- Tween 20 - 0.005 %

Solução de ácido sulfúrico - 1:20

Na morfologia:Formol Tamponado 10% (para 1 litro):

- fosfato de sódio monobásico - 4,25 g
- fosfato de sódio bibásico - 6,50 g
- formol - 100 ml
- água destilada- 900 ml

Tampão PBS 1x

- NaCl - 8,00 g
 - KCl - 0,20 g
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,17 g
 - KH_2PO_4 - 0,20 g
 - H_2O bidestilada - 1000 ml (q.s.p.)
- Acertar o pH para 7,2 a 7,4. Armagengar a -4°C .*

Resultados

4.1. Avaliação do consumo do antígeno

Para se avaliar o consumo de clara por animais imunizados com ovalbumina, realizamos 2 testes. No opcional, os camundongos foram ofertados com 2 mamadeiras, uma contendo água e outra contendo clara adocicada, e no teste não opcional, foi oferecido apenas uma mamadeira contendo clara, como descrito no item 3.5.

4.1.1. Consumo de clara opcional

Com a escolha de ingerir clara adocicada ou água, animais CVj e GFj normais e submetidos ao tratamento tolerogênico, consumiram preferencialmente clara, em média 86 e 90% respectivamente (**Figura 4.1**). Ao contrário, os animais submetidos ao tratamento imunogênico nos 3 modelos experimentais (convencionais jovens, convencionais idosos e isentos de germes jovens), diminuíram consideravelmente a ingestão da clara (17%) comparado com o consumo de água. Animais CVi submetidos ao tratamento tolerogênico, mas que apresentaram altos títulos de anticorpos totais específicos (ver **Figura 4.5.1**) também evitaram a ingestão de clara, reduzindo o consumo para 10%.

4.1.2. Consumo de clara não opcional

Mesmo tendo a clara como única opção líquida (**Figura 4.2**), os animais imunes reduziram seu consumo, quando comparados com tolerantes e normais; a redução foi mais acentuada em GFj. Animais tolerantes e normais mantiveram o mesmo padrão de consumo do teste opcional, apesar de ingerirem uma menor quantidade.

Por motivos técnicos, esse experimento não foi realizado com animais idosos (CVi).

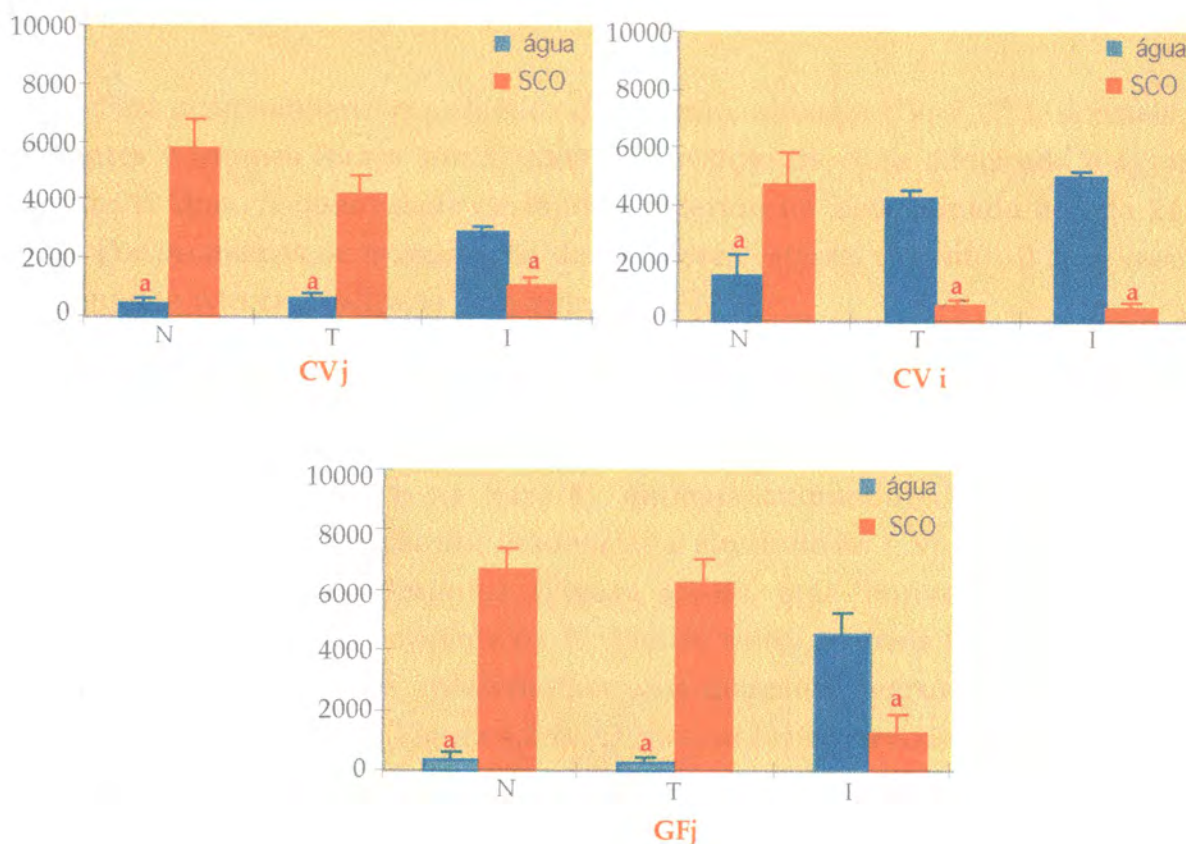


Figura 4.1.1. Consumo opcional de clara de ovo. Consumo (mg) de solução de clara de ovo adocicada e água por camundongos CVj, CVi e GFj, normais (N), tolerantes (T) e imunizados com ovalbumina (I), 7 dias após a imunização secundária. Cada barra representa a média do consumo por 24 horas. A letra representa a significância ($p < 0.05$) com relação ao consumo da clara e água (Teste t de Student).

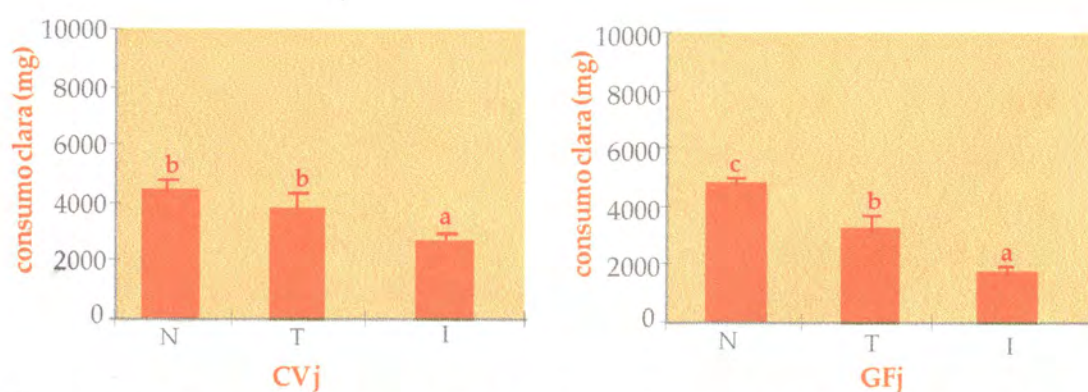


Figura 4.1.2. Consumo não opcional de clara de ovo. Consumo (mg) de solução de clara de ovo por camundongos CVj e GFj, normais (N), tolerantes (T) e imunizados com ovalbumina (I), 7 dias após a imunização secundária. Cada barra representa a média do consumo por 24 horas. As letras representam a significância ($p < 0.05$) com relação ao consumo de clara entre os grupos (Teste t de Student).

4.2. Manutenção da aversão nos animais imunes

Para acompanharmos a cinética da aversão, animais CVj e CVi, normais, tolerantes e imunes foram submetidos à exposição de clara adocicada e água durante 10 dias. A quantidade de líquido ingerido foi determinada a cada 24 horas. Por problemas de manutenção de condições estéreis durante 10 dias, esse experimento não foi realizado com animais GFj.

Na **Figura 4.2**, o par de gráficos representados na letra **A** mostra a cinética do consumo para CVj e CVi normais, na letra **B** para animais submetidos ao tratamento tolerogênico e na letra **C**, animais submetidos ao tratamento imunogênico. A aversão não foi evidenciada em animais CVj e CVi normais (**Figura 4.2-A**) e CVj tolerantes (**Figura 4.2-B**), mas houve uma grande variabilidade de consumo durante os 10 dias de teste. Animais CVi submetidos ao tratamento tolerogênico apresentaram uma marcante aversão à ingestão de clara desde o primeiro dia (**Figura 4.2-B**). O mesmo foi observado em CVj e CVi submetidos ao tratamento imunogênico (**Figura 4.2-C**).

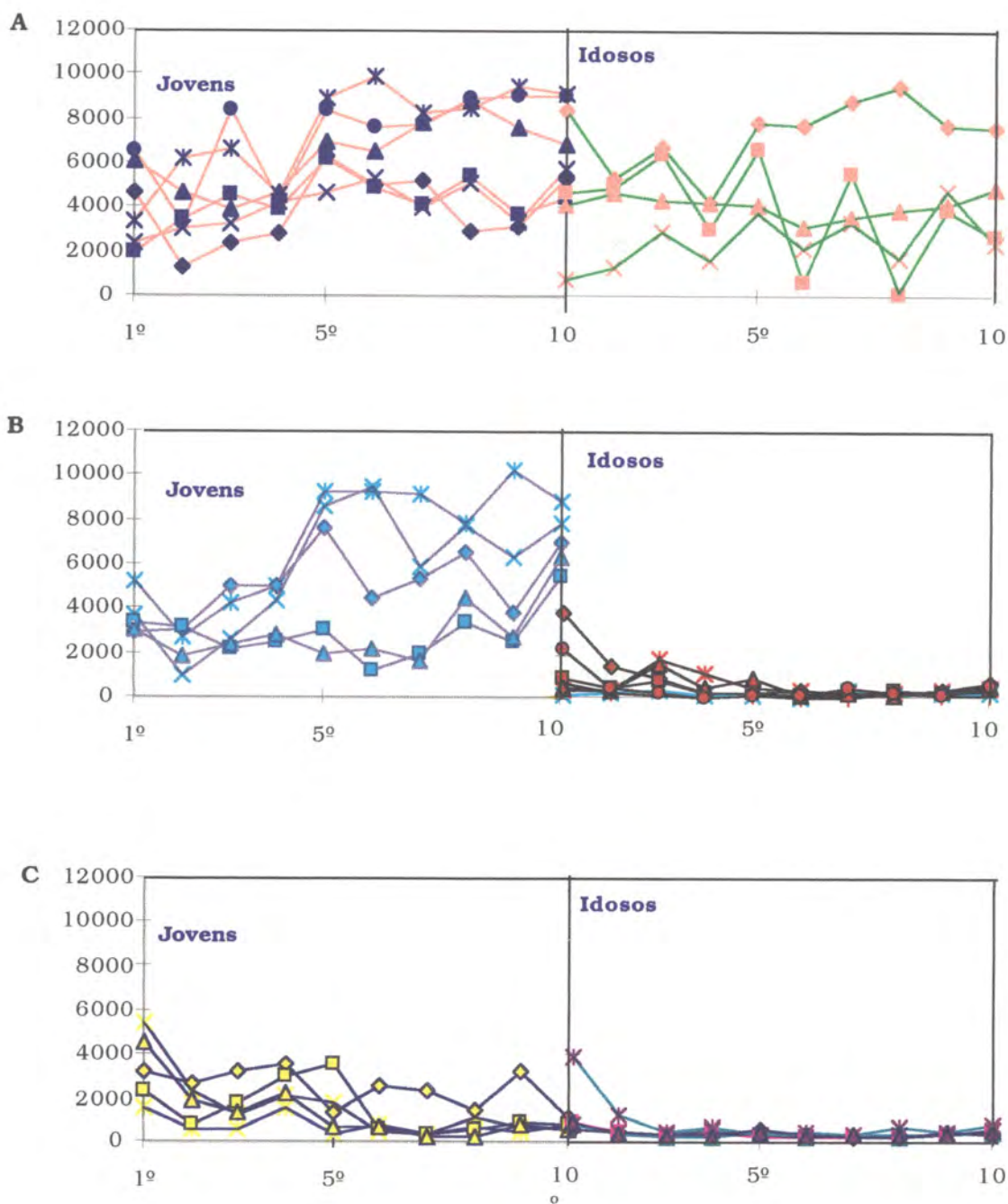


Figura 4.2. Cinética do consumo de clara adoçada durante 10 dias em animais CVj e CVi. Camundongos CVj e CVi normais (A), tolerantes (B) e imunes (C) foram submetidos, 7 dias após a imunização secundária, ao teste de aversão durante 10 dias. Foi oferecido aos animais água e uma solução de clara de ovo adoçada com 0,5% de sacarina. A quantidade de líquido ingerido foi determinada a cada 24 horas de exposição e expressa como mg de solução ingerida. Cada linha no gráfico representa o consumo diário de cada animal.

4.3. Produção de IgA total no muco intestinal após o teste de aversão

A produção de IgA secretória é um evento fisiológico e constitui uma das formas do organismo controlar a entrada de materiais antigênicos. Resolvemos verificar se haveria alguma modificação na produção de IgA, seguinte à exposição de clara, retirando amostras do muco intestinal dos animais CVj, CVi e GFj normais e submetidos aos tratamentos imunogênico e tolerogênico (gavagem com 20 mg de Ova solúvel). Depois de 24 horas de exposição de clara, o muco foi extraído do material fecal e a IgA secretória dosada por ELISA.¹ Nesse e em outros resultados posteriores, convencionamos designar por um sinal positivo o grupo que apresentou aversão e por um sinal negativo o grupo que não apresentou aversão.

Na **Figura 4.3**, observamos que animais CVj tolerantes apresentaram uma diminuição nos níveis de IgA no muco intestinal quando comparados com normais e imunes. Com o envelhecimento (CVi), a diminuição de IgA ocorreu nos animais submetidos ao tratamento imunogênico. Em animais GFj, a produção de IgA no muco foi menor se comparada com os outros modelos estudados. Depois dos dados do ELISA, tentamos correlacionar os níveis de IgA no muco com rejeição à ingestão de clara. Em animais GFj, tanto os grupos submetidos ao tratamento tolerogênico, que preferiram ingerir a clara, quanto imunogênico que tiveram aversão, apresentaram a mesma quantidade de IgA secretória no muco. Em CVi, os grupos submetidos aos tratamentos tolerogênico e imunogênico rejeitaram a clara independente da quantidade diferente ($p < 0,05$) de IgA no muco desses animais. Animais CVj imunes diferiram dos tolerantes, tanto com relação à produção de IgA quanto rejeição de clara. Entretanto, quando comparados com animais normais, não houve diferença na produção de IgA entre os dois grupos. Esses resultados nos levaram a propor que a aversão à ingestão de clara independe da produção de IgA no muco.

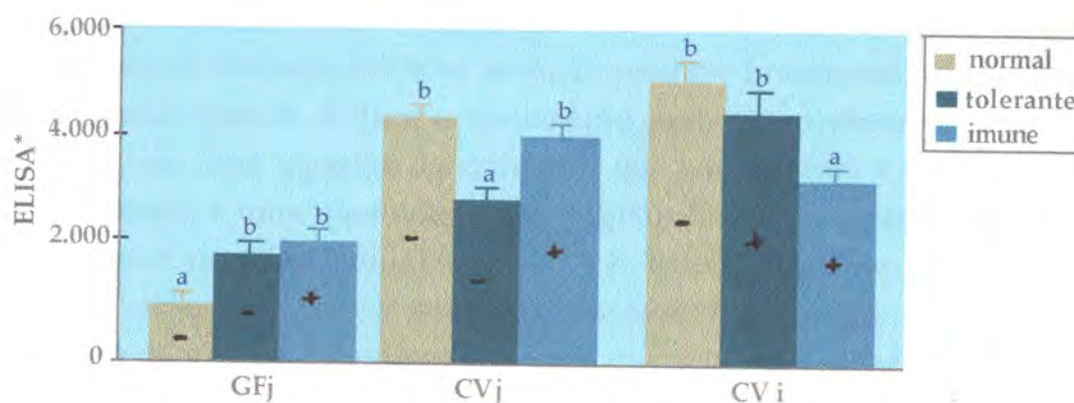


Figura 4.3. Título de IgA total no muco intestinal. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. No final do teste, os animais foram sacrificados, o muco intestinal retirado e a quantidade de IgA total medida por ELISA. Os sinais + e - indicam, respectivamente, que os animais apresentaram ou não aversão. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental, com relação à produção de anticorpos ou consumo de clara (Teste *t* de Student).

4.4. Variações no protocolo de indução da tolerância oral e desencadeamento da aversão à ingestão de clara

Nesse experimento, variações no protocolo de tolerância oral foram feitas para se verificar como diferentes formas de exposição do antígeno, que estariam influenciando a produção de anticorpos específicos, poderiam interferir na ingestão de clara. Grupos de 5 camundongos CVj foram submetidos a diferentes tratamentos orais, 7 dias antes da primeira imunização com o antígeno por via sistêmica (imunização primária). Os animais receberam como pré-tratamento a ingestão *in bolus* do antígeno através de uma ingestão involuntária de 20 mg de Ova solúvel (gavagem), ou a administração gradual através de uma ingestão voluntária (*ad libidum*) de solução de clara de ovo 20%, ou uma ingestão voluntária (*ad libidum*) de Ova solúvel (4mg/ml). Animais que receberam somente as imunizações consistiram o nosso controle experimental. Na **Figura 4.4**, observamos que, com relação à supressão de anticorpos totais específicos, em animais CVj a administração gradual do antígeno através de uma ingestão voluntária com clara de ovo 20% mostrou-se muito mais eficiente na indução de tolerância oral que a administração *in bolus* ($p < 0,05$). E, apesar dos animais terem ficado tolerantes, uma gavagem com 20 mg de Ova solúvel se mostrou o pré tratamento menos eficiente para indução de tolerância oral.

Em todos os grupos tolerantes houve uma preferência ao consumo de clara quando comparados com animais imunes. Entretanto, esse consumo foi tanto maior quanto melhor o tratamento oral, como observado nos animais tratados com uma ingestão de clara 20% que consumiram a mesma quantidade que normais, e uma quantidade maior ($p < 0,05$) que os grupos tolerizados por gavagem e ingestão voluntária de Ova. Pelo padrão de resposta dos dois eventos, tolerância oral e aversão, fica evidente que há uma tendência de aumento do consumo de clara à medida que diminui a produção de anticorpos específicos no soro.

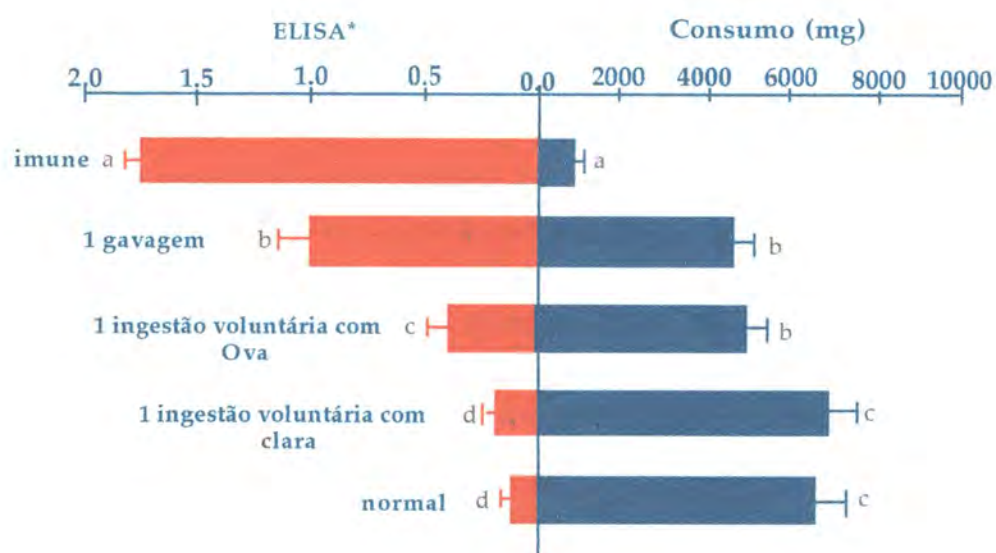


Figura 4.4. Correlação entre produção de anticorpos totais anti-Ova e consumo de clara adocicada em animais CVj submetidos a diferentes tratamentos tolerogênicos. Camundongos CVj, receberam gavagem com 20 mg de Ova ou ingestão voluntária de solução contendo Ova (4mg/ml) ou clara de ovo 20% durante 24 horas. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. No final do teste, os animais foram sacrificados e os anticorpos totais anti-Ova medidos por ELISA. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 ou 8 animais. As letras representam a significância ($p < 0,05$) entre os grupos (Teste *t* de Student) com relação à produção de anticorpos ou consumo de clara.

Em todos os experimentos posteriores, o pré tratamento utilizado para a indução de tolerância foi através de uma gavagem com 20mg de Ova solúvel.

4.5. Correlação entre produção de anticorpos específicos no soro e ingestão de clara

4.5.1. Anticorpos totais

Realizamos análise da produção de anticorpos no soro dos animais dos 3 modelos experimentais, submetidos aos tratamentos tolerogênico, imunogênico e normais, e comparamos com o consumo diário de clara. Para melhor visualização da correlação, optamos por colocar os dois dados (anticorpos e consumo) em um mesmo gráfico.

A **Figura 4.5.1** mostra que animais CVj submetidos ao tratamento tolerogênico produziram títulos significativamente menores quando comparados com os animais submetidos ao tratamento imunogênico ($p < 0,05$). [Podemos dizer então que, com o protocolo utilizado, animais CVj se tornaram imunes ou tolerantes à ovalbumina. Nesses animais, houve uma correlação entre surgimento de anticorpos específicos e rejeição de clara.] Animais CVi também se tornaram tolerantes e imunes com o protocolo utilizado, mas apresentaram um perfil de títulos de anticorpos diferente dos CVj, com uma marcada refratariedade frente aos dois tratamentos. Nesses animais, tanto o grupo submetido ao tratamento tolerogênico como o submetido ao tratamento imunogênico rejeitaram a clara. Animais GFj apresentaram uma particularidade com relação à produção de anticorpos totais específicos, quando comparados com CVj e CVi. Nesses animais, com o mesmo protocolo experimental utilizado para os outros modelos, observamos que o grupo submetido ao tratamento imunogênico produziu tanto anticorpos quanto o grupo submetido ao tratamento tolerogênico ($p > 0,05$), mas continuou rejeitando a clara. Houve uma correlação entre título de anticorpo total anti-Ova no soro e aversão à ingestão de clara em animais B6D2F1, independente da idade (CVj e CVi), mas não em GFj.

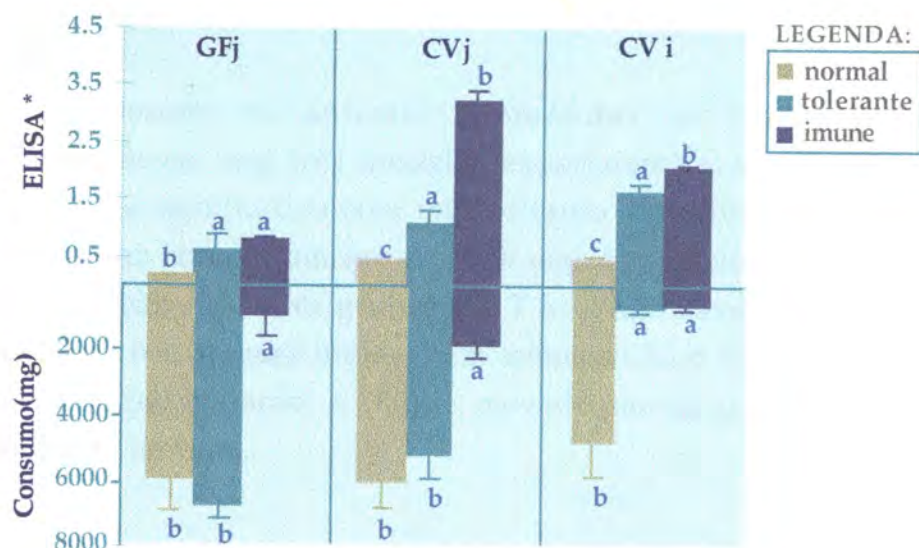


Figura 4.5.1 Correlação entre produção de anticorpos totais e ingestão de clara. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. No final do teste, os animais foram sacrificados e os anticorpos totais anti-Ova medidos por ELISA. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos ou consumo de clara (Teste *t* de Student).

4.5.2. Padrão isotípico no soro antes do teste de consumo de clara

Foi de nosso interesse verificar o padrão dos isotipos no início do teste de aversão. Como estamos trabalhando com comportamento, resolvemos evitar a agressão de uma sangria retro-orbital, pois o estresse dos animais poderia ser uma variável a mais nas análises, interferindo em nossos resultados. Optamos por retirar metade dos animais para as análises de isotipos, e deixar a outra metade para o teste de aversão. Deste modo, 7 dias depois da imunização secundária, metade dos animais foi sacrificada e o soro analisado para os diversos isotipos, no mesmo momento em que com a outra metade foi realizado o teste opcional de ingestão de clara. As **Figuras 4.5.2a a 4.5.2g** mostram a correlação entre os isotipos no soro IgM (a), IgG1 (b), IgG2a (c), IgG2b (d), IgG3 (e), IgA (f) e IgE (g) e o desencadeamento da aversão como descrito abaixo:

4.5.2.a. IgM

Dentre os animais submetidos aos tratamentos tolerogênico e imunogênico, nos três modelos experimentais, somente em CVj houve uma diferença significativa com relação tanto à produção de IgM anti-Ova no soro, quanto no comportamento frente à ingestão de clara. Em animais GFj o título de IgM foi baixo nos três grupos (N, T e I), não havendo correlação com a rejeição de clara nos animais imunes. Em animais CVi o título de IgM foi baixo nos dois grupos que evitaram a clara e elevado no grupo normal que não rejeitou a ingestão de clara.

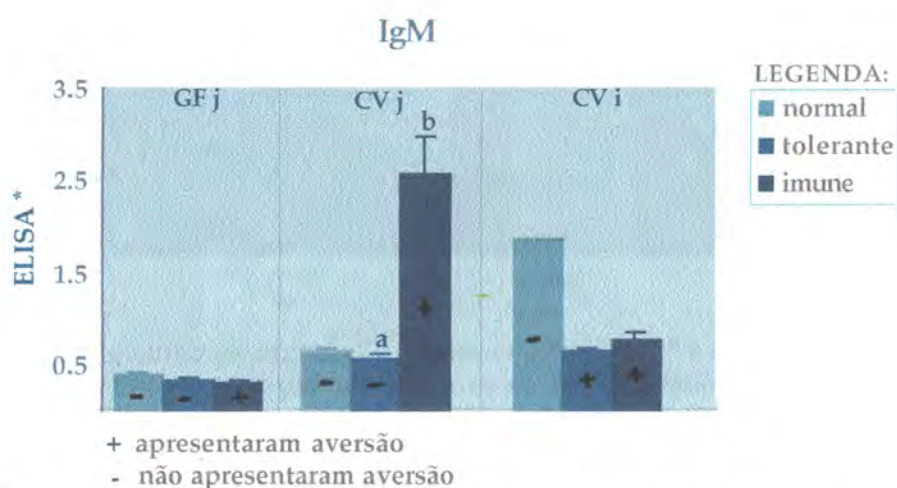


Figura 4.5.2a. Produção de anticorpos IgM. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, parte dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão, onde foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. A outra parte foi sacrificada e o isotipo IgM anti-Ova medido por ELISA. Em animais CVi, o título do grupo normal foi obtido através de um *pool* de soro de 5 animais. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0,05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos (Teste *t* de Student).

4.5.2.b. IgG1

Em animais CVj, o grupo imune apresentou título elevado de IgG1 no soro e aversão à ingestão do antígeno, o que não foi observado no grupo tolerante. Em CVi também foi possível fazer essa correlação, já que tanto o grupo submetido ao tratamento tolerogênico quanto o grupo submetido ao tratamento imunogênico apresentaram altos títulos de IgG1 no soro e aversão à ingestão de clara.

Em animais GFj não foi possível estabelecer essa correlação, uma vez que títulos semelhantes de IgG1 ($p>0,05$) entre os grupos submetidos ao tratamento tolerogênico e imunogênico repercutiram em diferente comportamento frente à ingestão de clara.

Somente animais CVj e CVi mostraram uma correlação entre quantidade significativa de IgG1 anti-Ova no soro e aversão à ingestão de clara.

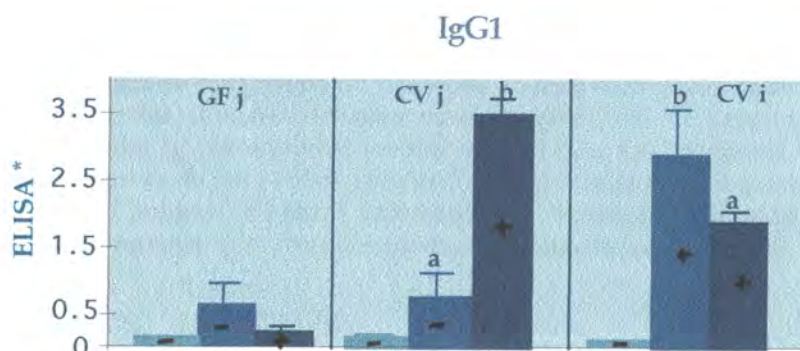


Figura 4.5.2b. Produção de anticorpos IgG1. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, parte dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão, onde foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. A outra parte foi sacrificada e o isotipo IgG1 anti-Ova medido por ELISA. Em animais CVi, o título do grupo normal foi obtido através de um *pool* de soro de 5 animais. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p<0.05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos (Teste *t* de Student).

4.5.2.c. IgG2a

Animais CVj tolerantes, que não tiveram aversão à ingestão de clara, apresentaram uma menor quantidade de IgG2a no soro quando comparados com o grupo imune, que apresentou aversão. Diferente do resultado obtido com esse modelo experimental, animais GFj não mostraram qualquer relação entre produção de IgG2a e desencadeamento da aversão. Em animais CVi, tanto o grupo submetido ao tratamento tolerogênico quanto imunogênico apresentaram altos títulos de IgG2a no soro e rejeitaram a clara.

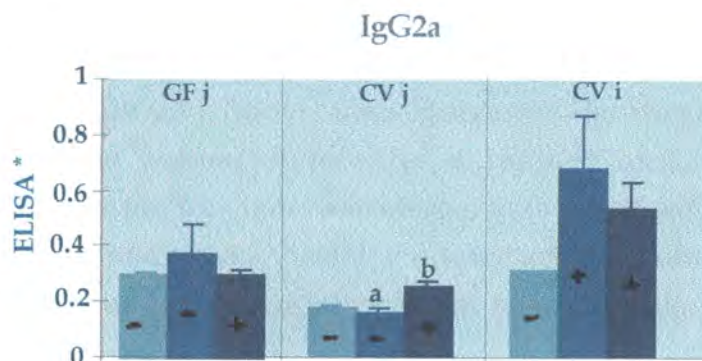


Figura 4.5.2c. Produção de anticorpos IgG2a. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, parte dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão, onde foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. A outra parte foi sacrificada e o isotipo IgG2a anti-Ova medido por ELISA. Em animais CVi, o título do grupo normal foi obtido através de um *pool* de soro de 5 animais. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos (Teste *t* de Student).

4.5.2.d. IgG2b

Não houve diferença significativa no título de IgG2b entre os grupos tolerante, que consumiu a clara e imune que apresentou aversão, tanto em GFj como CVj. Portanto, não houve qualquer correlação entre presença de IgG2b no soro e desencadeamento da aversão.

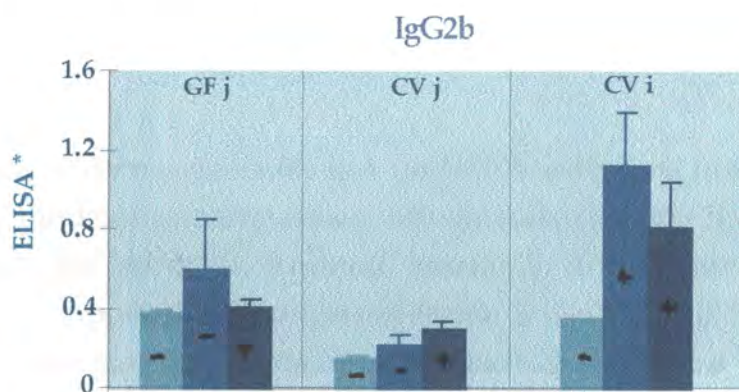


Figura 4.5.2d. Produção de anticorpos IgG2b. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, parte dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão, onde foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. A outra parte foi sacrificada e o isotipo IgG2b anti-Ova medido por ELISA. Em animais CVi, o título do grupo normal foi obtido através de um *pool* de soro de 5 animais. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos (Teste *t* de Student).

4.5.2.e. IgG3

Em animais CVj houve uma diferença significativa na quantidade de IgG3 no soro de animais tolerantes e imunes que também apresentaram diferença na ingestão de clara. Entretanto, essa correlação não foi observada em GFj nem em animais CVi. Neste modelo, grupos submetidos ao tratamento tolerogênico e imunogênico apresentaram mesmo título de IgG3 e rejeitaram a clara.

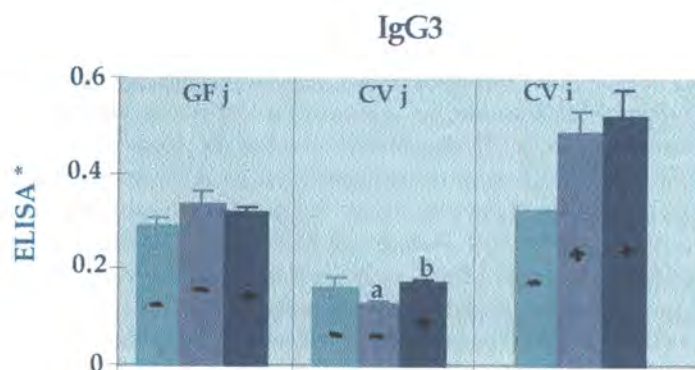


Figura 4.5.2e. Produção de anticorpos IgG3. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μ g de Ova em 1 mg de Al(OH)₃ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μ g do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, parte dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão, onde foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. A outra parte foi sacrificada e o isotipo IgG3 anti-Ova medido por ELISA. Em animais CVi, o título do grupo normal foi obtido através de um pool de soro de 5 animais. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0,05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos (Teste *t* de Student).

4.5.2.f. IgA

Não houve correlação entre IgA no soro e aversão à ingestão de clara em todos os três modelos experimentais. Em animais GFj não houve diferença no título de IgA no soro de animais normais, tolerantes e imunes, que apresentaram comportamento diferente frente à ingestão de clara. Em CVj, no grupo normal que ingeriu a clara, a quantidade de IgA foi a mesma do grupo imune que apresentou aversão. Em CVi, os três grupos apresentaram mesma quantidade de IgA no soro, sendo que animais submetidos ao tratamento tolerogênico e imunogênico rejeitaram a clara, ao contrário dos normais.

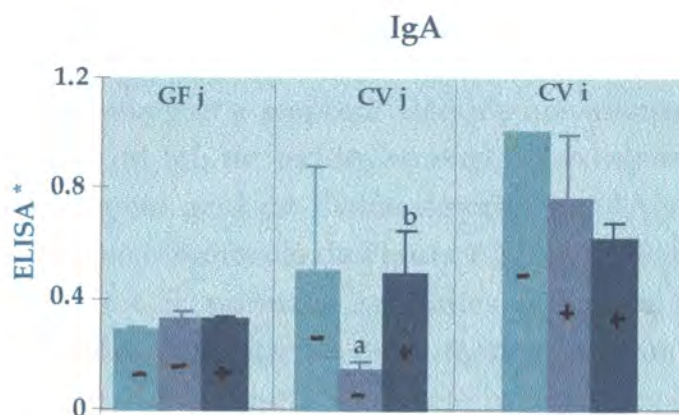


Figura 4.5.2f. Produção de anticorpos IgA. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μg de Ova em 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μg do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, parte dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão, onde foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. A outra parte foi sacrificada e o isotipo IgA anti-Ova medido por ELISA. Em animais CVi, o título do grupo normal foi obtido através de um *pool* de soro de 5 animais. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos (Teste *t* de Student).

4.5.2.g. IgE

Animais CVi se mostraram menos susceptíveis à indução de tolerância oral pra IgE, apresentando níveis elevados desse isotipo no soro. Em todos os modelos experimentais analisados, CVj, CVi e GFj, houve uma correlação entre produção de IgE e desencadeamento da aversão à ingestão de clara.

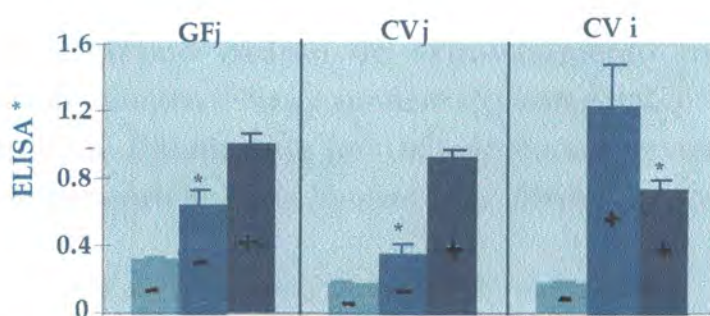


Figura 4.5.2g. Produção de anticorpos IgE. Camundongos CVj, CVi e GFj receberam gavagem com 20 mg de Ova. Sete dias após o pré-tratamento, os animais receberam 10 μg de Ova em 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (sc). Catorze dias após, os animais receberam 10 μg do antígeno solúvel (sc). Sete dias após, parte dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão, onde foi medido o consumo (mg), por 24 horas, das soluções de água ou clara com 0,5% de sacarina. A outra parte foi sacrificada e o isotipo IgE anti-Ova medido por ELISA. Em animais CVi, o título do grupo normal foi obtido através de um *pool* de soro de 5 animais. Cada barra representa a média \pm o EPM para grupos de 5 a 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos do mesmo modelo experimental com relação à produção de anticorpos (Teste *t* de Student).

4.6. Resposta Alérgica

Resolvemos analisar a resposta alérgica nos animais, como uma medida indireta da análise de IgE no tecido, através do extravasamento da albumina plasmática corada pelo azul de Evans descrito por JANCAR e colaboradores (1991), de acordo com o protocolo da **Figura 3.2**. Nesse experimento, metade dos animais CVj, CVi e GFj, normais, tolerantes e imunes foram submetidos ao teste de permeabilidade vascular e a outra metade ao teste de aversão, para com isso estabelecermos uma correlação do efeito biológico desses isotipos com o padrão de ingestão de clara.

A introdução sistêmica do antígeno (via endovenosa) produziu um efeito localizado (**Figura 4.6.1**) detectado pelo aumento da permeabilidade vascular em fragmentos de porções proximais do intestino delgado (duodeno e jejuno proximal), de animais GFj submetidos ao tratamento imunogênico. Animais submetidos ao tratamento tolerogênico e normais apresentaram baixo nível de extravasamento.

Os outros órgãos como baço, rim, fígado, pulmão e estômago apresentaram um nível basal de resposta, em torno de 500 μ g, em todos os grupos (normal, tolerante e imune).

Apesar de uma maior intensidade, animais CVj imunes (**4.6.2**) apresentaram um padrão de extravasamento do azul de Evans semelhante aos animais GFj, ou seja, com uma resposta maior em porções proximais do intestino delgado (duodeno). Como para GFj, animais tolerantes e normais apresentaram mesmo padrão de extravasamento frente à administração endovenosa do antígeno. Nesse modelo experimental, podemos observar ainda uma quantidade significativa ($p < 0,05$) do corante extravasado no estômago, quando comparamos animais imunes com tolerantes e normais.

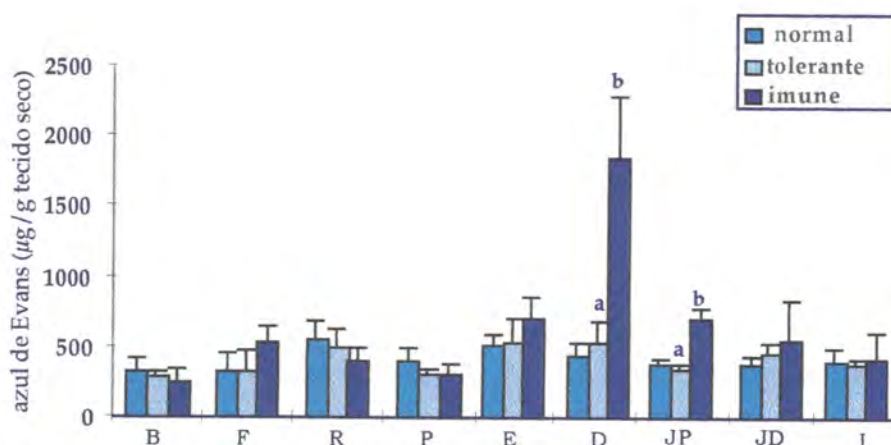


Figura 4.6.1. Permeabilidade vascular à albumina plasmática corada pelo azul de Evans em animais GFj normais, tolerantes e imunes. Animais normais (N), tolerantes (T) e imunes (I) receberam, sete dias após a imunização secundária, uma injeção com 100 µg de Ova em azul de Evans (40mg/Kg) na veia da cauda. Dez minutos depois foram sacrificados para realização da necrópsia, em que vários órgãos foram retirados para análise. A quantidade de corante extravasada foi determinada por comparação da curva padrão de diluições seriadas do corante, e expressa como µg de azul de Evans/g de tecido seco. Abreviações: baço (B), fígado (F), rim (R), pulmão (P), estômago (E), duodeno (D), jejuno proximal (JP), jejuno distal (JD), íleo (I). Cada barra representa a média ± o EPM para grupos de 5 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos tolerante e imune (Teste *t* de Student).

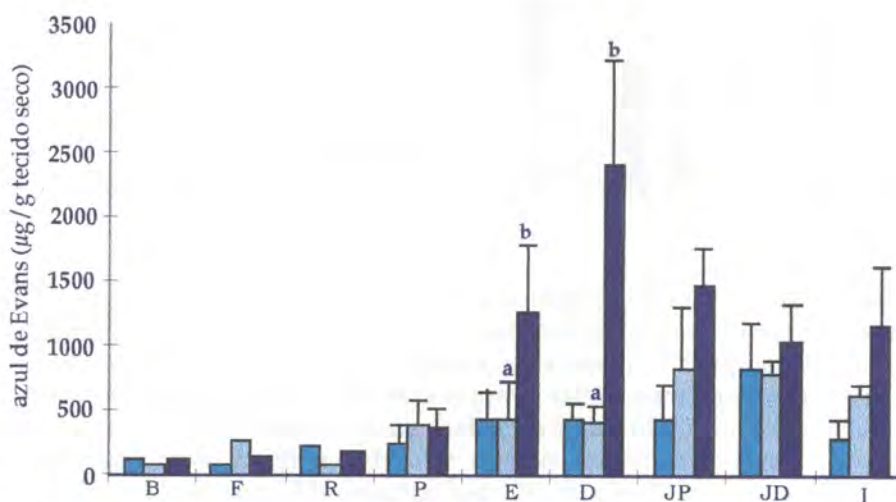


Figura 4.6.2. Permeabilidade vascular à albumina plasmática corada pelo azul de Evans em animais CVj normais, tolerantes e imunes. Animais normais (N), tolerantes (T) e imunes (I) receberam, sete dias após a imunização secundária, uma injeção com 100 µg de Ova em azul de Evans (40mg/Kg) na veia da cauda. Dez minutos depois foram sacrificados para realização da necrópsia, em que vários órgãos foram retirados para análise. A quantidade de corante extravasada foi determinada por comparação da curva padrão de diluições seriadas do corante, e expressa como µg de azul de Evans/g de tecido seco. Abreviações: baço (B), fígado (F), rim (R), pulmão (P), estômago (E), duodeno (D), jejuno proximal (JP), jejuno distal (JD), íleo (I). Cada barra representa a média ± o EPM para grupos de 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos tolerante e imune (Teste *t* de Student).

Uma quantidade ainda menor do corante foi detectada em órgãos como baço, fígado e rim. O pulmão apresentou o mesmo nível basal de resposta observado em animais GFj (4.6.2).

Também em animais imunes CVi (4.6.3), o órgão de maior resposta frente à injeção endovenosa de Ova foi o trato gastrointestinal, como nos outros modelos, com destaque para duodeno, jejuno proximal e estômago. Nesse modelo experimental, o grupo submetido ao tratamento tolerogênico, que rejeitou a clara, apresentou o mesmo padrão de extravasamento que animais imunes e significativamente diferente dos animais normais, que preferiram consumir a clara. Igualmente para animais CVi e GFj, baço, fígado, rim e pulmão tiveram pequeno extravasamento.

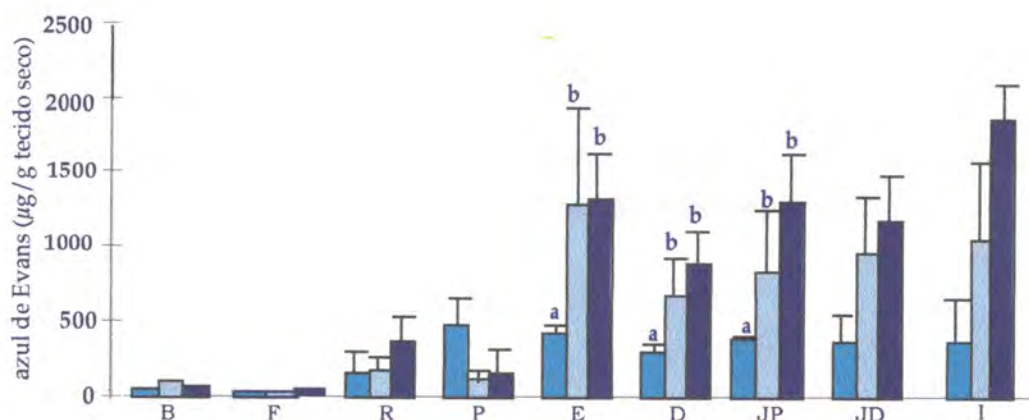


Figura 4.6.3. Permeabilidade vascular à albumina plasmática corada pelo azul de Evans em animais CVi normais, tolerantes e imunes. Animais normais (N), tolerantes (T) e imunes (I) receberam, sete dias após a imunização secundária, uma injeção 100 µg de Ova em azul de Evans (40mg/Kg) na veia da cauda. Dez minutos depois foram sacrificados para realização da necrópsia, em que vários órgãos foram retirados para análise. A quantidade de corante extravasada foi determinada por comparação da curva padrão de diluições seriadas do corante, e expressa com µg de azul de Evans/g de tecido seco. Abreviações: baço (B), fígado (F), rim (R), pulmão (P), estômago (E), duodeno (D), jejuno proximal (JP), jejuno distal (JD), íleo (I). Cada barra representa a média ± o EPM para grupos de 7 animais. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos normal, tolerante e imune (Teste *t* de Student).

4.7. Avaliação morfológica

Após 2 horas de ingestão de clara opcional.

Retiramos a língua e o intestino delgado dos camundongos convencionais jovens. Analisamos comparativamente os cortes histológicos de animais imunes, tolerantes e normais.

A Figura 4.7.1 mostra fotomicrografias de língua de camundongos CVj normais (A), tolerantes (B) e imunes (C) após 2 horas de consumo opcional de clara. Não houve diferença na estrutura do epitélio de revestimento (pavimentoso estratificado queratinizado) entre os três grupos. Nos animais imunes, houve um sutil aumento da celularidade da camada subepitelial quando comparado com animais normais e tolerantes. A muscular da língua se apresentou com o mesmo padrão morfológico nos três grupos.

Na Figura 4.7.2 observamos que não houve alteração morfológica detectável no duodeno de animais CVj tolerantes (B) e imunes (C) quando comparados com os normais (A), após 2 horas de ingestão voluntária de clara, em todos os parâmetros analisados (altura dos vilos, celularidade da *lamina propria*, altura da cripta e distância entre as vilosidades). As demais porções do intestino delgado (jejuno e íleo) também não apresentaram alterações significativas.

Após 24 horas de ingestão de clara opcional e não opcional por camundongos convencionais.

Nesses resultados, não apresentamos a histologia dos animais normais por motivo de redundância de dados, pois estes assemelharam-se ao padrão observado no grupo tolerante.

Na Figura 4.7.3, observamos que animais CVj imunes (B), que tiveram aversão, apresentaram a mucosa duodenal com espessura igual a de animais tolerantes (A). As demais porções intestinais também não apresentaram alterações. Não foram verificadas alterações significativas quando camundongos jovens convencionais tiveram como única opção líquida a clara de ovo (C - tolerante e D - imune).

Após 24 horas de ingestão de clara opcional e não opcional por camundongos isentos de germes (GF).

Animais GFj (**Figura 4.7.4.**) imunes (**B**) e tolerantes (**A**) não apresentaram diferença significativa na morfologia do duodeno, quando da ingestão opcional de clara. No entanto, quando esta solução foi a única fonte líquida, camundongos GFj imunes apresentaram alterações na mucosa do duodeno. Podemos observar que houve um espessamento do vilo com aumento da celularidade *nalamina propria*, uma discreta distensão da mucosa e aumento da profundidade das criptas (**Figura 4.7.4-D**). O mesmo não aconteceu quando camundongos GFj tolerantes tiveram como única opção líquida a clara (**Figura 4.7.4-C**). As demais porções intestinais não apresentaram alterações tão significativas. Essas alterações observadas são contrastantes com os padrões morfológicos de um animal GFj normal.

Em todos os grupos analisados não foram observadas alterações no baço e no fígado.

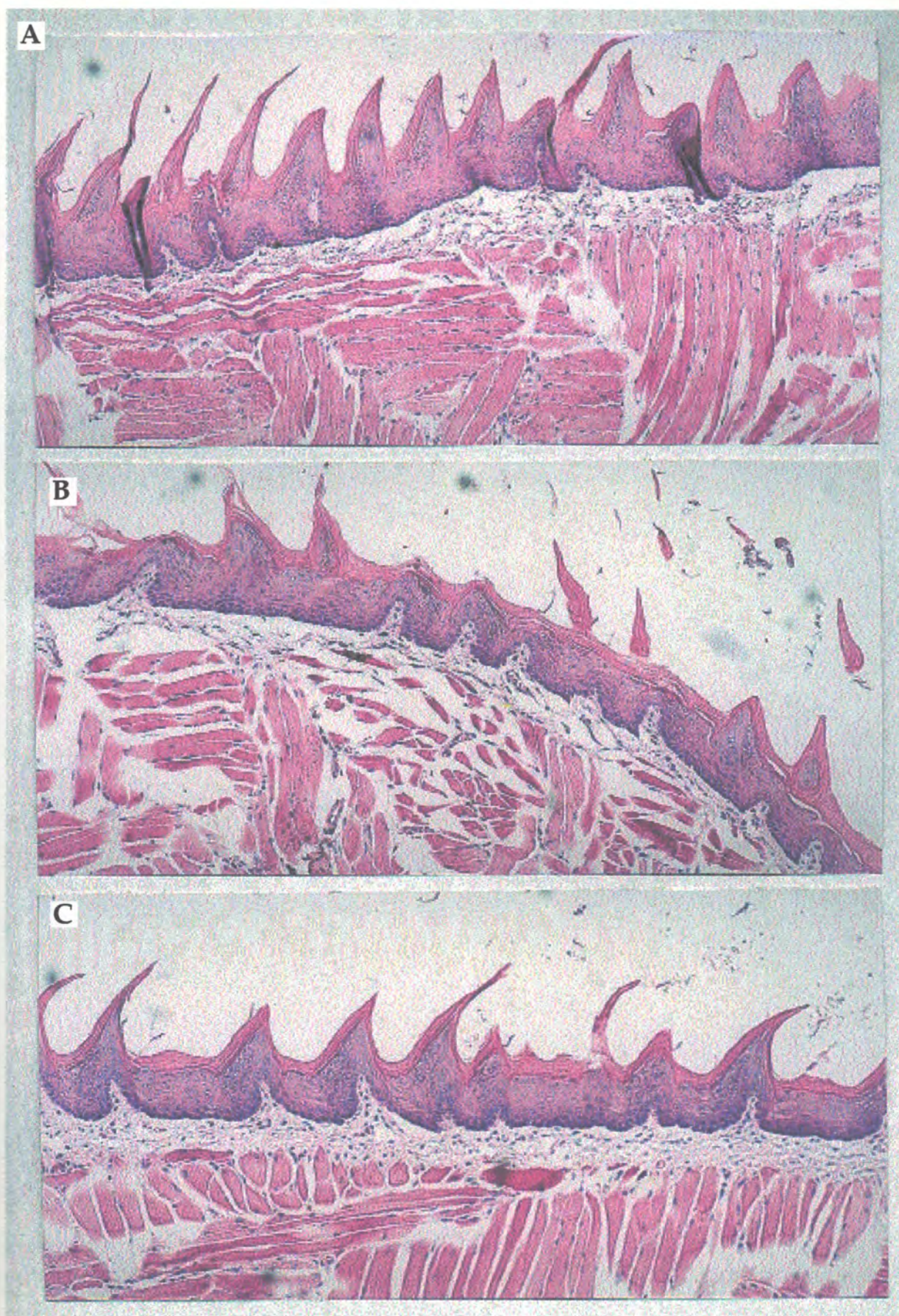


Figura 4.7.1. Fotomicrografia de língua de camundongo normal (A), tolerante (B) e imune (C) após 2 horas de consumo opcional de clara de ovo. H&E, aumento original 148X.

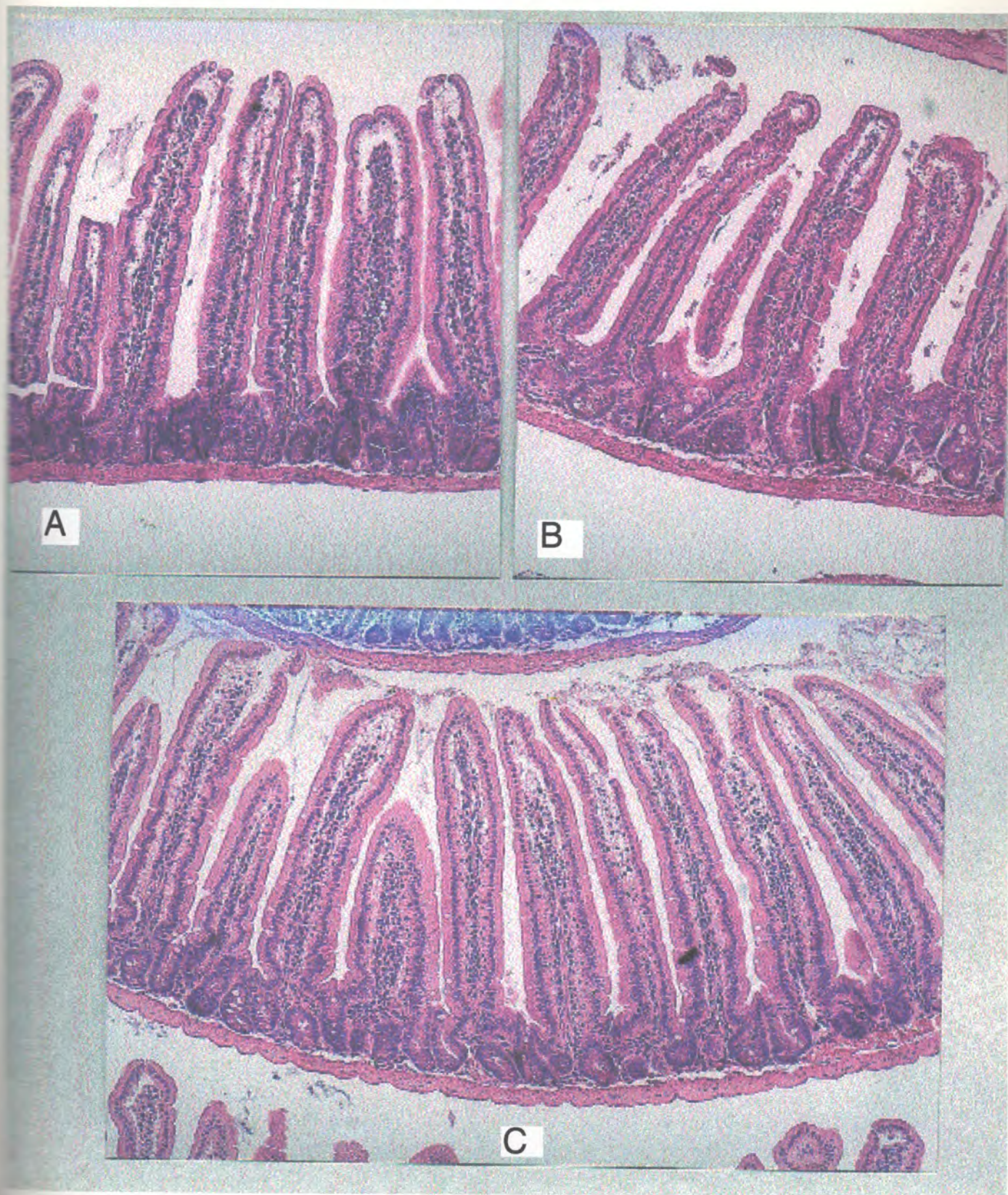


Figura 4.7.2. Fotomicrografia de duodeno de camundongo normal (A), tolerante (B) e imune (C) após 2 horas de consumo opcional de clara de ovo. H&E, aumento original 148X.

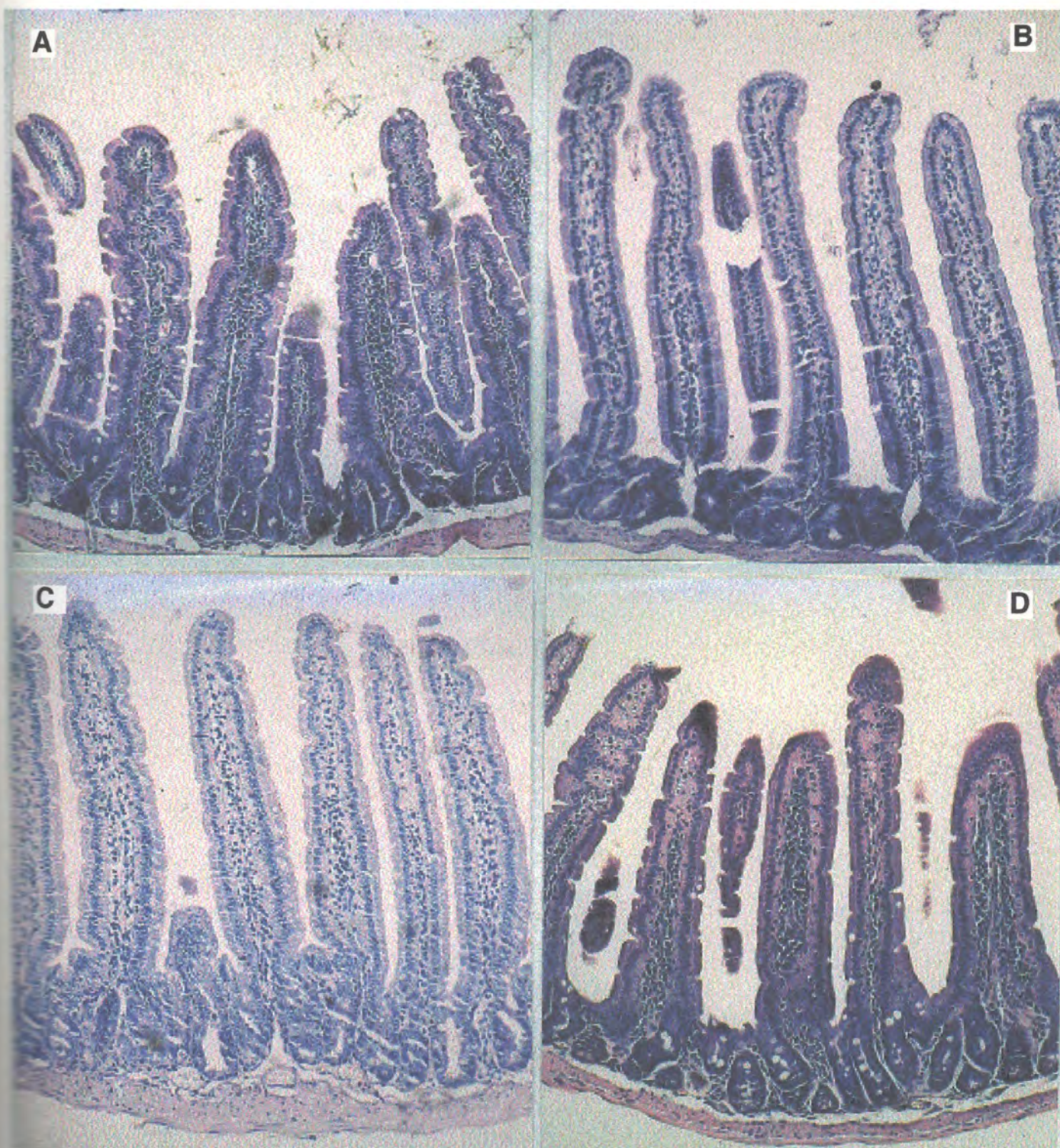


Figura 4.7.3. Fotomicrografia de duodeno de camundongo convencional jovem tolerante (A e C) e imune (B e D) após 24 horas de consumo opcional (A e B) e não opcional (C e D) de clara de ovo. H&E, aumento original 148X.

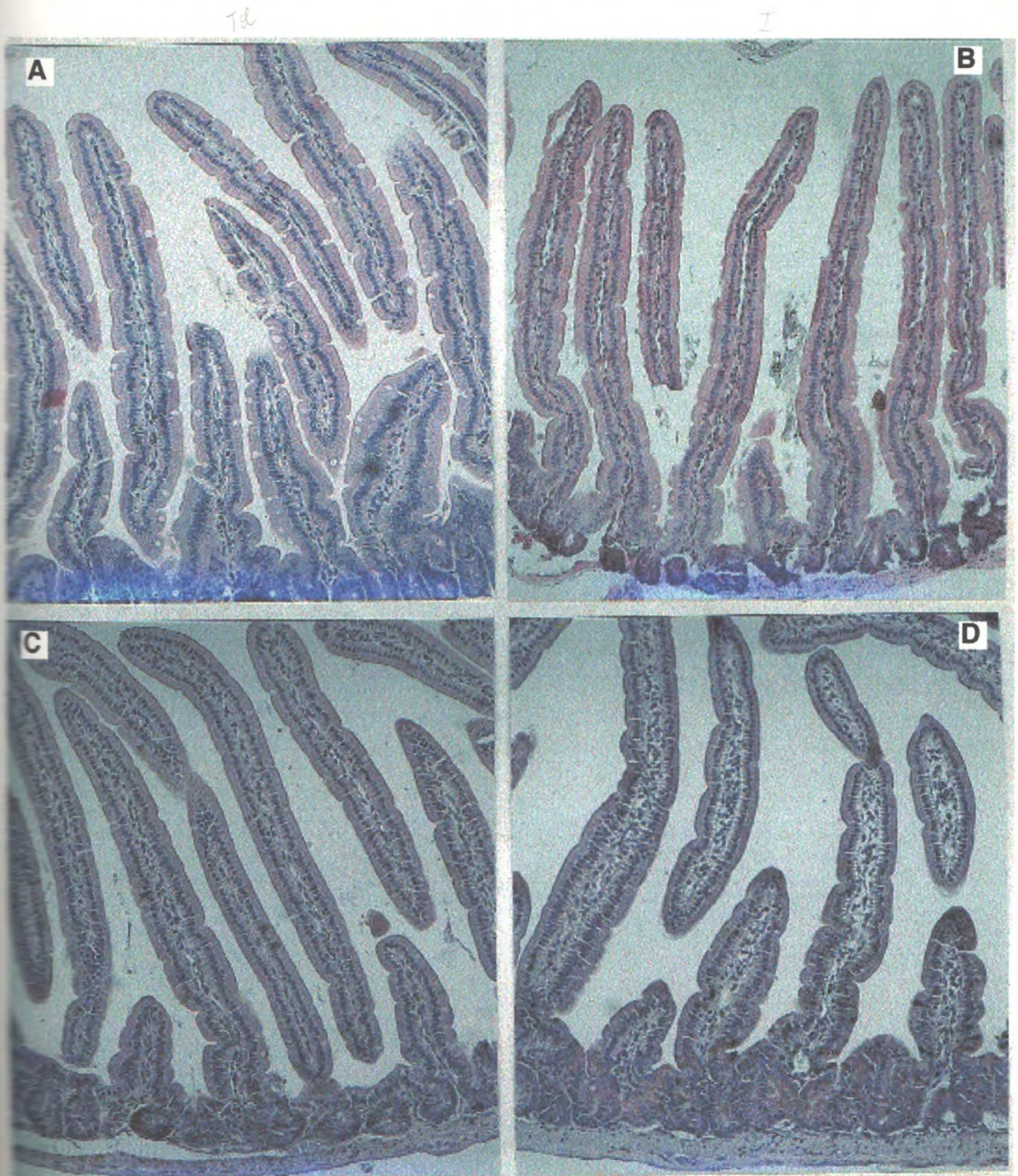


Figura 4.7.4. Fotomicrografia de duodeno de camundongo germfree jovem tolerante (A e C) e imune (B e D) após 24 horas de consumo opcional (A e B) e não opcional (C e D) de clara de ovo. H&E, aumento original 148X.

4.8. Avaliação Morfométrica

Foram feitas medidas da altura do vilão, da espessura total da mucosa e da profundidade das criptas, nas porções do duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo de camundongos CVj, CVi e GFj normais, imunes e tolerantes, conforme descrito no item 3.11.3.

Não houve alteração em qualquer um dos parâmetros analisados no duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo de camundongos dos grupos mencionados, após ingestão opcional de clara durante 24 horas (dados não mostrados).

Em outros experimentos, apenas animais CVj foram ofertados com clara como única opção líquida durante 10 dias. Por problemas de manutenção de condições estéreis durante um longo período, essa análise não foi feita com animais GFj.

Conforme representado na **Figura 4.8**, houve uma significativa diminuição da altura do vilão do duodeno, jejuno proximal e jejuno distal de camundongos CVj imunizados com ovalbumina, após ingestão de clara sem outra opção líquida a partir do 10º dia de ingestão.

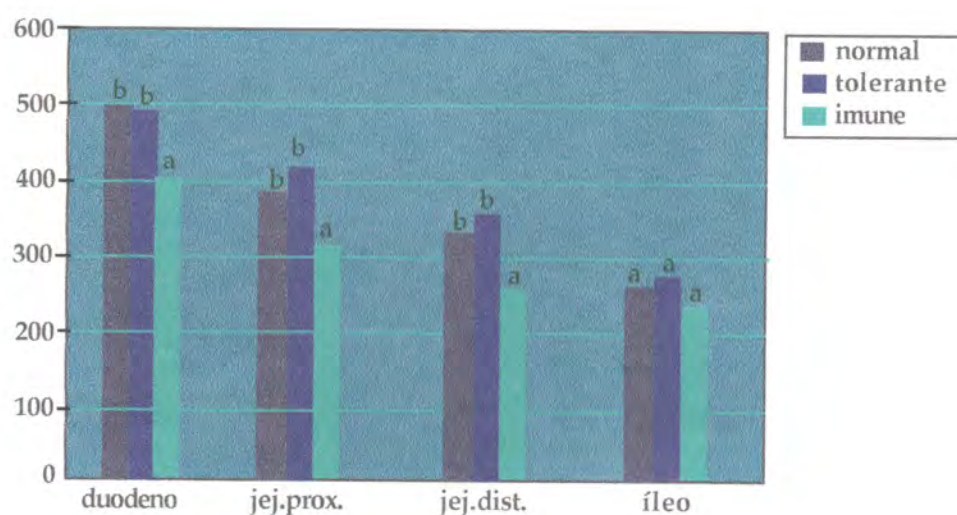


Figura 4.8.- Análise morfométrica das porções do intestino de animais CVj. Altura do vilão (μm) de duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo de camundongos CVj normais, tolerantes e imunes, após ingestão de clara como única fonte líquida durante 10 dias. A mamadeira contendo clara foi colocada 7 dias após a imunização secundária com ovalbumina. As letras representam a significância ($p < 0.05$) entre os grupos, quando comparado o mesmo segmento. ANOVA- Tukey.

Discussão

5.1. Importância do *status* imunológico na aversão à ingestão de clara

Em vida livre, vários fatores interferem na escolha alimentar de um animal. Apesar de não termos estudado preferência alimentar, pois realizamos análises com somente uma fonte proteica, a ovalbumina, nossos resultados nos permitem dizer que o *status* imunológico interfere no comportamento alimentar de um animal. VAZ e colaboradores (1981), ACCIOLY e colaboradores (1983), CARA (1995) e CARA e colaboradores (1994;1997) descreveram um fenômeno no qual observaram que animais B6D2F1 jovens, previamente imunizados com ovalbumina e que tiveram opção de escolher entre uma solução de clara de ovo e água, evitaram a ingestão do antígeno ao qual foram imunizados. Investimos no estudo desse fenômeno como um possível mecanismo natural de seleção de dietas. Confirmamos os resultados obtidos pelos autores como pode ser observado na **Figura 4.1.1**, em que animais CVj imunizados com ovalbumina reduziram o consumo de clara em aproximadamente 17%, ao contrário de tolerantes e normais. Acrescentamos aos resultados obtidos por CARA, que a aversão a um antígeno ao qual se é imunizado se trata de um fenômeno abrangente, uma vez que independe da idade do animal e da flora intestinal.

A utilização da sacarina tem como objetivo tornar o sabor da clara de ovo mais agradável. Não há possibilidade dessa aversão ser devido ao efeito desse adoçante, pois CARA (1995) demonstrou que animais imunizados com ovalbumina não rejeitaram a ingestão de água com sacarina. Não há indicações de que a sacarina interfira na absorção da ovalbumina pelo intestino, como ocorre com açúcares como a glicose (ATISOOK e MADARA, 1991), que causam aumento da permeabilidade a oligopeptídeos.

A aversão é um fenômeno tão intenso, que mesmo tendo a clara como única opção líquida, os animais imunes consumiram uma quantidade pequena da solução, ao contrário dos tolerantes e normais (**Figura 4.1.2**). No teste de consumo não opcional esperávamos que os animais mantivessem o mesmo padrão observado no teste opcional, mas aumentassem a ingestão de clara por ser única fonte líquida ofertada. Na realidade, a quantidade ingerida por animais imunes GFj sem opção foi a mesma que no teste opcional, aproximadamente 1500 mg.

A literatura tem descrito que só o fato do animal ser imunizado já ocorre uma redução específica da entrada de proteína, devido a formação de complexo antígeno-IgA secretória no lúmen intestinal que impede a captação do antígeno pela mucosa (KRAEHENBUHL e NEUTRA, 1994). Entretanto, em nossos resultados, a rejeição da ingestão de clara nos animais imunizados não foi dependente da produção de IgA secretória, como demonstrado na **Figura 4.3**. A presença dessa imunoglobulina no muco intestinal, não determinou o desencadeamento da aversão em qualquer modelo experimental (CVj, CVi e GFj). Confirmando os resultados obtidos por SENDA e colaboradores (1988), que demonstraram alterações relacionadas com a senescência na quantidade de IgA secretória, animais CVi normais apresentaram títulos mais elevados de IgA que CVj. Houve também, nos CVi, um aumento do título no grupo submetido ao tratamento tolerogênico e redução no grupo imune. O fato de animais GFj apresentarem quantidades menores de IgA que CVj e CVi, pode ser devido a um GALT pouco estimulado pela ausência da flora intestinal. Nessa dissertação, estamos propondo um mecanismo adicional iniciado no intestino, em que o organismo controlaria o desenvolvimento de patologias causadas por alimentos através de eventos imunológicos que não somente produção de IgA secretória.

Acompanhamos a cinética do fenômeno da aversão durante um período de 10 dias de exposição opcional, com medidas diárias do consumo. A **Figura 4.2** mostra que a aversão em animais imunizados CVj e CVi é um evento de longa duração, ocorrendo desde o primeiro até o último dia em que a clara foi exposta. Animais CVi submetidos ao tratamento tolerogênico, mas que não se tornaram tolerantes por apresentarem altos títulos de anticorpos anti-Ova no soro (**Figura 4.5.1**), rejeitaram a clara com o mesmo padrão observado nos animais imunes. Durante uma exposição prolongada de clara, houve uma tendência à maior variabilidade no consumo quanto menor a quantidade de anticorpos específicos no soro.

Em 1995, CARA verificou uma relação entre produção de anticorpos totais anti-Ova e o desencadeamento da aversão à ingestão de clara. Uma das evidências a favor dessa correlação foi o fato da aversão já ser evidenciada no 14º dia após a imunização primária, quando o aumento dos níveis séricos de anticorpos (IgM e IgG) anti-Ova também é significativo, e acentuar-se no 21º dia quando os níveis de anticorpos específicos estão mais elevados; outra que a aversão foi observada em animais imunizados por via oral, através da administração de 3 gavagens intercaladas de ovalbumina.

Nossos resultados, suportados com trabalhos descritos por outros autores (VAZ *et al.*, 1983; CARA, 1995; CARA *et al.*, 1998) não deixam dúvidas de que o sistema imune está participando da preferência alimentar.

Acreditamos que a utilização de artifícios biológicos que de alguma maneira interferissem na produção de anticorpos como, variações no protocolo de exposição oral do antígeno, ausência de flora intestinal e envelhecimento, foi esclarecedor no estudo dessa correlação.

5.2. Artifícios Biológicos e Aversão à ingestão de clara

5.2.1. Tolerância Oral

Utilizando a tolerância oral como um modelo para o estudo da aversão, verificamos, na **Figura 4.4**, que em animais CVj submetidos a diferentes pré tratamentos orais houve uma tendência a um maior consumo de clara quanto melhor a eficácia do pré-tratamento.

A administração gradual do antígeno, através da ingestão voluntária com clara de ovo 20%, foi o pré-tratamento mais eficaz para a supressão de anticorpos totais anti-Ova no soro, confirmando os resultados de FICKER (1998). E nesses animais, o consumo de clara foi maior que nos grupos submetidos aos outros tipos de pré-tratamento oral. Nossos resultados sugerem que a supressão de anticorpos específicos durante a tolerância oral é importante para o animal não rejeitar a ingestão de clara.

5.2.2. Envelhecimento e Ausência da Flora Intestinal

Na parte superior da **Figura 4.5.1** verificamos animais idosos (CVi) se tornaram menos tolerantes que animais jovens (CVj). Nossos resultados confirmaram os trabalhos de FARIA e colaboradores (1993;1998), que demonstraram que o envelhecimento é acompanhado de uma redução na susceptibilidade de indução de tolerância oral e de FICKER (1998), em que o tratamento oral com uma gavagem com 20 mg de Ova, foi o menos eficiente na indução de tolerância oral em animais idosos. Também observamos uma

refratariedade em animais CVi submetidos ao tratamento imunogênico, confirmando os resultados de FARIA e colaboradores (1993;1998).

É amplamente discutido na literatura a importância da microbiota intestinal na susceptibilidade às intervenções imunológicas. Alguns autores têm demonstrado que animais GFj podem responder imunologicamente a bactérias, proteínas solúveis e eritrócitos. WANNEMUEHLER e colaboradores (1982) demonstraram que GFj apresentaram resposta imune primária (IgM) e secundária (IgM, IgG1, IgG2a e IgA) a eritrócito de carneiro (SRBC, *Sheep Red Blood Cells*), só que significativamente menor que CVj. Eles observaram também que se administrado durante um período prolongado, SRBC é capaz de induzir tolerância oral em animais CVj, mas não em GFj. Já MOREAU e CORTHER (1988), propuseram que a importância da microflora intestinal para a indução de tolerância oral pode depender do antígeno usado, já que em seus experimentos eles conseguiram tolerizar animais GFj para ovalbumina, mas a resposta não pôde ser mantida. Segundo SUDO e colaboradores (1997), a cinética de produção de anticorpos de animais GFj é diferente dos CVj e a flora bacteriana não interfere na indução de tolerância oral, mas sim na sua manutenção. Nossos resultados confirmam os dados de SUDO uma vez que animais GFj submetidos ao tratamento imunogênico apresentaram baixos títulos de anticorpos totais específicos uma semana após o segundo desafio com a ovalbumina solúvel.

Essa variabilidade com relação à produção de anticorpos observada com o envelhecimento e ausência da flora bacteriana intestinal, confirmaram nossa expectativa para a utilização desses modelos animais para estudarmos a correlação entre produção de anticorpos específicos e aversão à ingestão de clara.

Então, partindo para o estudo dessa correlação, acreditamos que a aversão nitidamente evidenciada nos animais CVi submetidos ao tratamento tolerogênico (**Figura 4.5.1**), foi devido ao aumento do título de anticorpos específicos em níveis semelhantes aos do grupo submetido ao tratamento imunogênico. Animais que ficaram tolerantes, nos modelos GFj e CVj, e animais normais em todos os modelos experimentais não apresentaram aversão à ingestão de clara. Entretanto, essa correlação não pôde ser estabelecida em animais GFj, uma vez que o grupo submetido ao tratamento imunogênico apresentou títulos semelhantes ao grupo tolerante, mas rejeitou a ingestão de clara. Esse resultado nos levou às seguintes suposições: ou o anticorpo não está

envolvido no desencadeamento da aversão e o que observamos são dois fenômenos independentes; ou uma determinada classe de anticorpo pode ser importante para o fenômeno mas está sendo "mascarada" quando analisamos anticorpos totais.

Ao analisarmos o padrão isotípico no soro dos animais no início do teste opcional, nosso objetivo foi verificar se haveria diferença no título de determinado isotipo entre os animais que rejeitaram ou consumiram a clara. Nas Figuras 4.5.2a a 4.5.2f, os resultados nos levaram a descartar o envolvimento de IgM, IgA e dos isotipos da subclasse G como IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 na rejeição à ingestão de clara. Não houve uma uniformidade na análise entre os grupos tolerantes, imunes e normais, em todos os modelos experimentais, nos quais a presença de cada isotipo pôde ser correlacionada com o desencadeamento da aversão à ingestão de clara.

(Entretanto, em todos os modelos experimentais, foi possível estabelecer uma correlação entre presença de IgE no soro e rejeição à ingestão de clara) (Figura 4.5.2.g), mesmo em CVi submetidos ao tratamento tolerogênico que não ficaram tolerantes. Em animais GFj, o grupo submetido ao tratamento tolerogênico também apresentou uma quantidade relevante de IgE no soro. Com o mesmo protocolo de tolerização utilizado em nosso trabalho, MOREAU e GABORIAU-ROUTHIAU (1996) demonstraram que animais GFj ficaram tolerantes pra IgE e IgG, mas não por um longo período de tempo. Já nos trabalhos realizados por SUDO e colaboradores (1997), com a mesma dose de ovalbumina, animais GFj não tolerizaram pra IgE na 21ª semana após o tratamento oral. Nossos resultados mostraram que a diferença de produção de IgE em animais GFj submetidos ao tratamento tolerogênico e imunogênico, embora significativa, foi muito pequena.

Em toda literatura encontra-se que a detecção de IgE requer técnicas muito sensíveis. Tentamos por diversas maneiras padronizar a dosagem de IgE utilizando variações no protocolo do ELISA:

sensibilização das placas com anticorpo anti-IgE e revelação com Ova Biotinilada;

sensibilização com Ova e revelação com anti- IgE biotinilada.

Não obtivemos sucesso nessas duas tentativas e passamos então para a análise seguindo o protocolo descrito por CHVATCHKO e colaboradores (1996). Com algumas modificações nessa técnica, conseguimos detectar IgE no soro dos animais. Além de deixarmos o soro reagindo *overnight*, sensibilizamos a placa com uma quantidade de antígeno (ovalbumina) maior que o usual, 100 µg/well para diminuirmos a competição de IgG e aumentarmos a possibilidade das IgE se ligarem. Posteriormente à dosagem, observamos reações inespecíficas entre o soro de cabra anti-Ig de rato e as Igs de camundongo, na ausência do soro do rato anti-IgE de camundongo. Ou seja, poderíamos então estar detectando qualquer isotipo e não a IgE especificamente. Apesar dos problemas técnicos, outros resultados como o da permeabilidade vascular (**Figuras 4.6**), nos confirmaram a elevação dos níveis de IgE anti-Ova em GFj, CVj e CVi. E mais, por termos conseguido estabelecer uma correlação entre títulos de IgE no soro com a rejeição da ingestão de clara, reforçamos nossa sugestão feita na introdução, em que a hipersensibilidade imediata pode estar envolvida na mudança da preferência alimentar.

A IgE é uma imunoglobulina monomérica, com 196.000 KDa de peso molecular encontrada em baixas concentrações no soro de indivíduos normais, em torno de 100-300 ng/ml (BENNICH e JOHANSSON, 1971). Ao emergirem da linfopoiese medular, os linfócitos expressam IgM na membrana e, logo após, uma mistura de IgM e IgD. A estimulação antigênica pela via digestiva pode resultar na troca de isotipo para qualquer uma das 5 classes de imunoglobulinas. Sabe-se que a síntese de IgE é regulada por fatores genéticos. Desse modo, o contato com o alérgeno em pessoas atópicas, com predisposição genética para formar IgE, ativa os linfócitos B, provavelmente nas Placas de Payer, que sofrem troca de isotipos e passam a secretar essa classe de imunoglobulina. A troca de isotipo pra IgE requer internalização do antígeno pelos linfócitos B, processamento e apresentação para linfócitos T na forma de peptídeos associados com moléculas de classe II do MHC. Sabe-se que o tipo de linfócito T que reconhece esse complexo antígeno-anticorpo é o chamado T helper 2, Th2, determinado pelo padrão característico de citocinas secretadas. A secreção de IL-4 e IL-13, e a expressão de CD40L pelo linfócito T são sinais cruciais necessários para a troca de isotipo pra IgE (BACHARIER *et al.*, 1998). Ultimamente tem se especulado uma via independente de linfócito T, envolvida na troca de isotipo pra IgE. Tem sido mostrado a expressão de CD40 ligante, uma molécula acessória essencial para a indução da transcrição para IgE, na superfície de mastócitos.

Cultura de mastócitos com linfócitos B, na presença de IL-4, tem sido suficiente para aumentar a produção de IgE (MARSHALL e BIENENSTOCK, 1994).

Em nosso modelo experimental, o antígeno introduzido no subcutâneo foi drenado para órgãos linfóides periféricos como linfonodo, onde ocorreu a estimulação dos linfócitos B, resultando na sua proliferação e diferenciação em plasmócito secretando imunoglobulinas. Vários fatores são importantes para determinar a natureza de uma resposta imune humoral, como tipos de citocinas produzidas e via de exposição do antígeno (ABBAS, 1994). Nosso protocolo de imunização com 10 μ g de ovalbumina adsorvido em hidróxido de alumínio pela via subcutânea, induziu uma resposta do tipo Th2 com produção principalmente de IgG1 e IgE. A secreção desses isotipos atingiu a circulação sanguínea e provavelmente sensibilizou os diversos tecidos. CHVATCHKO e colaboradores (1996) também demonstraram que com a imunização periférica com ovalbumina houve um aumento de IgE e IgG1 no soro, mas não de IgG2a e IgG2b.

Juntamente com o leite de vaca, o ovo é importante tanto na nutrição quanto no desencadeamento de alergia alimentar. Seus principais alergenicos, presentes na clara, são ovomucóide e ovalbumina (MYGIND *et al.*, 1996). O contato inicial de um alergenico com a mucosa é seguido de uma série de eventos, levando à produção de IgE por células B. Essa produção é um evento local, ocorrendo na superfície da mucosa. Ao contrário de alergenicos alimentares, a exposição tópica a alergenicos químicos de contato como oxazalona, DNCB (*Dinitrochlorobenzene*) e TMA (*Trimellitic Anhydride*) resulta em uma produção de citocinas tanto do padrão Th2 quanto Th1, que é altamente dependente da cronicidade de exposição (MOUSSAVI *et al.*, 1998). O próprio tecido epitelial pode fornecer condições favoráveis para o desencadeamento das alergias do tipo imediato associadas com doenças atópicas, propiciando a indução, desenvolvimento e manutenção dessas células Th2. Em um trabalho recente, BELLINGHAUSEN e colaboradores (1996) demonstraram que co-cultura de células da epiderme (principalmente células de *Langerhans* e queratinócitos) com esplenócitos em animais sensibilizados com ovalbumina, aumentou a produção de IgE anti-ovalbumina, mas não IgG2a, e induziu a produção de IL-4.

Nas desordens atópicas e infecções por parasitas, a quantidade de IgE é elevada (METCALFE, 1994) em níveis muitas vezes comparáveis com os de IgG, que é a imunoglobulina de maior concentração no soro (ISHIZAKA, 1994). É

histórica a associação de anticorpos da classe IgE com hipersensibilidade imediata ou alergias. O envolvimento de outros isotipos é uma descoberta relativamente recente. (VAZ (1972) demonstrou que também em camundongos, a sensibilidade anafilática é dependente tanto de IgE quanto IgG. A IgG passou então a receber mais atenção nos estudos de desenvolvimento de modelos alergênicos. DAUL e colaboradores (1990) demonstraram que em pessoas com hipersensibilidade ao camarão, por exemplo, tem sido detectado não só aumento sérico de IgE anti-camarão, como também de IgG4, mas não IgM e IgA. Em nossos resultados da análise de isotipos, observamos um aumento sérico dos níveis de IgG1 específicos em animais imunes CVj, CVi mas não em GFj. Isso nos levou a descartar o envolvimento de IgG1 no desencadeamento da aversão à ingestão de clara.

5.3. Avaliação da presença de IgE nos tecidos

Uma vez que IgE foi a única imunoglobulina que apresentou correlação positiva entre presença no soro e o desencadeamento da aversão nos três modelos experimentais, e sabendo que sua concentração é maior nos tecidos, resolvermos analisar sua presença nos órgãos de animais imunes. A dosagem de histamina liberada pelos mastócitos durante sua degranulação mediada por IgE, é um método sensível mas de difícil realização. Mesmo depois de várias tentativas, não conseguimos padronizar a técnica de dosagem de histamina pelo método fluorimétrico (principalmente pela falta de reagentes), nem pelo ensaio biológico. Frente a essas dificuldades, optamos por detectar os isotipos no tecido através de um evento do processo inflamatório desencadeado pela degranulação de mastócitos mediada por IgE.

Seguindo a metodologia descrita por JANCAR e colaboradores (1991), avaliamos o edema induzido pela injeção sistêmica de Ova através de um teste funcional de alterações da permeabilidade vascular a proteínas plasmáticas coradas pelo azul de Evans. O aumento da permeabilidade é denunciado pela presença do corante extravasado no local onde se produziu a inflamação. Nessa bateria de experimentos, metade dos animais de cada grupo foi submetida ao teste de aversão e a outra metade ao teste de permeabilidade vascular. O grupo imunizado, que em todos os modelos experimentais evitou a ingestão de clara, apresentou um maior extravasamento do corante para o tecido em seguida da administração endovenosa de ovalbumina em animais GFj (Figura 4.6.1), CVj

(Figura 4.6.2) e CVi (Figura 4.6.3). Em animais CVi, o grupo submetido ao tratamento tolerogênico, que não ficou tolerante pela análise de produção de anticorpos totais (Figura 4.5.1) e de IgE e IgG1 (Figuras 4.5.2.b e 4.5.2.g, respectivamente), apresentou uma intensidade de extravasamento semelhante ao grupo imune. Esse teste da permeabilidade também confirmou uma correlação entre resposta de IgE no tecido e aversão. Entretanto, por ser um método indireto, essa técnica também envolve outros fatores como número de mastócitos.

Muitos estudos têm tentado verificar a regulação do número de mastócitos no contexto de doenças inflamatórias. MARSHALL e BIENENSTOCK (1994) demonstraram que o desafio repetido com o antígeno no subcutâneo de animais sensibilizados é capaz de produzir uma elevação dos níveis de IgE. Da mesma forma, em nossos resultados, essa maior resposta no teste de permeabilidade vascular, provavelmente indica que os animais imunes estão com mais IgE sensibilizando mastócitos, já que somente a imunização com o antígeno não é capaz de aumentar o número de mastócitos no tecido, ao contrário de uma infecção com parasitas como alguns helmintos. Hiperplasia de mastócitos da mucosa é uma característica em infestações de ratos ou camundongos com nematodos tais como *Nippostrangillus brasilienses* e *Trichinella spiralis* dentre outros (HUNTLEY, 1992). Mesmo assim, procuramos avaliar um possível aumento no número de mastócitos nos animais sensibilizados. Para isso, fizemos colorações específicas no intestino de todos os animais. A visualização histológica dessas células é uma técnica que requer uma padronização muito sensível desde o fixador utilizado até o tempo de coloração.

Dos mesmos blocos onde estavam incluídos os intestinos dos camundongos submetidos aos diversos protocolos experimentais, foram feitos cortes para coloração específica. Por apresentarem características tintoriais distintas devido à constituição dos seus grânulos, é possível fazer uma coloração diferencial pelo método Alcian blue/Safranina, o qual permite a visualização de mastócitos tanto do tecido conectivo, que se coram preferencialmente de vermelho, quanto da mucosa intestinal que se coram de azul. Provavelmente por erros técnicos, não foi possível visualizar esses mastócitos. O que foi corado com Alcian blue apresentou-se com o aspecto de células caliciformes, e não foi possível visualizar os mastócitos do tecido conjuntivo com a safranina (dados não mostrados). Acreditamos que a fixação do tecido com formol tamponado foi crucial por não termos obtido sucesso

nesse tipo de coloração. Então, usamos a técnica Dominic, que não distingue as subpopulações de mastócitos. Não observamos diferença no número de mastócitos, encontrados sempre abaixo das Placas de Payer, entre os animais imunes, tolerantes e normais (dados não mostrados). Devido a escassez de mastócitos, estamos certos que ainda não conseguimos responder essa questão, que merece futuras investigações. Mas acreditamos que em nossos resultados, a resposta vascular ocorreu devido ao aumento da concentração de IgE no intestino.

Na literatura, há algumas citações de que a alergia alimentar pode ser geralmente expressa em outros tecidos, como pulmão, pele dentre outros, devido à circulação de linfoblastos secretando IgE (METCALFE, 1994). Entretanto, em nossos resultados, outros órgãos como fígado, pulmão e rim ou mesmo órgãos linfóides como baço não apresentaram uma quantidade significativa de extravasamento. Interessante que em todos os modelos experimentais, a injeção endovenosa de ovalbumina nos animais sensibilizados gerou um quadro de inflamação vascular somente no trato gastrointestinal, principalmente estômago e porções proximais do intestino. CARA (1995) demonstrou um aumento da permeabilidade vascular no intestino quando a ovalbumina foi dada por gavagem, simulando o que aconteceria quando o animal ingerisse a clara durante o teste de aversão. Em nossos resultados, demonstramos que mesmo a entrada sistêmica do antígeno foi capaz de produzir um efeito localizado no intestino de animais sensibilizados. Isso reafirmou o papel crucial do trato gastrointestinal nas alergias alimentares. Temos, por um lado, um grande controle da absorção de antígeno nas porções iniciais do intestino, reafirmando os resultados de VAN der HEIDJEN e colaboradores (1987) ao demonstrarem que duodeno e jejuno proximal constituem o principal sítio de células secretando imunoglobulinas no intestino. E, por outro lado, evidências de que o intestino pode 'sinalizar' para o sistema nervoso central a aversão a um nutriente através da resposta alérgica.

O mecanismo envolvido na reação de hipersensibilidade é relativamente simples. Nos indivíduos sensibilizados, anticorpos IgE específicos ao antígeno da mucosa intestinal são encontrados ligados aos receptores de alta afinidade (FcRI) na superfície dos mastócitos. Essa alta afinidade e a baixa constante de dissociação entre IgE e seu receptor nos mastócitos explica porque uma pequena dose dessa imunoglobulina pode sensibilizar o tecido, e porque essa sensibilização é tão persistente. O efeito resultante é o desencadeamento de uma

resposta anafilática em um próximo contato com o antígeno, que em nossos experimentos seria quando o animal fosse ofertado com a clara. No teste de permeabilidade seria pela injeção da Ova endovenosamente. O mecanismo desse tipo de reação é bem conhecido. Nessa segunda exposição, o antígeno forma ligação com duas moléculas de IgE (*cross-linking*), o que estimula a abertura dos canais de cálcio, além de ativar a fosfolipase C nos mastócitos. O cálcio, então, se liga à calmodulina, formando um complexo que é capaz de ativar enzimas. Acredita-se que a fosfolipase C (PLC, phospholipase C) desempenhe um papel chave no estágio inicial dos processos bioquímicos para liberação dos mediadores. Ocorre uma série de eventos bioquímicos que culminam com a degranulação do mastócito que passa a liberar para o tecido mediadores químicos armazenados, tais como histamina, serotonina, ECF-A (*Eosinophil Chemotactic Factors-A*), NCF-A (*Neutrophil Chemotactic Factors-A*), e mediadores derivados da matriz do grânulo, como a heparina e a tripsina. O mastócito libera também mediadores pré-formados através da hidrólise enzimática do ácido araquidônico, como prostaglandina e tromboxano. A ação desses mediadores gera muitas modificações locais que levam a um contexto inflamatório. No trato gastrointestinal, as prostaglandinas causam cólicas abdominais e perturbações como náuseas, vômitos e diarreias. As primeiras modificações referem-se a eventos vasculares com início após 15 a 30 minutos. Tais eventos incluem a vasodilatação gerada pela histamina, prostaglandina e PAF, e o aumento da permeabilidade vascular, desencadeada pela ação da histamina, leucotrieno e PAF em receptores das células endoteliais. A vasodilatação e o aumento de permeabilidade vascular geram o eritema na pele e o edema no subcutâneo, trato respiratório ou digestivo (WASSERMAN, 1983; PLAUT, 1993).

5.4. Aversão impediu o desencadeamento de lesão no intestino dos animais sensibilizados

A reação imediata resulta em um edema no trato gastrointestinal, e em nossos resultados o intestino se mostrou o órgão mais sensibilizado no teste funcional de permeabilidade vascular em GFj, CVj e CVi. Resolvemos, portanto, avaliar a integridade da mucosa intestinal nesses animais submetidos ao tratamento tolerogênico, imunogênico e normais após o teste opcional da ingestão de clara. Foram retirados intestinos dos animais 2 horas após a exposição de clara para análise histológica. Não dispomos das fotos dos animais CVi por motivos técnicos.

Para a identificação dos segmentos intestinais, seguimos a metodologia descrita por FERRARIS e colaboradores (1992). A análise histológica foi realizada seguindo algumas padronizações. No camundongo normal, o tamanho das vilosidades (diminuem no sentido caudal), a quantidade de células caliciformes (aumentam no sentido caudal) e o número de linfócitos intraepiteliais (diminuem no sentido caudal) caracterizam as diversas porções intestinais.

Duas horas após a ingestão de clara, tempo em que já é observado aversão em animais sensibilizados, não houve nenhuma alteração morfológica significativa. Se, com desafio endovenoso, porções proximais do intestino apresentam maior resposta vascular, era de se esperar que a mucosa apresentasse edema. Poderíamos supor que esse edema gerasse um desconforto repercutindo na aversão à posterior ingestão da solução. Na verdade, as alterações foram bem discretas o que nos leva a propor que eventos iniciais, ligados aos mastócitos, poderiam estar participando da mudança de conduta.

A entrada do agente lesivo pode desencadear um quadro de inflamação crônica com grandes danos na integridade do tecido. (Nossos resultados sugerem que o animal imune evita beber o antígeno e isso resulta na manutenção da integridade do epitélio intestinal. Esse fenômeno (aversão) estaria contribuindo para uma maior resistência do intestino.) É de fundamental importância, já que o intestino está em contato direto não somente com uma diversidade de materiais potencialmente patogênicos, mas com nutrientes necessários para a manutenção do organismo. O pulmão, por exemplo, que é um órgão alvo de alergias e está em contato direto com alérgenos advindos das vias aéreas, ao contrário do intestino, é extremamente sensível a lesões teciduais. CHVATCHKO e colaboradores (1996) identificaram alterações na integridade do epitélio do pulmão depois do desafio nasal com ovalbumina em animais sensibilizados. Essas alterações se caracterizaram por grande infiltrado inflamatório formando estruturas semelhantes a folículos linfóides, presença de células dendríticas foliculares (FDC, *Follicular Dendritic Cell*), imunoglobulinas (IgE, IgA e IgG) e infiltrado inflamatório difuso principalmente em volta dos vasos, com plasmócitos e linfócitos T CD4+. Enquanto as vias aéreas de um indivíduo atópico são sensibilizadas com nanogramas de alérgenos inalados, o trato gastrointestinal é diariamente 'bombardeado' com gramas de material antigênico.

Nossos resultados mostraram que imunizados por via subcutânea e desafiados por via endovenosa, os camundongos tiveram maior resposta vascular no intestino e não no pulmão. Acreditamos que, em conjunto, esses dados mostram que o intestino pode se tornar o órgão mais sensibilizado, recebe quantidades maiores de proteínas, mas possui mecanismos anti-inflamatórios mais eficazes que o pulmão. A aversão, neste contexto, viria como um mecanismo a mais de proteção do organismo à entrada de antígenos via oral, gerada pelo início do próprio processo inflamatório.

A percepção de sabores se faz através de papilas gustativas localizadas na língua. A orofaringe é o sítio inicial de exposição a antígenos alimentares. Edema e prurido da boca, mucosa oral e faringe podem ser desencadeados devido ao contato do alimento com a superfície da mucosa oral.¹ Os sintomas ocorrem em 5-30 minutos de exposição e podem se um "prenúncio" para outros sintomas de alergia alimentar (METCALFE, 1994). No entanto, histologicamente, nenhuma alteração foi vista na língua de camundongos CVj normais, tolerantes e imunes retirada duas horas após a ingestão voluntária de clara (**Figura 4.7.1**). Podemos observar que o epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, o tecido subepitelial e a camada muscular não apresentaram diferença morfológica nos três grupos. Infelizmente, pelo tipo de corte não foi possível detectar as papilas gustativas que estão localizadas na superfície dorsal, nos dois terços anteriores da língua. No epitélio que reveste as papilas, estão presentes os corpúsculos gustativos que são responsáveis pela identificação do sabor (STEVENS e LOWE, 1995). A análise dessas estruturas merece futuras investigações no estudo da rejeição à ingestão de clara.

Já está bem descrito que devido ao estímulo quimiotático dos leucotrienos B₄, ECF-A, NCF-A e PAF, ocorrem os efeitos posteriores da anafilaxia intestinal. Três a doze horas depois da degranulação dos mastócitos, ocorre uma reação inflamatória celular associada com um número aumentado de eosinófilos, basófilos, neutrófilos e linfócitos T. Essas células podem liberar radicais livres além de mediadores químicos e assim causarem lesão tecidual. Como observado por McDONALD e FERGUSON (1976), a imunidade mediada por células pode ter um papel patológico por causarem atrofia de vilos, mal absorção, e hiperplasia da cripta principalmente pelos efeitos dos linfócitos na arquitetura da mucosa. Entretanto, deixando o animal por um período maior (24 horas) de exposição opcional de clara, ainda não foi suficiente para promover qualquer alteração morfológica na estrutura da mucosa intestinal do duodeno ou nas outras

porções, de animais imunes CVj e GFj. Camundongos GFj foram capazes de desenvolver reações inflamatórias intensas em órgãos como coração e fígado após infecção com *T. cruzi* (FURARAH *et al.*, 1991). Mas, como demonstrado em nossos resultados, nenhuma inflamação seguinte a uma exposição alérgica durante 24 horas foi detectada enquanto os animais puderam controlar a entrada do antígeno.

A secreção de citocinas tem um papel fundamental no controle do processo, mantendo a inflamação em níveis fisiológicos. Se o estímulo persistir, como por exemplo em uma infecção severa com determinado parasita, haverá um aumento da quimiotaxia para leucócitos, secreção contínua de diversos mediadores, e a inflamação pode se tornar patológica causando graves danos no tecido. O propósito de não permitir ao camundongo outra opção líquida, esteve relacionado com o estudo das consequências morfológicas de um estímulo frequente do antígeno, através da ingestão involuntária de clara durante 24 horas. Como demonstrado na **Figura 4.7.3**, mesmo o animal não tendo outra escolha, ele mostrou aversão à ingestão de clara, o que foi suficiente para evitar lesão nos animais convencionais sensibilizados.

Animais CVj imunes só apresentaram alterações morfológicas discretas quando foram expostos ao consumo não opcional de clara durante 10 dias, como demonstrado pela atrofia do vilo no duodeno, jejuno proximal e jejuno distal (**Figura 4.8**). E, deixando animais imunes GFj sem opção durante 24 horas (**Figura 4.7.4**), observamos que houve um discreto quadro de inflamação no duodeno, evidenciado pelo nítido aumento da celularidade da lâmina própria. Interessante foi o fato dessa inflamação ter ocorrido somente no duodeno, na mesma região que apresentou uma resposta vascular depois da administração de ovalbumina por via endovenosa.

Sabe-se que nas reações inflamatórias iniciadas por eventos imunológicos, o controle é exercido pelo próprio antígeno, na mesma via em que ele controla o desencadeamento da resposta imune. Isso poderia explicar as alterações observadas em camundongos GFj após a ingestão não opcional de clara, ou até mesmo a atrofia na mucosa das regiões proximais do intestino do camundongo CVj, observada após 10 dias de ingestão não opcional. Portanto, há uma tendência a um processo inflamatório mais intenso quando o animal recebe um estímulo constante do antígeno ou quando não tem mecanismos regulatórios eficientes.

5.5. Possível controle da inflamação nos animais que evitaram a clara

Como mencionado por FOSTER e colaboradores (1997) há uma correlação entre a presença de células inflamatórias, mudanças morfológicas no tecido do pulmão e o desenvolvimento de uma hiperreatividade nas vias aéreas. As citocinas liberadas no ambiente inflamatório são fundamentais para modulação da inflamação. IL-1 e TNF- α (*Tumour Necrosis Factor*) são importantes para aumentar a expressão de moléculas de adesão na célula endotelial, favorecendo a aderência dos leucócitos e então iniciando o processo de exsudação, além de serem importantes na ativação de macrófagos. Essas citocinas podem ser produzidas pela diversidade de células presentes no intestino durante o processo inflamatório. HUNTLEY (1992) comenta que mastócitos podem liberar várias citocinas como IL-1, 3, 4, 5, 6, IFN- γ , TGF- β (*Transforming Growth Factor*) e TNF. Essas citocinas podem aumentar também o efeito imunoregulatório ou modulatório de citocinas de outras fontes celulares. E pelo fato da produção dessas citocinas serem durante um longo período de tempo, tem se proposto um papel fundamental dos mastócitos durante a fase crônica e reações tardias da inflamação.

O microambiente é importante durante o controle do processo inflamatório. Por exemplo, o tecido epitelial pode ter um papel fundamental no controle da inflamação por fornecer condições favoráveis para a indução, desenvolvimento e manutenção de células Th2. Co-cultura de células epidermais (queratinócitos e células de Langerhans) com células do Baço de camundongos primados com 100 μ g de Ova aumentou em 100 vezes a produção de IgE induzida pelo antígeno, e os autores atribuem esse resultado pelo fato de células de Langerhans apresentarem moléculas de MHC classe II e poderem, portanto, apresentar antígenos para os linfócitos T (BELLINGHAUSEN, 1996). É possível que esse comportamento seja extrapolado para o tecido epitelial do intestino, com base em um recente trabalho publicado por HERSHBERG e colaboradores (1998). Os autores demonstraram que em situações patológicas, os enterócitos expressam grandes quantidades de MHC classe II na sua superfície basolateral, justamente em contato direto com as células linfóides, funcionando então como células apresentadoras de antígenos (APCs, *Antigen Presenting Cells*).

As citocinas secretadas pelos linfócitos Th2, no sítio inflamatório, como IL-4 e IL-10 têm um papel crucial no controle da inflamação. McDONALD e

FERGUSON (1976) demonstraram que, se pedaços de intestino delgado de recém-nascidos forem implantados no rim de camundongos adultos, há uma intensa rejeição do tecido implantado com grandes danos na mucosa intestinal, como hiperplasia das criptas e atrofia dos vilos. Eles atribuem esse quadro histológico à ação de linfocinas na mucosa intestinal, não somente como resposta a reações enxerto x hospedeiro, mas durante qualquer resposta imune celular no intestino delgado.¹ Sabe-se que IL-4 pode atuar inibindo ativação de macrófago e bloquear o aumento da produção de IL-1, óxido nítrico e prostaglandinas por essas células (ABBAS, 1994). ZUANY-AMORIM e colaboradores (1997) demonstraram que IL-10 tem uma potente atividade anti-alérgica por inibir a produção de TNF- α . Eles mostraram que a administração dessa citocina juntamente com Ova por via intranasal, inibiu o acúmulo de células inflamatórias nas vias aéreas e cavidade peritoneal em animais sensibilizados, e teve interferência também na geração de várias citocinas induzidas pelo antígeno, como TNF- α e IFN- γ .

Diante desses dados, sugerimos que citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β podem estar modulando a resposta inflamatória a antígenos da dieta, preservando a integridade intestinal nos animais que têm opção de ingerir a clara. Quando animais CVj imunes são expostos à clara de forma não opcional durante um longo período de tempo (10 dias), o estímulo crônico do antígeno provavelmente pode estar promovendo uma quebra desse controle anti-inflamatório e, portanto, desencadeando um quadro de lesão caracterizado principalmente pela atrofia das vilosidades.¹ As alterações na morfologia intestinal foram mais destacáveis no intestino de camundongos GFj que não tiveram opção. A formação do GALT está associada com a presença de uma estimulação constante por elementos da dieta e da flora intestinal. Os animais imunes GFj sem opção de ingerir a clara consumiram a mesma quantidade que os com opção, aproximadamente 1500 mg, e apresentaram um quadro morfológico de edema no duodeno.¹ No teste não opcional a clara não foi adocicada como no teste opcional. Acreditamos que o gosto desagradável da ovalbumina tenha feito com que os animais ingerissem a clara ao longo das 24 horas de exposição, e no teste opcional os animais consumiram a mesma quantidade num período mais rápido. Provavelmente em GFj sem opção de ingerir, a entrada frequente de Ova durante um longo período (mesmo que em pequenas quantidades) em contato com um GALT pouco estimulado, pode estar contribuindo para que a mucosa digestiva nesses animais se torne mais sensível

a agentes lesivos, gerando uma lesão tecidual mais acentuada que nos animais CVj expostos à clara durante o mesmo período de tempo.

5.6. Uma proposta de mecanismos envolvidos na aversão à ingestão de clara

Não se sabe ao certo o que determina um animal escolher entre um ou outro alimento, balancear naturalmente a sua dieta, evitar substâncias tóxicas, ou preferir um nutriente por um determinado período. Na introdução dessa dissertação, demonstramos que vários fatores interferem na seleção de dietas. Mas, quaisquer que sejam os mecanismos, eles estão interligados com o sistema nervoso. Uma prova disso é que durante e depois de uma alimentação, a presença de nutrientes no intestino pode ser rapidamente detectada e sinalizada para o cérebro através de vias aferentes viscerais (LUCAS e SCLAFANI, 1996). De acordo com nossos resultados, a IgE poderia estar participando dessa sinalização, por exemplo via produtos de secreção de mastócitos.

A parte do cérebro que é responsável pelo controle de muitos aspectos do comportamento emocional é o hipotálamo. Representando menos que 1% da massa cerebral, a estimulação de várias áreas do hipotálamo faz com que o animal sinta uma fome extrema, um apetite voraz e um desejo intenso de procurar comida. A área mais associada com a fome é a hipotalâmica lateral (GUYTON e HALL, 1997), dentro da qual o núcleo paraventricular tem sido objeto central de estudos sobre comportamento alimentar.

Nos sistemas biológicos, associações espaciais são freqüentemente indicativas de interações funcionais. Encontramos embasamento teórico para propormos que o sistema imune pode estar influenciando em mudanças comportamentais do animal que refletiriam na rejeição do antígeno ao qual se é imunizado. Os mastócitos, uma das principais células do processo inflamatório, estão em íntima associação morfológica com fibras peptidérgicas na mucosa intestinal.¹ Em humanos, cerca de 47-77% dos mastócitos estão associados com fibras nervosas (STEAD *et al.*, 1987; BIENSTOCK, 1995). Estudos funcionais têm indicado que a interação mastócito-nervo é bidirecional, ou seja, tanto mediadores derivados de mastócitos podem estimular nervos, como vice-versa (MCKAY e BIENENSTOCK, 1994).

O sistema nervoso tem participação na regulação de determinados eventos imunológicos e controla uma variedade de fatores que são importantes

nas manifestações alérgicas do trato gastrointestinal, como degranulação de mastócitos. Isto se faz através da liberação de neuropeptídeos como a substância P. Uma mudança no comportamento alimentar, em que o animal pode escolher o que vai comer, é uma evidência da integração crucial e fundamental entre esses dois sistemas controlando a seleção de dietas. Nossos resultados demonstraram uma diminuição da entrada de proteína devido a uma alteração comportamental que envolve uma escolha, quando o animal imunizado evita a ingestão do antígeno.

A teoria geral da aversão condicionada diz que um efeito indesejável qualquer se associado com um novo sabor ocorrerá uma aversão condicionada ao sabor (CTA, Conditioned Taste Aversion). Os experimentos são baseados na associação de estímulos condicionados, que envolve uma aprendizagem, e estímulos não condicionados. NOLAN e colaboradores (1997) demonstraram que, ratos ofertados com uma solução de sacarina durante a injeção e 10 minutos após serem injetados intraperitonealmente com uma solução de cloreto de lítio (LiCl), evitaram a ingestão de sacarina em exposições posteriores.

GARCIA e colaboradores (1985) propõem que o mecanismo da aversão condicionada ao sabor dependa de uma correlação entre sensações gustatórias e consequências gastrointestinais. Diversas áreas do cérebro estão interligadas no trato gastrointestinal, e projeções neurais do trato gastrointestinal e gustatórias convergem para o mesmo local no cérebro. Isso implica que qualquer distúrbio iniciado no trato gastrointestinal pode chegar ao cérebro, via nervo vago ou via circulação sanguínea, concomitantemente a estímulos originados dos nervos gustatórios. O que propõe o Efeito Garcia é que a aversão ao sabor estaria, portanto, relacionada com o estabelecimento dessa associação. O que colocamos com nossos resultados é que a aversão a um alimento pode ser gerada por um evento intestinal devido à ação de mediadores liberados por mastócitos durante etapas iniciais da anafilaxia intestinal, sem promover qualquer alteração ou dano na integridade da mucosa.

1974).

2. Ocasionalmente, o desenvolvimento de um sistema de controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

3. Alteração da composição da penicilina com a presença de 10% de penicilina G.

4. O duriente era o órgão que apresentava maior atividade administrado endovenosamente.

5. O desenvolvimento de clara de ovo, a primeira alteração morfológica na língua, causada por vírus normais, tolerância.

6. Alterações morfológicas foram observadas em 10% de ovos não opcionais de clara de ovo, causadas por vírus normais *germfree* jovens.

Conclusões

Conclusões

Em conjunto, nossos resultados nos permitiram concluir que:

- 1- Os isotipos séricos IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 anti-ovalbumina não estiveram correlacionados com a aversão à ingestão de clara de ovo;
- 2- Através do teste funcional da permeabilidade vascular, foi possível estabelecer uma correlação entre presença de IgE no tecido e aversão à ingestão de clara;
- 3- O duodeno foi o órgão que apresentou maior capacidade de resposta vascular ao antígeno administrado endovenosamente em camundongos sensibilizados;
- 4- A ingestão voluntária de clara de ovo, durante 2 horas, não foi capaz de promover alterações morfológicas na língua, baço, fígado e intestino de camundongos convencionais normais, tolerantes e imunes;
- 5- Alterações no duodeno foram observadas em camundongos convencionais jovens expostos ao consumo não opcional de clara durante 10 dias, ou depois de 24 horas de consumo em animais *germfree* jovens.

- Albac, A. (1977) *Immunology, Protein Nutrition*, p. 115. Academic Press, New York.
- Anderson, G.H. (1975) *Protein Nutrition*, p. 115. Academic Press, New York.
- Anderson, G.H. (1976) Evidence for a protein requirement. *J. Am. Diet. Assoc.*, **76**, 115-116.
- Anderson, G.H., D.V. Calton. Food intake, effects of a most limiting essential amino acid on the self-selected protein and energy. *J. Nutr.*, **106**, 1975, 1421-1422.
- Anderson, G.H., D.V. Calton. Correlation of protein intake and protein and energy intake. *J. Nutr.*, **106**, 1975b, 1421-1422.
- Anderson, G.H., D.V. Calton. Brain serotonin depletion. *J. Nutr.*, **106**, 1975, 1421-1422.
- Anderson, G.H., D.V. Calton. Qualitative selection of diets. *Brain Res.*, **106**, 1975, 1421-1422.
- Anderson, G.H., D.V. Calton. Peptide permeability. *Gastroenterology*, **100**, 1975, 1421-1422.
- Anderson, G.H., D.V. Calton, R. Laurent. Compared effects of temperature and quality on macronutrient intake in rats. *J. Nutr.*, **57** (5), 1975, 1421-1422.
- Bachmann, I.B.; Jabara, H.; Gebel, H. Immunoglobulin synthesis. *J. Nutr.*, **106**, 1975, 1421-1422.

Bartoshuk, L.M. **Referências Bibliográficas**
Monogr., **v.9**, p.179-184, 1990.

Referências Bibliográficas

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology, Pennsylvania: W.B. Saunders, 457pp., 1994.

Accioly, M.C.; Guimarães, E.; Vaz, N.M. Indução imunológica da aversão a sabores novos. **Resumos do X Congresso da SBI**, Cambuquira, 1983.

Ames, H.G.; Gee, M.I.; Hawrysh, Z.J. Taste perception and breast cancer: Evidence of a role for diet. **J. Am. Diet Assoc.**, v.93, p.541-546, 1993.

Ashley, D.V.; Anderson, G.H. Food intake regulation in the weanling rat: effects of the most limiting essential amino acids of gluten, casein, and zein on the self-selection of protein and energy. **J.Nutr.**, v.105 (11), p.1405-1411, 1975a.

Ashley, D.V.; Anderson, G.H. Correlation between the plasma tryptophan to neutral amino acid ratio and protein intake in the self-selecting weanling rat. **J.Nutr.**, v.105 (11), p.1412-1421, 1975b.

Ashley, D.V.; Coscina, D.V.; Anderson, G.H. Selective decrease in protein intake following brain serotonin depletion. **Life Sciences**, v.24, p.973-984, 1979.

Ashley, D.V. Qualitative analysis of feeding behaviour through dietary selection of nutrients. **Brain Res. Bull.**, v.15 (4), p.411-415, 1985.

Atisook, K.; Madara, J.L.; An oligopeptide permeates intestinal tight junctions at glucose-elicited dilatations. **Gastroenterology**, v.100, p.719-724, 1991.

Aubert, A.; Goodall, G.; Dantzer, R. Compared effects of cold ambient temperature and cytokines on macronutrient intake in rats. **Physiol. Behav.**, v.57 (5), p.869-873, 1995.

Bacharier, L.B.; Jabara, H.; Geha, R.S. Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.115, p.257-269, 1998.

Bartoshuk, L.M. Chemosensory alterations and cancer therapies. **NCI Monogr.**, v.9, p.179-184, 1990.

Bellinghausen, I.; Enk, A.H.; Mohamadzadeh, M.; Lohmann, S.; Knop, J.; Saloga, J. Epidermal cells enhance interleukin 4 and Immunoglobulin E production after stimulation with protein allergen. *J.Invest. Dermatol.*, v.107, p.582-588, 1996.

Bennich, H.; Johansson, S.G.O. Structure and function of human immunoglobulin E. *Adv. Immunol.*, v.13 (1), p.1-55, 1971.

Bernstein, I.L. Learned food aversions in the progression of cancer and its treatment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.443, p.365-380, 1985.

Bienenstock, J. Nerve-mast cell interactions in the gastrointestinal tract. In: **Intestinal immunology and food allergy** - Nestlé Nutrition Workshop Series, v.34, p.37-45, 1995.

Brandtzaeg, P.; Baklien, K.; Bjerke, K.; Rognum, T.O.; Scott, H.; Valnes, K. Nature and properties of the human gastrointestinal immune system. In: **Immunology of the gastrointestinal tract- Vol.I**, CRC Press, Inc., p.3-85, 1987.

Brandtzaeg, P. Ontogeny of the mucosal immune system. In: **Intestinal Immunology and food allergy** - Nestlé Nutrition Workshop Series, v.34, p.1-17, 1995.

Bruce, M.G.; Ferguson, A. The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. *Immunology*, v. 59(2), p. 295-300, 1986.

Calapai, G.; Squadriti, F.; Altavilla, D.; Zingareli, B.; Campo, G.M.; Saitta, A.; Iocolano, M.; Urna, G.; Saradella, A.; Caputi, P. Tumor necrosis factor involvement in lipopolysaccharide-induced inhibition of drinking in the rat. *Neurosci. Res. Commun.*, v.9, p.53-61, 1991.

Cara, D.C.; Conde, A.A.; Vaz, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, v.27, p.1331-1341, 1994.

Cara, D.C. Mudança de preferência a sabores induzida imunologicamente em camundongos. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 100pp, 1995.

→ Cara, D.C.; Conde, A.A.; Vaz, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice. II. Passive/Adoptive transfer and pharmacological inhibition. **Scand.J.Immunol.**, v.45, p.16-20, 1997.

Challacombe, S.J.; Rahman, D.; Jeffrey, H.; Davies, S.S.; O'hagan, D.T. Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen. **Immunology**, v.76, p.164-168, 1992.

Chvatchko, Y.; Kosco-Vilbois, M.H.; Herren, S.; Lefort, J.; Bonnefoy, J-Y. Germinal center formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge. **J. Exp. Med.**, v.184, p.2353-2360, 1996.

Cook, N.E.; Rogers, Q.R.; Morris, J.G. Acid-base balance affects dietary choice in cats. **Appetite**, v.26 (2), p.175-92, 1996.

Dacosta, K.O.; Wilson, J.F. Food preferences and eating attitudes in three generations of black and white women. **Appetite**, v. 27 (2), p.183-191, 1996.

Daul, C.B.; Morgan, J.E.; Lehrer, S.B. The natural history of shrimp hypersensitivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.86(1), p.88-93, 1990.

Davies, G.J.; Collins, A.L.P.; Mead, J.J. Bowel habit and dietary fibre intake before and during menstruation. **J. Roy. Soc. Health**, v.113 (2), p.64-67, 1993.

Deutsch, J.A.; Moore, B.O.; Heinrichs, S.C. Unlearned specific appetite for protein. **Physiol. Behav.**, v.46 (4), p.619-624, 1989.

DeWys, W.D.; Walters, K. Abnormalities of taste sensation in cancer patients. **Cancer**, v.36, p.1888-1896, 1975.

Djuric, V.J.; Markovic, B.M.; Lazarevic, M.; Jankovic, B.D. Anaphylactic shock-induced conditioned taste aversion. II. Correlation between taste aversion and indicators of anaphylactic shock. **Brain Behav. Immun.**, v.2 (1), p.24-31, 1988.

Dobell, E.; Chan, M.; Williams, P.; Allman, M. Food preferences and food habits of patients with chronic renal failure undergoing dialysis. **J.Am. Diet. Assoc.**, v. 93, p.1129-1135, 1993.

Elson, C.D.; Ealding, W. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.*, v.132 (6), p.2736-2741, 1984.

Faria, A.M.C.; Garcia, G.; Rios, M.J.; Michalaros, C.L.; Vaz, N.M. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology*, v.78, p.147-151, 1993.

Faria, A.M.C.; Ficker, S.M.; Speziali, E.; Menezes, J.S.; Stransky, B.; Rodrigues, V.S.; Vaz, N.M. Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, v.102, p.67-80, 1998.

Farleigh, C.A.; Shepherd, R.; Jevons, S.; Pryor, J.S. Effects of haemodialysis on taste for salt in relation to changes in blood constituents. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, v.41 (6), p.441-451, 1987.

Fernandes, G.; Yunis, E.J.; Good, R.A. Influence of protein restriction on immune functions in NZB mice. *The Journal of Immunology*, v.116 (3), p.782-790, 1976.

Fernstrom, J.D.; Wurtman, R.J. Brain serotonin content: Physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*, v.178, p.414-416, 1972.

Fernstrom, A.; Hylander, B.; Rossner, S. Taste acuity in patients with chronic renal failure. *Clin. Nephrol.*, v.45 (3), p.169-174, 1996.

Ferraris, R.P.; Villenas, S.A.; Diamond, J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.*, v.262 (6Pt1), p.G1047-1059, 1992.

Ficker, S.M. A importância da gradualidade de administração oral de antígeno na indução de tolerância oral. *Tese de Mestrado*. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 85 pp, 1998.

Flanagan, M.; Jain, S.; Michael, J.G. Breaking of oral tolerance by an encapsulated antigen. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.778, p. 373-375, 1996.

Foster, P.S.; Hogan, S.P.; Matthaei, K.I.; Young, I.G. Interleukin-4 and Interleukin-5 as targets for the inhibition of eosinophilic inflammation and allergic airways hyperreactivity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.92 - suppl.II, p.55-61, 1997.

Frank, L.; Gruskay, M.D. Comparison of breast, cow and soy feedings in the prevention of onset of allergic disease. **Clin. Pediatr (Phila)**, v.21 (8), p.486-491, 1982.

Furarah, A.M.; Crocco-Afonso, L.C.; Silva, M.E.C.; Silva, M.E.; Silva, M.E.; Bambirra, E.A.; Vieira, E.C.; Nicoli, J.R. Immune response of germfree mice to experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.24, p.1223-1231, 1991.

Garcia, J.; Lasiter, P.S.; Bermudez-Rattoni, F.; Deems, D.A. A general theory of aversion learning. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.443, p.8-21, 1985.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ª ed. Rio de Janeiro, **Editora Guanabara Koogan S. A.**, 1997.

Hanson, D.G.; Vaz, N.M.; Rawlings, L.A.; Lynch, J.M. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Effects of prior passive and active immunization. **J. Immunol.**, v. 122(6), p. 2261-2266, 1979.

Hershberg, R.M.; Cho, D.H.; Youakim, A.; Bradley, M.B.; Lee, J.S.; Framson, P.E.; Nepom, G.T. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v.102, p.792-803, 1998.

Hillman, N.M.; Riopelle, A.J. Protein deprivation in primates: XII. food preferences of juvenile *Rhesus* monkeys. **Percept. Mot. Skills**, v.45 (1), p.3-10, 1977.

Hrupka, B.J.; Lin, Y.M.; Gietzen, D.W.; Rogers, Q.R. Small changes in essential amino acid concentrations alter diet selection in amino acid-deficient rats. **J. Nutr.**, v.127 (5), p.777-784, 1997.

Huntley, J.F. Mast cells and basophils: A review of their heterogeneity and function. *J. Comp. Path.*, v.107, p.349-372, 1992.

Hurley, R.S.; Hebert, L.A.; Rypien, A.B. A comparison of taste acuity for salt in renal patients *vs.* normal subjects. *J.Am. Diet. Assoc.*, v.87 (11), p.1531-1534, 1987.

Ishizaka, K. IgE-mediated responses in the mucosal immune system. In: **Handbook of Mucosal Immunology**. J. Academic Press, New York, p.299-306, 1994.

Ito, K.; Inagaki-Ohara, K.; Murosaki, s.; Nishimura, H.; Shimokata, T.; Torii, S.; Matsuda, T.; Yoshikai, Y. Murine model of IgE production with a predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvants. *Eur. J. Immunol.*, v.27, p.3427-3437, 1997.

Jancar, S.; Sirois, M.G.; Carrier, J.; Braquet, P.; Sirois, P. PAF induces rat plasma extravasation and releases eicosanoids during anaphylaxis. *Inflammation*, v.15, p.347-354, 1991.

Jerne, N.K. Towards a network theory of the immune system. *Annals of Immunology*, v.125C, p.373-389, 1974.

Kallas, M.R.E.; Patreicio, F.R.S.; Fagundes-Neto, U. Morfometria do intestino delgado na diarréia aguda ou persistente por *Escherichia coli* enteropatogênica clássica. *Arq. Gastroenterologia*, v.32 (2), p.91-98, 1995.

Kanaka, R.; Dua-Sharma, S.; Sharma, K.N. Gustatory preferences during estrus cycle in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, v.23 (4), p.277-284, 1979.

Kato, T.; Owen, R.L. Structure and function of intestinal mucosal epithelium. In: **Handbook of Mucosal Immunology**. J. Academic Press, New York, p.11-26, 1994.

Kern, D.L.; McPhee, L.; Fisher, J.; Johnson, S.; Birch, L.L. The postingestive consequences of fat condition preferences for flavors associated with high dietary fat. *Physiol. Behav.*, v.54 (1), p.71-76, 1993.

Kim, S.H.; Mauron, J.; Gleason, R.; Wurtman, R. Selection of carbohydrate to protein ratio and correlations with weight gain and body fat in rats allowed three dietary choices. **Internat.J.Vit.Nutr.Res.**, v. 61, p.166-179, 1991.

Kraehenbuhl, J.; Neutra, M.R. Monoclonal secretory IgA for protection of the intestinal mucosa against viral and bacterial pathogens. In: **Handbook of Mucosal Immunology**. J. Academic Press, New York, p.403-408, 1994.

Kyono, H.; McGhee, J.R.; Wannemuehler, M.J.; Michalek, S.M. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. **J. Exp. Med.**, v. 155, p. 605-610, 1982.

Lahmann, W.M.; Menezes, J.S.; Verdolin, B.A.; Vaz, N.M. Influence of age on the induction of oral tolerance in mice and its adoptive transfer by spleen cells. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.25, p.813-821, 1992.

Lamont, A.G.; Mowat, A.M.; Browning, M.J.; Parrot, D.M. Genetic control of oral tolerance to ovalbumin in mice. **Immunology**, v. 63(4), p.737-739, 1988.

Leathwood, P.D.; Ashley, D.V. Strategies of protein selection by weanling and adult rats. **Appetite**, v.4 (2), p.97-112, 1983a.

Leathwood, P.D.; Ashley, D.V. Behavioural strategies in the regulation of food choice. **Experientia Suppl.**, v.44, p.171-196, 1983b.

Leishman, A.J.; Garside, P.; Mowat, A.M. Immunological consequences of intervention in established immune responses by feeding protein antigens. **Cel. Immunol.**, v.183, p.137-148, 1998.

Lieberman, H.R.; Wurtman, J.J. Aging, nutrient choice, activity, and behavioral responses to nutrients. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v.561, p.196-208, 1989.

Lucas, F.; Sclafani, A. Capsaicin attenuates feeding suppression but not reinforcement by intestinal nutrients. **Am. J. Physiol.**, v.270, p.R1059-R1064, 1996.

Macdonald, T.T.; Ferguson, A. Hypersensitivity reactions in the small intestine.II. Effects of allograft rejection on mucosal architecture and lymphoid cell infiltrate. **Gut**, v.17, p.81-91, 1976.

Malkovsky, M.; Edwards, A.J.; Hunt, R.; Palmer, L.; Medawar, P.B. T-cell-mediated enhancement of host-versus-graft reactivity in mice fed a diet enriched in vitamin A acetate. **Nature**, v.302 (24), p.338-340, 1983.

Marinone, M.G.; Rizzoni, D.; Ferrei, P.; Rossi, G.; Izzi, T.; Brusotti, C. Late taste disorders in bone marrow transplantation: clinical evaluation with taste solutions in autologous and allogeneic bone marrow recipients. **Haematologica**, v.76, p.519-522, 1991.

Markovic, B.M.; Djuric, V.J.; Lazarevic, M.; Jankovic, B.D. Anaphylactic shock-induced conditioned taste aversion. I. Demonstration of the phenomenon by means of three modes of CS-US presentation. **Brain Behav. Immun.**, v.2 (1), p.11-23, 1988.

Marshall, J.S.; Bienenstock, J. The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. **Current Opinion in Immunology**, v.6, p.853-859, 1994.

Mattes, R.D. Salt taste and hypertension: A critical review of the literature. **J. Chron. Dis.**, v.37, p.195, 1984.

McCarthy, D.O.; Kluger, M.J.; Vander, U.A. The role of fever in appetite suppression after endotoxin administration. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.40, p.310-316, 1984.

McKay, D.; Bienenstock, J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. **Immunol. Today**, v.15 (11), p.533-551, 1994.

Metcalfe, D.D. Food allergy. In: **Handbook of Mucosal Immunology**. J. Academic Press, New York, p.493-504, 1994.

Meyer A.L.; Benson, J.M.; Gienapp, I.E.; Cox, K.L.; Whitacre, C.C. Suppression of murine chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein. **J. Immunol.**, v. 157(9), p. 4230-4238, 1996.

Molrine, D.C.; Polk, D.B.; Ciamarra, A.; Phillips, N.; Ambrosino, D.M. Impaired human responses to tetanus toxoid in vitamin A-deficient SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. **American Society for Microbiology**, v.63 (8), p.2867-2872, 1995.

Moreau, M.C.; Corthier, G. Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. **Infection and Immunity**, v.56 (10), p.2766-2768, 1988.

Moreau, M.C.; Gaboriau-Routhiau, V. The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. **Res. Immunol.**, v.147, p.49-59, 1996.

Mori, M.; Kawada, T.; Ono, T.; Torii, K. Taste preference and protein nutrition and L-aminoacid homeostasis in male Sprague-Dawley rats. **Physiol. Behav.**, v.49 (5), p.987-995, 1991.

Moussavi, A.; Dearman, R.J.; Kimber, I.; Kemeny, D.M. Cytokine production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mice following primary exposure to chemical allergens: Evidence for functional differentiation of T lymphocytes in vivo. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.116, p.116-123, 1998.

Mowat, A.M.; Lamont, A.G.; Bruce, M.G. A genetically determined lack of oral tolerance to ovalbumin is due of the immune system to respond to intestinally derived tolerogen. **Eur. J. Immunol.**, v. 17(11), p.1673-1676, 1987.

Mowat, A.M.; Weiner, H.L. Oral tolerance: physiological basis and clinical applications. In: **Handbook of Mucosal Immunology**, (second ed.). San Diego: Academic Press, 1998.

Mygind, N.; Dahl, R.; Pedersen, S.; Thestrup-Pedersen, K. Essential Allergy. **Blackwell Science Ltd**, second edition, 1996.

Nakao, A.; Kasai, M.; Kumano, K.; Nakajima, H.; Kurasawa, K.; Iwamoto, I. High-dose oral tolerance prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. **Intern. Immunol.**, v.10 (4), p.387-394, 1997.

Ngan, J.; Kind, L.S. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J. Immunol.*, v.120 (3), p.861-865, 1978.

Nicklin, S. Intestinal uptake of antigen- immunological consequences. In: **Immunology of the gastrointestinal tract- Vol.I**, CRC Press, Inc., p.87-109, 1987.

Nolan, L.J.; McCaughey, S.A.; Giza, B.K.; Rhinehart-Doty, J.A.; Smith, J.C.; Scott, T.R. Extinction of a conditioned taste aversion in rats: I. Behavioral effects. *Physiol. Behav.*, v.61 (2), p.319-323, 1997.

Patel, M.G. The effect of dietary intervention on weight gains after renal transplantation. *J. Ren. Nutr.*, v.8 (3), p.137-141, 1998.

Peng, H.J.; Turner, M.W.; Strobel, S. The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunology*, v. 67(3), p. 425-430, 1989.

Plata-Salaman, C.R. Food intake suppression by immunomodulators. *Neurosci.Res.Comm.*, v.3, p.159-165, 1988.

Plaut, M. Cytokines and modulation of diseases of immediate hypersensitivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.685, p.512-520, 1993.

Profet, M. Pregnancy sickness as adaptation: a deterrent to maternal ingestion of teratogens. In: Barrow, J.H.; Cosmides, L.; Tooby, J. **The Adapted Mind**, New York, Oxford University press, p.327-365, 1992.

Reed, D.R.; Friedman, M.I.; Tordoff, M.G. Experience with a macronutrient source influences subsequent macronutrient selection. *Appetite*, v.18 (3), p.223-232, 1992.

Ribeiro, R.P.P.; Oliveira, L.M.; Santos, J.E. Selection of an intact casein ou casein hydrolysate diet by rats submitted to protein deprivation an bowel resection. *Physiol. Behav.*, v.63 (2), p.185-189, 1998.

- Richter, C.P. Total self regulatory functions in animals and human beings. *Harvey Lect.*, v.38, p.63-103, 1943.
- Roitt, I.M.; Brostoff, J.; Male, D. *Immunology*. Mosby, (Fourth edition), 1996.
- Rozin, P. Acquisition of stable food preferences. *Nutr. Rev.*, v.48 (2), p.106-113, 1990.
- Saklayen, M.G.; Pesce, A.J.; Pollak, V.E.; Michael, J.G. Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 73(1), p. 5-9, 1984.
- Sanderson, I.R.; Walker, W.A. Mucosal barrier. In: **Handbook of Mucosal Immunology**. J. Academic Press, New York, p.41-51, 1994.
- Sanderson, I.R.; Walker, W.A. Uptake and transport of macromolecules by the intestine. In: **Intestinal immunology and food allergy** - Nestlé Nutrition Workshop Series, v.34, p.19-36, 1995.
- Senda, S.; Cheng, E.; Kawanishi, H. Aging-associated changes in murine intestinal immunoglobulin A and M secretions. *Scand. J. Immunol.*, v.27, p.157-164, 1988.
- Shigenaga, M.K.; Ames, B.N. Oxidants and mitogenesis as causes of mutation and cancer: the influence of diet. *Basic Life Sci.*, v.61, p.419-436, 1993.
- Stead, R.H.; Tomioka, M.; Quionez, G.; Simon, G.T.; Felten, S.Y.; Bienestock, 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.
- Stevens, A.; Lowe, J. *Histologia*. Editora Manole, São Paulo, 1995.
- Stites, D.P., Terr, A.I. *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro, Rj: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1992.

Stokes, C.R.; Swarbrick, E.T.; Soothill, J.F. Genetic differences in immune exclusion and partial tolerance to ingested antigens. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 52(3), p. 678-684, 1983.

Strobel, S.; Mowat, A.M.; Drummond, H.E. Age at first feed influences the immune responses to fed antigens in mice. *Pediat. Res.*, v.15, p.1193-1197, 1981.

Sudo, N.; Sawamura, S.; Tanaka, K.; Aiba, Y.; Kubo, C.; Koga, Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *The Journal of Immunology*, v.159, p.1739-1745, 1997.

Sweeny, J.M.; Seiber, H.E.; Woda, C.; Schulkin, J.; Haramati, A.; Mulrone, S.E. Evidence for induction of a phosphate appetite in juvenile rats. *Am.J.Physiol.*, v.275 (4 pt 2), p.1358-1365, 1998.

Tempel, D.L.; Leibowitz, K.J. ; Leibowitz, S.F. Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides*, v.9 (2), p.309-314, 1988.

Tempel, D.L.; McEwen, B.S. ; Leibowitz, S.F. Effects of adrenal steroid agonists on food intake and macronutrient selection. *Physiol. Behav.*, v. 52 (6), p.1161- 1166, 1992.

Tempel, D.L.; Kim, T.; Leibowitz, S.F. The paraventricular nucleus is uniquely responsive to the feeding stimulatory effects of steroid hormones. *Brain Res.*, v.614 (1-2), p.197-204, 1993.

Tlaskalova-Hogenova, H. Sterzl, J.S.R. Development of immunological capacity under germ free and conventional conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.409, p. 96-114, 1983.

Todrank, J.; Bartoshuk, L.M. A taste illusion: taste sensation localized by touch. *Physiol. Behav.*, v.50, p.1027-1031, 1991.

Treener, C.M.; Bernstein, I.L. Tumor- induced diet aversions persist after successful excision of an anorexigenic tumor. *Physiol. Behav.*, v. 40 (3), p.297-300, 1987.

Vajkoczy, P.; Lehr, H-A.; Hübner, C.; Arfors, K-E.; Menger, M.D. Prevention of pancreatic islet xenograft rejection by dietary vitamin E. *Am. J. Pathol.*, v.150 (4), p.1487-1495, 1997.

Van der Heidjen, P.J.; Stock, W.; Bianchi, A.T.J. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total "background" immunoglobulin production. *Immunology*, v.62, p.551-555, 1987.

Vaz, N.M. Anaphylactic sensitization of mouse tissues with IgG and reaginic antibodies. In: Austen KF (Editor), *Biochemistry of Acute Allergic Reactions*. Blackwell, Oxford, p.91-109, 1972.

Vaz, N.M.; Accioly, M.C.A.J.; Mendonça, C. Indução imunológica de aversão específica à ingestão de alimentos novos e sua inibição pela prévia ingestão do alimento (que induz tolerância oral). *Sumários do VII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia*, Cambuquira, MG, 1981.

Vaz, N.M.; Rios, M.J.; Lopes, L.M.; Gontijo, C.M.; Castanheira, E.B.; Jacquemart, F.; Andrade, L.A. Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 20(6), p.785-790, 1987.

Veda, K.; Yamazaki, S.; Someya, S. Hyporeactivity to tuberculin in germ free mice. *J. Reticuloendothel. Soc.*, v. 18, p. 107-113, 1975.

Verdolin, B.A.; Faria, A.M.C.; Carvalho, C.R.; Lahmann, W.M.; Vaz, N.M. Systemic immunization of mature mice by the oral route. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 26(7), p. 725-734, 1993.

Veyrat-Durebex, C.; Alliot, J. Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol. Behav.*, v.62 (6), p. 1273-1278, 1997.

Wannemuehler, M.J.; Kiyono, H.; Babb, J.L.; Michalek, S.M.; McGhee, J.R. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *The Journal of Immunology*, v.129 (3), p.959-965, 1982.

Wasserman, S.I. Mediators of immediate hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.72, p.101-113, 1983.

Wilson, I.F. Severe reduction in food intake by pregnant rats resembles a learned food aversion. *Physiol. Behav.*, v.41, p.291-295, 1987.

Wurtman, J.J.; Wurtman, R.J. Drugs that enhance central serotonergic transmission diminish elective carbohydrate consumption by rats. *Life Sci.*, v.24 (10), p.895-904, 1979.

Yokogoshi, H.; Theall, C.L.; Wurtman, R.J. Selection of dietary protein and carbohydrate by rats: changes with maturation. *Physiol. Behav.*, v.36, p.979-982, 1985.

Zhang, Z.; Kimura, M.; Itokawa, Y. The decrement of carcinogenesis by dietary selenium and expression of placental form of glutathione-S- transferase in rat glioma. *Biol. Trace Elem. Res.*, v. 57 (f2), p.147-155, 1997.

Zuany-Amorim, C.; Vargaftig, B.B.; Pretolani, M. Modulation by IL-10 of antigen-induced allergic responses in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.92-suppl.II, p.141-146, 1997.