

**TOLERÂNCIA E INFLAMAÇÃO: UM ESTUDO DA  
IMUNO-REGULAÇÃO EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE GASTRITE E COLITE  
INDUZIDOS POR ÁLCOOL**

**Mariléia Chaves Andrade**

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

co-Orientador: Geovanni Dantas Cassali

Área de concentração: Imunologia

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia  
do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências

Mariléia Chaves Andrade

**TOLERÂNCIA E INFLAMAÇÃO: UM ESTUDO DA IMUNO-  
REGULAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE  
GASTRITE E COLITE INDUZIDOS POR ÁLCOOL**

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

co-Orientador: Geovanni Dantas Cassali

Área de concentração: Imunologia

Tese apresentada ao Departamento de  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais para obtenção  
do Título de Doutor em Ciências

Belo Horizonte

2003

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.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 140344/1999-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

“Deve haver um espaço onde o ser humano tenha liberdade de representar, de alguma forma, sua essência. Sem que seja purificada no filtro de regras, sem passar por avaliações, sem estar atado a algum tipo de sistema. A verdadeira arte é assim: nua, desmascarada, descomprometida. É a criação de algo do nada. É a aparição do pensamento único de cada ser, na folha em branco, na tela, no espaço. É necessário abrir aspas e deixar a arte falar.”

Michele Muller

Àqueles que estão ao meu lado, sem necessariamente  
estarmos juntos;

Àqueles que com atos de puro desprendimento e  
dedicação, muitas vezes abandonaram seus sonhos para  
que eu pudesse sonhar os meus;

Àqueles que respeitam nossas diferenças de gostos,  
crenças, filosofia de vida e que fazem da convivência  
felizes momentos, onde fragmentos de vidas vão sendo  
somados à histórias de cada um...

Eu dedico esse trabalho à minha família, por toda  
legitimidade que há em cada um de vocês, que de  
diferentes maneiras são os responsáveis por eu ser o que  
sou.

À Juscilene, ou simplesmente Ju, pessoa  
única, com características peculiares,  
sentimentos inigualáveis, de quem eu  
tenho extraído muita coisa sobre ciência e  
vida.

Você é realmente especial.

À Vivi, por ter feito a minha vida mais  
doce e terna. Vou sentir saudades...

## AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

- Análise fagocítica de macrófagos – Prof. Oscar de Mesquita Nassif, e o estudante de doutorado José Coelho, laboratório de Física Estatística, Departamento de Física, ICEX, UFMG
- Análises histológicas – Prof. Geovanni Dantas Cassali ; Prof. Denise Carmona Cara Machado, Departamento de Patologia, ICB, UFMG
- Experimentos de fenotipagem celular – Dr. Olindo M. Assis Filho, e a estudante de iniciação científica Josiane Quetz, Laboratório de Doença de Chagas, Instituto de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ - Belo Horizonte- MG
- Utilização do FACScalibur e animais IL4R-/- - Dr. Rodrigo Corrêa, Instituto de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ - Belo Horizonte- MG
- Animais TS-Ab/Hets - Prof. Antônio Carlos da Silva, UERJ
- *Kit* para dosar de EtOH na circulação – Profa. Angela Vieira, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG
- *Kit* para dosar IL-6 - Profa Débora Reis, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG
- Utilização do fluxo laminar - Prof. Cristiano Machado Gontijo, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG
- Experimentos de contagem de eritrócitos e leucócitos - Frankinéia Assis, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG
- Experimentos gerais - Frankinéia Assis, Magda Rosa, Elaine Speziali de Faria, Alice Oliffson, Danielle Foschetti, Michele Mendes Barsante, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG
- Dosagem de quimiocinas e reagentes para dosar NO – Prof. Mauro Martins Teixeira, e as estudantes de doutorado Vanessa Pinho, Danielle Souza e Michele Barsante , pela dosagem de quimiocinas e de reagentes para dosar NO

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Ana Maria Caetano de Faria, por toda pluralidade e sensibilidade, que fizeram com que minha formação não fosse somente profissional.

Ao Nelson por imprimir uma característica única à ciência, em que o aprendizado passa a ser inevitável e prazeroso.

À Juscilene, por todas as suas reflexões tanto profissionais quanto pessoais que me fazem parar e dizer: "É, a Ju estava certa."

À minha família, por ser exatamente como é, e me querer tão bem.

Ao Buick e Vick, que transformaram os seus dias de cão nos mais maravilhosos dias da minha vida.

Ao ximbim por estar sempre comigo.

À Denise Carmona, por toda nossa história.

Ao Geovanni Cassali pela disponibilidade em me ajudar sempre que necessário.

Ao Olindo Assis, por estar sempre por perto.

Aos meus grandes amigos da graduação, o início de tudo há 10 anos, e a perpetuação de uma história...

À Ildinha, por todo o carinho de uma pessoa que para mim é uma referência como mulher.

À minha amiga Elaine Spezialli, referência dos bons tempos que não voltam mais...

À Frankcinéia Assis pela amizade, e por toda competência que possibilita a realização do nosso trabalho.

À Magda Rosa, por dividir comigo o meu trabalho com muito entusiasmo e dinamismo, e pelo apoio fundamental nessa fase de finalização da tese.



À Danielle Foschetti, Alice Oliffson, Joana do Amaral pela amizade e pela disponibilidade em momentos difíceis.

Ao Adolfo Firmino, por sua alegria contagiante, sua amizade, e por ser uma pessoa extremamente solícita, me ajudando nos problemas computacionais, dentre outros.

Ao Rafahel Carvalho, uma pessoa maravilhosa que tive o privilégio de conhecer.

Aos amigos do laboratório de Imunobiologia Luiz Fernando, André Pires Ítala Guimarães, Raphaela Fernades, Cristiane Tolentino, pela convivência especial.

Ao Miguel Ortega, pela amizade e pelas infindáveis conversas sempre em lugares agradáveis ao paladar.

Ao Daniel Mucida, o mineiro mais carioca que conheci.

Aos amigos do BATAKA, uma convivência recente mas intensa, embalada no ritmo envolvente dos atabaques.

Aos professores da ACORDE, Luiz Claudio, Serginho, Gustavo, Amanda, Bárbara, por toda a música, que tanto contribui para o meu equilíbrio espiritual.

Aos amigos Lau, Vanderley, Filé, Edmar, pelas palavras carinhosas.

À genialidade do Chico Buarque, cuja música embala o meu dia a dia.

À todo misticismo que existe entre o céu e a terra, e sabe-se lá onde mais...

À deusa, pela dualidade que encanta e pela energia que hipnotiza.

Muito Obrigada.

“Assim eis terminada a minha obra  
Que destruir não poderão jamais  
A cólera de Jove, o ferro, o fogo  
E a passagem do tempo. Quando o dia  
Em que pareça minha vida incerta  
Chegar, o que em mim há de melhor  
Não há de perecer. Subindo os astros  
Meu nome por si mesmo viverá.  
Em toda a parte onde o poder de Roma  
Se estende sobre as terras submissas,  
Os homens me lerão, e minha fama  
Há de viver, por séculos e séculos,  
Se valem dos poetas os presságios.”

(Em Metamorfoses, de Ovídio)

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1-A grande área superficial das mucosas.....	1
2- O intestino como maior órgão linfóide.....	1
3- Estimulação antigênica no intestino: dieta e microbiota.....	2
4- Tolerância oral.....	4
5- Fatores do microambiente intestinal importantes na regulação da mucosa	5
5.1- células regulatórias.....	6
5.2- citocinas.....	8
5.3- quimiocinas.....	11
5.4- prostaglandinas.....	13
6- Inflamação intestinal como consequência de perturbações na regulação imune da mucosa.....	15
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
1- Animais.....	24
2- Modelos de inflamação gastrointestinal.....	24
2.1- gastrite.....	24
2.2- colite.....	24
3- Análise histológica.....	25
3.1- colorações de rotina.....	25
3.2- contagem de linfócitos intraepiteliais e de células totais da <i>lamina propria</i> .....	25
4- Medida da concentração de EtOH na circulação.....	26
5- Atividade proteolítica no estômago.....	26
6- Coleta de muco no trato gastrointestinal.....	27
7- Preparação de extratos de tecidos.....	27

8- Contagem de hemácias e leucócitos no sangue.....	28
9- Preparação de suspensões celulares.....	28
9.1- cultura de células linfóides.....	28
9.2- cultura de células peritoneais enriquecidas de macrófagos	29
10- Análise da atividade fagocítica de macrófagos pela pinça óptica.....	30
11- Medida da produção de óxido nítrico (NO).....	31
12- Medida da produção de citocinas por ELISA.....	31
13- Medida da produção de quimiocinas MIP-2 e MCP-1.....	32
14- Medida de imunoglobulinas séricas e IgA secretória por ELISA.....	32
15- Medida de IgE total por ELISA.....	33
16- Tolerância e imunização parenteral.....	33
17- Medida da tolerância estabelecida para uma proteína da dieta – caseína.	35
18- Medida da absorção de proteínas.....	36
19- Avaliação da permeabilidade vascular.....	36
20- Teste de aversão.....	37
21- Medida de anticorpos séricos anti-ova e anti-caseína por ELISA.....	37
22- Medida de IgG1 e IgG2a por ELISA.....	38
23- Medida de IgE anti-Ova por ELISA.....	38
24- Medida de IgA secretória anti-Ova por ELISA.....	39
25- Medida da concentração de Ova na circulação por ELISA.....	39
26- Análise estatística.....	40
27- Soluções usadas.....	40
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
I- Caracterização da gastrite e das alterações resultantes do processo inflamatório após o tratamento com etanol.....	43
I-1. O tratamento agudo com etanol resultou em alterações morfológicas no estômago.....	44
I-2. Alterações gastrointestinais funcionais induzidas pelo processo inflamatório.....	49
I-2.1. Animais com gastrite apresentam gastromegalia.....	49

I-2.2. Há uma alteração na velocidade de degradação proteolítica no estômago de animais com gastrite.....	51
I-2.3. Nos animais com gastrite há uma nítida diminuição do muco estomacal devido a uma redução no número de células secretoras.....	53
I-2.4. Alterações epiteliais resultantes da gastrite interferem na absorção de proteínas.....	56
I-3. Alterações imunológicas locais induzidas pelo álcool e pelo processo inflamatório.....	58
I-3.1. Há uma alteração na concentração de quimiocinas no estômago de animais com gastrite.....	58
I-3.2. A gastrite está associada à produção de um padrão misto de citocinas no estômago.....	60
I-3.3. Há uma drástica redução na concentração de IgA secretória no estômago de animais com gastrite.....	62
I-4. Análise dos efeitos sistêmicos induzidos pelo álcool e pelo processo inflamatório.....	64
I-4.1. O etanol é uma substância rapidamente metabolizada por camundongos C57BL/6.....	64
I-4.2. Anemia e leucopenia são alterações sanguíneas marcantes após a indução de gastrite.....	65
I-4.3. Efeito da administração de álcool e da gastrite no peso corporal dos animais.....	67
II- Repercussão das alterações inflamatórias sobre eventos imunológicos fisiológicos como a tolerância oral.....	68
II-1. Animais com gastrite se tornam refratários à indução de tolerância oral à Ova analisada pela produção de anticorpos específicos.....	69
II-1.1. A entrada da Ova no contexto inflamatório é um fator importante para as alterações na indução de tolerância oral.....	71
II.2. Os animais com gastrite são sensibilizados após a exposição à Ova pela via oral.....	72

II-3. A capacidade de desenvolver uma resposta imune contra Ova não está alterada em um tempo inicial após a indução de gastrite.....	75
II-4. A indução de tolerância por via endovenosa também está comprometida nos animais com gastrite.....	76
II-5. Animais com gastrite apresentam uma deficiência na indução de tolerância oral para a reatividade celular in vivo e alterações na reação de hipersensibilidade retardada (DTH).....	77
III- Hipóteses explicativas para a diminuição da susceptibilidade à indução de tolerância oral nos animais com gastrite.....	82
III-1. Animais tornam-se atópicos após a indução de gastrite.....	83
III.1.1. Animais com gastrite apresentaram um aumento nos níveis séricos de IgE total.....	83
III.1.2. Células do baço de animais com gastrite produzem IL-4 mas não IL-10.....	84
III-2. Ova administrada por via oral se torna um potente alérgeno nos animais com gastrite.....	86
III-2.1. Aumento da permeabilidade vascular após o desafio oral com Ova no estômago de animais com gastrite previamente sensibilizados.....	86
III-2.2. Animais com gastrite sensibilizados com Ova por via oral, desenvolvem aversão à ingestão de uma solução contendo o antígeno.....	88
III-3. A atividade dos macrófagos está alterada nos animais tratados com etanol.....	91
III-3.1. Ocorre um atraso no clareamento da Ova da pata de animais com gastrite durante a reação de DTH.....	91
III-3.2. O tempo de fagocitose está drasticamente alterado nos animais com gastrite.....	94
III-3.3. Atividades efectoras de macrófagos, como produção de NO e IL-6, estão diminuídas 1 dia após a indução de gastrite mas essas atividades estão recuperadas 30 dias depois.....	98
IV- Demonstração da abrangência dos efeitos inflamatórios da gastrite sobre a tolerância oral.....	101

IV-1. Alterações inflamatórias após a indução de gastrite são suficientes para tornar refratários animais geneticamente selecionados para alta susceptibilidade à indução de tolerância oral para Ova.....	102
IV-2. As alterações inflamatórias desencadeadas nos animais com gastrite foram capazes de quebrar a tolerância oral já estabelecida para proteínas da dieta.....	105
V- Efeito de processos inflamatórios no intestino grosso sobre a indução de tolerância oral.....	108
V-1. Colite é induzida após o tratamento intrarectal com etanol.....	109
V-2. Alterações no perfil de citocinas nos linfonodos de drenagem do intestino delgado e grosso e no baço após a indução de colite.....	111
V-3. Animais com colite se tornam refratários à indução de tolerância oral para Ova.....	113
<b>DISCUSSÃO</b> .....	114
Os efeitos do álcool e da gastrite na indução de tolerância oral.....	115
Os efeitos do álcool e da colite na indução de tolerância oral.....	133
<b>CONCLUSÕES</b> .....	136
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	139
<b>ANEXOS</b> .....	161

---

**RESUMO E ABSTRACT**



## RESUMO

A maioria dos contatos naturais com antígenos ocorre pela mucosa do trato gastrointestinal. Esses contatos resultam normalmente no desenvolvimento de um estado de hiporreatividade sistêmica a esses antígenos chamado de tolerância oral. A tolerância oral depende de mecanismos regulatórios desencadeados no microambiente da mucosa intestinal e perturbações inflamatórias nesse local podem interferir no seu estabelecimento. Nesse estudo, desenvolvemos dois modelos experimentais de patologias inflamatórias da mucosa adjacente ao intestino delgado: gastrite e colite induzidas pela administração aguda de álcool. Embora induzidas em duas raças diferentes de camundongos, C57BL/6 e BALB/c, ambas as doenças caracterizam-se por um infiltrado de células mono e polimorfonucleares na mucosa e pela produção local de citocinas também de um padrão misto: IL-4 e IFN- $\gamma$ . Nesses modelos, ocorrem perturbações no balanço de citocinas não somente no local mas em toda a mucosa intestinal sendo IL-4 a principal citocina afetada. Os animais com gastrite ou com colite tornam-se refratários à indução de tolerância oral. Os efeitos imunológicos do álcool foram estudados em mais detalhe no modelo de gastrite. Embora o álcool seja rapidamente metabolizado, várias alterações funcionais locais e sistêmicas são detectáveis nos animais com gastrite, tais como redução da atividade proteolítica e da produção de muco e de IgA secretória no estômago, anemia e leucopenia. Nesse modelo, mostramos também várias evidências de que a administração oral de álcool induz uma inflamação com características alérgicas e com repercussões sistêmicas importantes no sistema imune. Ocorre um aumento da produção de IL-4 no estômago e no baço assim como um aumento nos níveis séricos totais de IgE nos animais com gastrite. A administração oral de Ovalbumina (Ova) nesses animais induz aumento da permeabilidade vascular e do recrutamento de eosinófilos na mucosa do estômago além de desencadear uma sensibilização que aumenta os níveis de IgG1 e IgE após a imunização parenteral. Esses animais sensibilizados apresentam aversão à ingestão de uma solução contendo Ova. Além disto, a reação de DTH desencadeada nos animais com gastrite é marcada pela presença de eosinófilos e se assemelha, nas características histológicas e na cinética, à fase tardia da hipersensibilidade imediata. Essas alterações inflamatórias juntamente com o comprometimento de mecanismos locais e sistêmicos de imuno-regulação, como a redução na produção de IL-10 por células do baço, podem

ser responsáveis pelos distúrbios marcantes observados na indução de tolerância. Camundongos com gastrite são refratários à indução de tolerância por via oral e por via endovenosa para Ova. Camundongos geneticamente selecionados para a susceptibilidade à tolerância oral também se tornam refratários após o tratamento oral com álcool e o mesmo tratamento é capaz de eliminar a tolerância oral já estabelecida para uma proteína da dieta de camundongos C57BL/6, a caseína. Observamos também que o clareamento da Ova injetada por via subcutânea está comprometido nos animais com gastrite. A análise da atividade de macrófagos nesses animais mostrou uma redução significativa no tempo e na eficiência da fagocitose até 30 dias depois da última administração de álcool ainda que atividades efetoras como a produção de IL-6 e NO estejam alteradas apenas por um breve período pós-tratamento. Como a apresentação de antígenos é um evento importante na ativação de linfócitos T, essa pode ser uma das alterações relacionadas à interferência na indução de tolerância no modelo apresentado. Em conclusão, esse estudo descreve dois modelos inéditos de patologias inflamatórias da mucosa do trato gastrointestinal e mostra que a administração aguda de álcool pode ter efeitos inflamatórios locais e sistêmicos assim como pode comprometer o estabelecimento da tolerância a antígenos naturais como aqueles presentes na dieta.

## ABSTRACT

The majority of natural contacts with antigens take place through the mucosa of the gastrointestinal tract. Usually, these contacts result in a state of systemic immunological hyporesponsiveness to the antigen named oral tolerance. Oral tolerance depends on regulatory mechanisms that are triggered in the microenvironment of the gut mucosa and local inflammatory disturbances may compromise its development. In this study, we report two novel experimental models of inflammatory pathologies in the mucosa adjacent to the small intestine, both induced by topic administration of alcohol: gastritis and colitis. Although they are induced in two different strains of mice, C57BL/6 and BALB/c respectively, both diseases are characterized by an inflammatory infiltrate of mono and polimorphonuclear cells and by the local production of a mixed profile of cytokines with the presence of IL-4 and IFN- $\gamma$ . In these experimental models, disturbances in the balance of cytokines occur not only locally but throughout the intestinal mucosa. IL-4 is the most affected cytokine. Animals with either gastritis or colitis are refractory to oral tolerance induction. The immunological effects of alcohol administration were studied in more detail in the gastritis model. Although alcohol is promptly metabolized, several local and systemic functional alterations can be detected in these mice, such as reduction in the proteolytic activity, in the production of mucus and secretory IgA in the stomach, anemia and leukopenia. In these animals, we also demonstrate that alcohol administration induces an allergic-type inflammatory response. There is an increase in the production of IL-4, both in the stomach and in the spleen, as well as a rise in the levels of serum IgE in mice with gastritis. Oral administration of ovalbumin (Ova) to these animals induces an increase in local vascular permeability and in the recruitment of eosinophils to the stomach. It also primes the animals augmenting the serum levels of specific IgG1 and IgE antibodies after parenteral immunization. Interestingly, sensitized mice show aversion to the intake of a sweetened Ova-containing solution. In addition, DTH reaction triggered in mice with gastritis is marked by the presence of eosinophils and it resembles, in the histology and in the kinetics, the late phase of the hypersensitivity type 1 reaction. Such inflammatory alterations along with disturbances in the systemic and local immunoregulatory mechanisms, such as IL-10 production by spleen cells, may be related to the interference in oral tolerance induction. Mice with gastritis are refractory to tolerance induction by oral and

intravenous routes. Mice genetically selected for susceptibility to oral tolerance induction to Ova become refractory after alcohol treatment and oral tolerance already established to a dietary protein, casein, can be disrupted by oral administration of alcohol. We also observed that the clearance of subcutaneously injected Ova is impaired in mice with gastritis. Analysis of macrophage activity in these mice shows a significant reduction in the time and efficiency of phagocytosis as long as 30 days after alcohol treatment although effector functions, such as IL-6 and NO production are only affected shortly after treatment. Since antigen presentation is an important event on the activation of T lymphocytes, it might be one of the alterations related to oral tolerance abrogation in this model. In conclusion, the present study describes two novel models of inflammatory pathologies of the mucosa of the gastrointestinal tract and shows that short-term alcohol administration have local and systemic immunological effects and it may compromise the development of oral tolerance to natural antigens such as dietary proteins.

---

**INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

- **A grande área superficial das mucosas**

A superfície total da mucosa de um indivíduo adulto é muitas vezes maior que a área exposta da pele, medindo aproximadamente  $400 \text{ m}^2$ . Somente o trato gastrointestinal contribui com 200 a  $300 \text{ m}^2$  dessa superfície (Moog, 1981). Essa enorme área intestinal é resultado de algumas adaptações morfológicas que aumentam a superfície de contato com materiais externos, como a presença de vilosidades intestinais e das microvilosidades, com um número de 200 a 300 mil em cada (Stevens and Lowe, 1995).

Uma característica importante das superfícies mucosas é a presença, nesse local, de um grande e complexo tecido linfóide associado, que é anatomicamente e funcionalmente distinto dos demais órgãos linfóides (Mowat and Viney, 1997). Denomina-se MALT (*Mucosa -Associated Lymphoid Tissue*) a integrada rede de elementos linfóides associados às superfícies internas do corpo, subdividida anatomicamente em GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*), BALM (*Bronchus- Associated Lymphoid Tissue*) e NALT (*Nasal-Associated Lymphoid Tissue*) identificada em humanos e camundongos (Brandtzaeg, 1996). Em 1979, McDermont e (McDermont and Bienenstock, 1979) apresentaram evidências que suportam o conceito de um tecido linfóide integrado de mucosas, demonstrando que linfoblastos IgA+ retirados do linfonodo mesentérico e marcados radioativamente, quando transferidos para camundongos normais, localizaram-se preferencialmente no trato intestinal, respiratório e genital.

### **2- O intestino como maior órgão linfóide do corpo**

Quando constatamos que a extensa superfície da mucosa intestinal está associada a um abundante tecido linfóide, não é surpreendente imaginarmos que o intestino representa o maior compartimento linfóide do corpo.

Segundo Mestecky (Mestecky, 1987) existem  $10^{12}$  células linfóides por metro de intestino delgado humano. A maioria dessas células encontra-se na *lamina propria* (LP) e de acordo com van der Heijden e colaboradores, mais de 80% das células produtoras

de anticorpos em camundongos normais secretam IgA e estão na LP do intestino. Esse número excede em várias vezes o número de células secretando imunoglobulinas de todos os outros órgãos linfóides juntos (van der Heidjen, et al., 1987). Os autores também demonstraram que a maior parte dessas células estão localizadas no duodeno, aproximadamente 45%, diminuindo em número no sentido caudal. Em humanos, 1 a 2 metros do intestino humano contém mais plasmócitos que todos os outros tecidos linfóides combinados (Mestecky, 1987).

Os linfócitos intraepiteliais (*IELs*, *Intraepithelial Lymphocytes*) representam aproximadamente 10% da população celular das vilosidades intestinais e coletivamente representam uma massa linfóide significativa que, se fosse agregada, teria o tamanho aproximado do baço, o maior órgão linfóide sistêmico (Brandtzaeg, et al., 1989).

Sabe-se que o número de células secretando imunoglobulinas no baço é relativamente constante durante a vida (Benner, et al., 1981), enquanto que, na superfície da mucosa intestinal, antígenos alimentares e da microbiota normal fornecem uma constante estimulação às células linfóides da mucosa, sendo responsáveis pela sua expansão e maturação no período pós-desmame. Assim, a emergência do tecido linfóide associado às mucosas ocorre ainda no período fetal (Campana, et al., 1989), mas seu desenvolvimento pleno está associado à estimulação por antígenos provenientes da dieta e da microbiota (Menezes, et al., 2003).

De fato, a superfície da mucosa intestinal é exposta continuamente e fisiologicamente a uma grande quantidade de materiais antigênicos externos. Estima-se que aproximadamente 80 g de proteínas entram em contato com o intestino humano por dia, sendo que 360 a 550 mg são absorvidas inteiras, sem haver digestão até peptídeos ou aminoácidos (Husby, et al., 1985) (Bruce and Ferguson, 1986) (Brandtzaeg, 1998). A microbiota é também uma fonte adicional de estimulação antigênica natural no intestino e o número de bactérias colonizando a mucosa colônica em humanos pode alcançar  $10^{12}$  microorganismos/grama de fezes (Faria and Weiner, 1999).

### **3- Estimulação antigênica no intestino: dieta e microbiota**

Vários estudos comprovam que o desenvolvimento pleno do GALT depende de estimulação antigênica. A presença maciça de células linfóides na mucosa intestinal aparentemente está relacionada à estimulação constante não só por antígenos da microbiota indígena, mas também pelos antígenos da dieta.

Sabe-se que a microbiota intestinal é importante para o desenvolvimento do GALT durante o período da vida neonatal e contribui durante toda a vida para manter seu estado fisiologicamente ativado. Esses estímulos exógenos são cruciais não somente para a função e desenvolvimento normais do sistema imune, mas também para a manutenção da morfologia intestinal, confirmando a estreita relação entre linfócitos e enterócitos. Animais isentos de germes (GF, *germ-free*) apresentam várias alterações morfológicas e imunológicas no trato gastrointestinal. As vilosidades intestinais são mais finas e maiores, as criptas mais profundas e a área total da superfície da mucosa é substancialmente reduzida (Gordon, 1961). Há uma perda de celularidade na LP onde praticamente não são encontrados plasmócitos e as placas de Peyer (PP) são menores e com poucos centros germinativos. A renovação celular é diminuída nesses animais e o tempo para células da mucosa migrarem das criptas para os vilos é duas vezes maior (Simon and Gorbach, 1984).

O intestino é um local de absorção de nutrientes, sendo a dieta uma grande e importante fonte de estimulação antigênica na superfície da mucosa. O GALT é estimulado cotidianamente por proteínas alimentares que escapam da degradação proteolítica no lúmen intestinal. Aproximadamente 0,01% dessas proteínas entram intactas, via células M, em contato com o tecido linfóide nas PPs. Existem alguns relatos sobre modificações imunológicas ocorridas em animais isentos de antígeno (*antigen-free*) ou minimizados do aporte antigênico (*antigen-minimized*). Os dados mostram que o tecido linfóide associado à mucosa está drasticamente alterado nesses animais, notando-se a ausência de PPs e nódulos linfáticos, a diminuição do número de IELs na mucosa e a ausência de IgG ou IgA séricas, mas não de IgM (Bos, et al., 1987, Pereira, et al., 1986).

Um estudo recente do nosso laboratório (Menezes, et al., 2003), avaliou os efeitos imunológicos da retirada do aporte de proteínas presentes na dieta de um animal convencional. Animais tratados desde o desmame com uma dieta balanceada cujo conteúdo de proteínas foi substituído por aminoácidos, apresentam um GALT deficientemente desenvolvido e alterações morfológicas na mucosa intestinal similares àquelas observadas em camundongos SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*). Eles apresentam ainda níveis diminuídos de IgA secretória, de IgG e IgA séricas, marcada redução no número de IELs e de células da *lamina propria*.



Essa proximidade cotidiana entre antígenos e linfócitos no trato gastrointestinal enfatiza a necessidade de mecanismos de manutenção da homeostase imunológica capazes de evitar uma resposta imune inapropriada com consequências patológicas.

#### **4- Tolerância oral**

Como consequência direta do contato contínuo com antígenos, as células do GALT apresentam-se predominantemente ativadas. A presença de células efectoras na LP e a produção local de citocinas inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-6 revelam, além disto, um potencial para o desenvolvimento de respostas inflamatórias. Entretanto, o que frequentemente se observa após o contato fisiológico diário dos antígenos da dieta e da microbiota, é um conjunto de mecanismos regulatórios desencadeados na superfície das mucosas. Esses mecanismos resultam na tolerância oral, um fenômeno fundamental na manutenção da homeostase imunológica.

A tolerância oral tem sido classicamente definida como uma supressão das respostas imunes humoral e celular a um determinado antígeno que tenha sido administrado previamente pela via oral. Fisiologicamente podemos imaginar o fenômeno como uma extensão da tolerância a auto-componentes, desencadeada por antígenos que estão na fronteira entre o meio externo e o corpo (Faria and Weiner, 1999).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno da tolerância oral. Weiner e outros pesquisadores propuseram que a dose do antígeno seria importante para determinar o mecanismo predominantemente induzido na tolerância oral. Baixas doses de antígeno favoreceriam a geração de supressão ativa, com a ativação de células regulatórias, e altas doses do antígeno favoreceriam o desenvolvimento de tolerância através de anergia ou deleção clonal (Weiner, 1997). A deleção clonal foi demonstrada em camundongos transgênicos para Ova (Ovalbumina), onde foi observada a redução de 10-20% do número de células CD4+ em vários órgãos linfóides após administração oral de altas doses de Ova (Chen, et al., 1995). A anergia é outro mecanismo proposto e tem sido definida como um estado de inativação funcional de linfócitos T, observado *in vitro* e caracterizado pela ausência de proliferação e produção de IL-2 (Schwartz, 1990). Tem sido descrito que altas doses de antígenos administrados oralmente resultariam em anergia/deleção de linfócitos específicos no intestino e, concomitantemente, na passagem do antígeno intacto ou em fragmentos

para a circulação, resultando na sua apresentação em órgãos linfóides sistêmicos como o baço. Entretanto, tais mecanismos foram descritos em condições artificiais, através do uso de animais transgênicos ou de medidas de reatividade *in vitro*. Existe um consenso entre os pesquisadores da área que esses mecanismos passivos não são os únicos envolvidos na tolerância oral. Mesmo para altas doses de antígenos, já foi demonstrada a produção de níveis significativos de TGF- $\beta$  após a administração oral de antígeno sugerindo que citocinas imunossupressoras podem estar envolvidas na indução de tolerância oral nesses casos (Faria and Weiner, 1999).

Ao contrário dos outros modelos, a supressão ativa propõe um mecanismo mais abrangente e biologicamente econômico para explicar a tolerância. Em primeiro lugar, seria extremamente custoso ao organismo eliminar física ou funcionalmente todos os linfócitos reativos com os antígenos presentes na dieta ou na microbiota. Em segundo lugar, várias evidências na literatura contradizem diretamente essas formas passivas de tolerância. Já foi demonstrado, por exemplo, que depois da administração oral de doses altas de vários antígenos, a supressão da reatividade celular pode ser transferida adotivamente usando linfócitos T das PPs, dos linfonodos mesentéricos e do baço (Gautam, et al., 1990). Em terceiro lugar, por mostrar um processo de regulação local necessariamente dependente de interações dinâmicas, a supressão ativa explica o surgimento súbito de patologias inflamatórias.

A imuno-regulação intestinal tem sido alvo de uma extensa discussão entre imunologistas na tentativa de se delinear eventos importantes no processo. Descreverei abaixo, sob a forma de tópicos, alguns dos vários fatores importantes na manutenção da homeostase imunológica no microambiente intestinal.

### **5-Fatores do microambiente intestinal importantes na regulação da mucosa**

A tolerância oral é um evento com repercussões sistêmicas mas sua indução depende de fatores presentes na mucosa intestinal. Mecanismos imunorregulatórios que mantêm a tolerância a antígenos da dieta e da microbiota são gerados no microambiente intestinal, onde vários tipos celulares e mediadores solúveis são importantes nesse contexto regulatório.

### 5.1. Células regulatórias

Há muitos relatos de que a presença de células regulatórias é um importante mecanismo para a indução de tolerância oral e natural. Tais células foram inicialmente demonstradas na manutenção da tolerância imunológica aos autocomponentes, embora o envolvimento de células chamadas de supressoras tenha um lugar importante na literatura sobre tolerância oral desde os anos 70.

Sakaguchi e Sakaguchi (Sakaguchi and Sakaguchi, 1988) demonstraram a importância de células emigrantes do timo na constante manutenção da homeostase imunológica em vários órgãos. Quando animais nude (atímicos) receberam transplantes de timo de animais tratados com ciclosporina, um potente imunossupressor com efeitos específicos em linfócitos T, eles desenvolveram doenças autoimunes órgão-específicas tais como gastrite, ooforite, tireoidite e insulite. Os animais também apresentaram aumento da produção de anticorpos para vários autocomponentes como, por exemplo, para células parietais gástricas. Outros experimentos dos mesmos autores, além de outros grupos de pesquisadores (Boguniewicz, et al., 1989, Sakaguchi, et al., 1985, Saoudi, et al., 1996)[Bonomo, 1995 #2240(Coutinho, et al., 1993) demonstraram que o timo está envolvido na produção contínua de clones de linfócitos potencialmente auto-reativos e de linfócitos supressores que, em condições normais, seriam capazes de controlar a auto-reatividade dos primeiros. Ou seja, a seleção da população de células regulatórias parece ser um evento intratímico embora sua atuação seja na periferia tanto no controle da auto-reatividade como no recrutamento de novas células para um padrão regulatório (Qin, et al., 1993).

Embora a importância do timo na tolerância esteja já estabelecida, existem várias polêmicas com relação aos mecanismos de geração dessa tolerância. Entre os defensores da existência de células regulatórias, a discussão mais recente envolve o fenótipo das células regulatórias que participam na manutenção da tolerância ao *self*. Sakaguchi e colaboradores (Sakaguchi, et al., 1995) demonstraram que a tolerância imunológica é mantida por células T ativadas expressando o receptor da cadeia  $\alpha$  da IL-2 (CD25). Células CD25+CD4+, que constituem 5 a 10% das células T periféricas de camundongos normais são capazes de impedir a proliferação *in vitro* de células CD25-CD4+ inflamatórias. Essa supressão, que resultou na reduzida produção de IL-2 pelas

células TCD25-CD4+, parece ser independente de citocinas como IL-10, IL-4 ou TGF- $\beta$ , mas depende de interações celulares com APCs (Takahashi, et al., 1998).

Um outro marcador de ativação identificado em células com funções regulatórias é a baixa expressão de uma das isoformas da molécula CD45. Há uma heterogeneidade funcional entre linfócitos TCD4+ expressando a isoforma CD45RB que diferencia o estado de ativação desses linfócitos. Subpopulações de linfócitos T CD4+ podem ser divididas em CD45RB<sup>high</sup> e CD45RB<sup>low</sup> de acordo com seu estado de repouso ou ativado, respectivamente. Importantes interações regulatórias ocorrem entre essas duas populações *in vivo*. De particular interesse, no nosso caso, são os relatos envolvendo a presença dessas células em modelos experimentais de colite. A transferência de baixas concentrações de células TCD4+CD45RB<sup>high</sup> de camundongos BALB/c normais para camundongos SCID resulta no desenvolvimento de um quadro de colite com um padrão inflamatório semelhante à reação típica de DTH (produção alta de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Em contraste, camundongos SCID reconstituídos com células TCD4+CD45RB<sup>low</sup> não desenvolvem a doença e a co-transferência de células TCD4+CD45RB<sup>high</sup> e TCD4+CD45RB<sup>low</sup> inibe completamente o desenvolvimento da doença. Essa inibição parece ser dependente da secreção de TGF- $\beta$  ou IL-10 (Asseman, et al., 1999), mas não de IL-4 (Powrie, et al., 1994) (Powrie, et al., 1996). A população de células T CD4+CD45RB<sup>low</sup> também pode ser subdividida baseado no nível de expressão de CD38 e essa heterogeneidade fenotípica é refletida funcionalmente. Células T CD45RB<sup>low</sup> CD38+ primadas não respondem a um segundo contato com o antígeno nem à estimulação policlonal enquanto que células T CD45RB<sup>low</sup> CD38- são prontamente ativadas (Read, et al., 1998).

Além da trabalhos demonstrando a geração de células regulatórias no período de desenvolvimento neonatal e de sua importância para a prevenção de autoimunidade, estudos de tolerância oral têm demonstrado que células regulatórias podem ser geradas na periferia, no tecido linfóide associado às mucosas, e podem produzir seu efeitos através da secreção de citocinas anti-inflamatórias e da interação entre linfócitos efetores e células dendríticas. Em sua revisão sobre tolerância oral, Faria e Weiner (Faria and Weiner, 1999) relatam experimentos mostrando que células regulatórias são geradas nas PPs depois da administração oral do antígeno, secretando citocinas supressoras como TGF- $\beta$  e que tais células podem migrar posteriormente para outros órgãos tais como o baço onde seriam responsáveis pela supressão sistêmica observada

na tolerância oral. Alguns trabalhos mais recentes relacionam ainda a tolerância oral com a geração de células T regulatórias CD25+ que seriam capazes de suprimir a atividade de células T inflamatórias *in vitro* também pela secreção de TGF- $\beta$  (Zhang, et al., 2001).

## 5.2. Citocinas

A atividade de linfócitos T denominados regulatórios pode ser mediada pela secreção de determinadas citocinas. A diferenciação de células virgens para um padrão pró-inflamatório ou regulatório depende de citocinas do microambiente. A presença de IL-12 direciona a diferenciação <sup>de</sup> linfócitos TCD4+ para um padrão descrito como Th1, enquanto que a presença de IL-4 induz diferenciação de linfócitos TCD4+ para um padrão denominado Th2. Por outro lado, ambos IL-4 e TGF- $\beta$  direcionam a diferenciação para um padrão descrito como Th3, onde existe um predomínio das citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 (Husband, et al., 1999). As citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  predominam no ambiente da mucosa intestinal onde elas apresentam ações autócrinas e parácrinas importantes no estabelecimento de eventos regulatórios e na inibição do desenvolvimento de uma resposta inflamatória no intestino [Δαψνεσ, 1990 #362] (Xu-Amano, et al., 1992). A mucosa intestinal normal expressa altos níveis basais de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Experimentos com camundongos transgênicos para o TCR reativo com um peptídeo da ovalbumina (OVA) mostram, além disto, que a administração oral de OVA é acompanhada por um aumento significativo na expressão de tais citocinas regulatórias (Faria and Weiner, 1999).

Vários efeitos dessas citocinas estão amplamente descritos. IL-4 inibe ativação de macrófagos e bloqueia a maioria dos efeitos dos macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , tais como o aumento da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ), de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (Hayashi, et al., 2000). Constitui um fator de crescimento e diferenciação para células Th2 e é responsável pela expansão de células Th2 já diferenciadas (Husband, et al., 1999). IL-4 estimula a expressão de certas moléculas de adesão, como VCAM-1, em células endoteliais e estimula a secreção de MCP-1 por essas células (Colotta, et al., 1992).

IL-10 inibe a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos, como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12, e também inibe funções acessórias de macrófagos na ativação de

linfócitos T. Esse efeito é devido à sua ação inibitória na expressão de moléculas de classe II do MHC e de moléculas coestimulatórias como B7.

IL-5 também é uma citocina produzida por células Th2 e por mastócitos ativados. IL-5 estimula o crescimento e a diferenciação de eosinófilos, sendo uma citocina importante em processos imunes envolvendo helmintos. Embora seja uma citocina importante no estabelecimento dos processos inflamatórios envolvendo eosinófilos, ela tem um papel importante na fisiologia do GALT onde atua juntamente com IL-4, IL-6 e TGF- $\beta$ , no processo de troca de isotipo e secreção de IgA no intestino (Husband, et al., 1999).

Linfócitos T e monócitos sintetizam TGF- $\beta$ , uma citocina que tem um efeito anti-proliferativo importante em células do sistema imune, inibindo a proliferação de linfócitos T, B, células NK, tímócitos, dentre outros, por impedir a progressão do ciclo celular. TGF- $\beta$  inibe a proliferação de linfócitos T estimulados com mitógenos policlonais, a maturação de linfócitos citotóxicos e a ativação de macrófagos. Também suprime a expressão de imunoglobulinas de superfície em linfócitos B e diminui a secreção de IgM e IgG. Entretanto, pode exercer uma ação trófica para algumas células, induzindo o crescimento de alguns tipos celulares como as células do epitélio do intestino. De extrema importância na imunidade de mucosa é sua capacidade de induzir troca de isotipo para IgA em camundongos e humanos. Também atua na inibição dos efeitos de citocinas pró-inflamatórias (Husband, et al., 1999).

A geração desse microambiente na mucosa intestinal depende provavelmente de um contexto inicial estabelecido em períodos precoces do desenvolvimento. Animais neonatos apresentam um padrão de citocinas do tipo Th2 e tal padrão parece estar relacionado com as condições imaturas das células apresentadoras de antígenos no período perinatal (Lu, et al., 1980). A maturação do sistema imune no período pós-desmame é acompanhada de um aumento na sua capacidade de estabelecer um perfil inflamatório de respostas nos órgãos linfóides (Menezes, et al., 2003). Interessantemente, o contato com antígenos e a consequente maturação do tecido linfóide associado às mucosas resulta num microambiente maduro, ativado mas anti-inflamatório. Certamente, a manutenção desse microambiente depende do contexto local em que os antígenos são processados, qual o tipo de APC envolvida na sua apresentação e para que tipo de linfócito T os antígenos são apresentados. Ou seja, a modulação da ativação linfocitária nas mucosas no momento de contato com o antígeno

é uma característica central na sua capacidade de estabelecer tolerância após a administração do antígeno.

É possível que células dendríticas em sítios de constante exposição antigênica, sob influência de citocinas do microambiente, exerçam um papel fundamental na geração de um ambiente tolerogênico. Foi demonstrado que a expansão de células dendríticas *in vivo* pela administração do fator de crescimento Flt3L potencia significativamente a indução de tolerância oral (Vinney, et al., 1998). Iwasaki e colaboradores também já demonstraram que células dendríticas isoladas das placas de Peyer, mas não as isoladas do baço, produzem IL-10 e, ao apresentarem antígenos para linfócitos T virgens, induzem sua diferenciação para um padrão regulatório Th2 (Iwasaki and Kelsall, 1999). Células dendríticas de humanos tratadas com mediadores abundantes na mucosa como PGE<sub>2</sub> também produzem IL-10 e podem direcionar a diferenciação de células T virgens para um padrão Th2 (Kalinski, et al., 1997).

A questão da geração dos microambientes, no entanto, é complexa pois a diferenciação das células dendríticas também depende de mediadores químicos presentes no local e, provavelmente, da própria natureza da exposição antigênica. Recentemente Akbari e colaboradores (Akbari, et al., 2001) demonstraram que depois de 24 horas de exposição respiratória à Ova, células dendríticas pulmonares encontradas nos linfonodos bronquiais secretam IL-10. A cultura dessas células dendríticas produzindo IL-10 com células T CD4<sup>+</sup> específicas para Ova induziu o desenvolvimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produzindo IL-4 e altas concentrações de IL-10, um padrão característico de células T regulatórias do tipo I (Tr1), grandes produtoras de IL-10. Por outro lado, células dendríticas isoladas dos linfonodos mesentéricos de camundongos transgênicos para o TCR reativo com um peptídeo da Ova e tratados com Ova por via oral expressam quantidades aumentadas de TGF- $\beta$  quando estimuladas *in vitro* com o antígeno. A expressão de TGF- $\beta$  está associada a um aumento na produção dessa citocina por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, um padrão típico de células regulatórias Th3 (Weiner, 2001). Assim, o cenário criado pelo microambiente intestinal é marcado, dentre outros eventos, pela produção de citocinas supressoras, como IL-10 e TGF- $\beta$ , capazes de controlar o desenvolvimento das respostas imunes na mucosa, em parte, pela ação de células dendríticas e pela sua capacidade de induzir diferentes fenótipos de células regulatórias.

### 5.3- Quimiocinas

Sabemos que linfócitos T estão em constante migração, desde sua saída como células virgens do timo circulando através do sangue para os órgãos linfóides secundários até sua migração preferencial como células T efetoras para tecidos periféricos inflamados. O rolamento e a adesão de leucócitos do sangue na superfície endotelial, bem como a migração dessas células através do endotélio para o interstício dependem de fatores do microambiente dos tecidos (Homey and Zlotnik, 1999). A migração de células parece ser um evento crucial na criação de microambientes especiais já que o processo de ativação celular envolve a expressão de moléculas de adesão e o aparecimento destas direciona o posicionamento de células em diferentes locais do corpo e em diferentes regiões dos órgãos linfóides.

Quimiocinas são proteínas secretadas por uma ampla variedade de tipos celulares, de baixo peso molecular (8-10 KDa), que regulam o tráfico de leucócitos em condições fisiológicas e patológicas. Seu efeito biológico é mediado pela sua interação como proteínas solúveis com receptores específicos pertencente à superfamília de receptores transmembrana do tipo serpente acoplados à proteína G. As quimiocinas podem ser divididas em duas categorias: inflamatórias, que são induzidas ou hiperexpressas nos tecidos periféricos pela inflamação; e constitutivas, que estão envolvidas no tráfico constitutivo de leucócitos (Sallusto, et al., 1998).

Há mais de uma década, existem relatos sobre o papel das quimiocinas na migração de leucócitos durante eventos inflamatórios. Mas a migração direcionada pelas quimiocinas de tipos celulares especializados também está envolvida no tráfego normal de linfócitos entre e intra órgãos linfóides. Como o microambiente intestinal favorece o desenvolvimento de processos anti-inflamatórios ou regulatórios, as quimiocinas e sua ação nos eventos migratórios locais é certamente um dos fatores envolvidos nesse processo.

Linfócitos T virgens estão constantemente circulando do sangue para órgãos linfóides secundários como as PPs, onde podem permanecer após ativação ou retornar para a circulação sistêmica. Os mecanismos responsáveis pela retenção de linfócitos ativados nas PPs ainda não são claros, mas recentemente Kellermann e McEvoy



(Kellermann and McEvoy, 2001) demonstraram que o microambiente com que os linfócitos T virgens entram em contato nas PPs afeta sua capacidade de responder a quimiocinas podendo afetar assim sua capacidade de migração. A migração de linfócitos T virgens para a região interfolicular é influenciada por duas quimiocinas em particular, SLC (*Secondary Lymphoid-tissue Chemokine*) e MIP-3 $\beta$  (*Macrophage-Inflammatory Protein-3 $\beta$* ). Células T das PPs virgens ou estimuladas com ativadores policlonais, mas não do sangue periférico e de outros órgãos linfóides, apresentam uma resposta quimiotática reduzida para SLC e MIP-3 $\beta$ . Aparentemente fatores do microambiente local desempenham um papel importante no processo, uma vez que linfócitos do linfonodo periférico, que respondem bem a essas quimiocinas, quando transferidos para recipientes congênicos, migram para as PPs e apresentaram uma resposta quimiotática reduzida quando comparados com aqueles que migram para linfonodos periféricos.

As quimiocinas podem desempenhar outras funções além da regulação da migração de leucócitos. Taub e colaboradores (Taub, et al., 1996) demonstraram um papel para quimiocinas na co-estimulação de linfócitos, resultando no aumento da produção de IL-2 e na proliferação de clones de linfócitos T. Esses achados evidenciam outra função fisiológica para as quimiocinas indicando que sua expressão nas células da mucosa intestinal pode afetar não somente o tráfico de leucócitos, mas a diferenciação da função efetora de linfócitos Th e influenciar, portanto, a imuno-regulação local (Karpus, et al., 1998).

Poucos trabalhos têm abordado a participação de quimiocinas na migração de células durante o desenvolvimento de eventos fisiológicos como a tolerância imunológica periférica. Faunce e colaboradores (Faunce, et al., 2001) demonstraram que MIP-2 (*Macrophage Inflammatory Protein-2*) recruta células TNK (linfócitos T que expressam marcadores de células NK-*Natural Killer*), para o baço durante indução de tolerância periférica. Os autores utilizaram o modelo de ACAID (*Anterior Chamber-Associated Immune Deviation*) em que a tolerância periférica é induzida depois da inoculação do antígeno num sítio de imune privilégio, a câmara anterior do olho. O ACAID é demonstrado experimentalmente pela inibição da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH, *Delayed-Type Hypersensitivity*) na periferia (Sonoda, et al., 1999). Após a administração de Ova na câmara anterior do olho, há um aumento de RNAm para MIP-2 em células mononucleares do sangue periférico, demonstrando que

macrófagos derivados do olho contribuem para a produção dessa quimiocina. Além disto, ocorre concomitantemente um aumento na expressão de CXCR2, um receptor de alta afinidade para MIP-2, em linfócitos TNK recrutados para o baço. Sabe-se que células TNK são importantes para a geração de linfócitos T regulatórios depois da administração intraocular de antígenos.

Karpus e colaboradores (Karpus, et al., 1998), por sua vez, foram os primeiros a relatar a participação das quimiocinas na indução de tolerância oral. Trabalhando com o modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), esses autores demonstraram que a prevenção da doença induzida pelo tratamento oral com PLP (*Proteolipid protein*) está associada a um aumento da expressão de MCP-1 nas células das PPs e dos linfonodos mesentéricos (LNm). Além disso, a administração de anticorpos anti-MCP-1 concomitantemente com a administração oral de PLP abole a indução de tolerância oral. Os autores sugerem que o mecanismo provável de ação dessa quimiocina na tolerância seria diretamente seu efeito no aumento da produção local de IL-4, com consequente inibição de citocinas como IL-12 e potencialização da diferenciação de linfócitos T para um padrão Th2.

As quimiocinas apresentam um papel fundamental, não somente pela contribuição direta na indução de uma resposta anti-inflamatória na mucosa intestinal, favorecendo a diferenciação de linfócitos Th2, mas também por recrutarem células com funções imuno-regulatórias para órgãos linfóides secundários. Linfócitos T CD4+CD25+ e CD4+CD25- do sangue periférico de humanos apresentam uma resposta quimiotática distinta quando estimulados com diferentes quimiocinas como CCL1, CCL22 e CCL17. Essa resposta está relacionada à co-expressão em balanços distintos dos respectivos ligantes, CCR8 e CCR4. Sabe-se que linfócitos T ativados e APCs profissionais, como células dendríticas, além de outros tipos celulares no tecido inflamado, produzem essas quimiocinas e podem recrutar linfócitos T CD25+ que controlariam o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, talvez por uma inibição da função da APC ou supressão de linfócitos T efetores (Iellem, et al., 2001).

#### **5.4- Prostaglandinas**

As prostaglandinas, que são produtos do metabolismo do ácido araquidônico, chamados de eucosanóides, afetam uma ampla variedade de processos biológicos como a inflamação e a imuno-regulação. O ácido araquidônico é derivado diretamente de

fontes da dieta e não ocorre livre na célula, mas esterificado nos fosfolipídeos de membrana celular. Ele é liberado dos fosfolipídeos através de ativação de fosfolipases celulares por estímulos químicos, mecânicos ou físicos. O metabolismo desse ácido graxo pode ser realizado por duas vias: pela ação da lipooxigenase, que leva à produção de leucotrienos como LTB<sub>4</sub>, um potente agente quimiotático para neutrófilos; e pela ação da ciclooxigenase (COX), que leva à geração de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub>) e tromboxano. Drogas anti-inflamatórias não esteróides (NSAIDs, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), como indometacina, são potentes inibidores de COX (Robins, et al., 1994).

A ciclooxigenase existe como duas isoenzimas: COX-1, expressa constitutivamente, e COX-2, cuja expressão é induzida. Sabe-se que células mononucleares como macrófagos, mas não linfócitos T, quando ativados podem ser induzidos a expressar COX-2 e produzir metabólitos do ácido araquidônico dependentes dessa enzima, como PGE<sub>2</sub> (Newberry, et al., 1999). Até recentemente acreditava-se que prostaglandinas derivadas da ação de COX-1 mediarão ações protetoras na mucosa gastrointestinal, enquanto que prostaglandinas derivadas da ação de COX-2 desencadeariam propriedades inflamatórias (Morteau, 2000). Entretanto, vários estudos têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias associadas à ação de COX-2.

Estudos do intestino normal de camundongos e de humanos têm demonstrado, através da técnica de imunohistoquímica, a expressão de COX-2 por células mononucleares da LP (Stenson and Parker, 1980). É possível que essa população, sabidamente rica em macrófagos, possa produzir metabólitos do ácido araquidônico dependentes de COX-2 que modulariam a subsequente resposta imune a antígenos da dieta transportados para a LP via enterócitos. Nessa perspectiva, Newberry e colaboradores (Newberry, et al., 1999), demonstraram, em um elegante estudo, o papel de COX-2 na tolerância oral. Em seus experimentos, os autores observaram que a administração de HEL (*Hen Egg -White Lysozyme*) por via oral concomitantemente com a administração intraperitoneal de indometacina em camundongos transgênicos para HEL, resultou em uma inflamação patológica na porção proximal do intestino. Essa inflamação caracterizou-se pelo aumento de proliferação de células mononucleares da LP, de células das criptas e de atrofia das vilosidades. As mesmas alterações foram observadas quando foi administrado um inibidor direto de COX-2, NS-398. Experimentos *in vitro* demonstraram que níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por células

mononucleares da LP são capazes de suprimir a resposta proliferativa induzida pelo antígeno.

Embora prostaglandinas sejam importantes mediadores de inflamação em várias doenças, elas também constituem fatores importantes na regulação da fisiologia do trato gastrointestinal. Já são conhecidos alguns efeitos imunomodulatórios de PGE<sub>2</sub>, como a diminuição da regulação da expressão de MHC II (*Major Histocompatibility Complex* classe II) (Snyder, et al., 1982) e do receptor de IL-12, o aumento da produção de IL-10 (Kalinski, et al., 1997), a diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 (van der Pouw Kraan, et al., 1995) e o aumento da produção de muco.

Esse conjunto de dados sugere que metabólitos do ácido araquidônico dependentes de COX-2 são importantes para a regulação da proliferação e da diferenciação de linfócitos na *lamina propria* contribuindo para a criação do ambiente imuno-regulatório da mucosa intestinal.

## **6. Inflamação intestinal como consequência de perturbações na regulação imune da mucosa**

Como descrito acima, um integrado e complexo número de componentes são importantes na manutenção da homeostase imunológica na mucosa intestinal. Nesse contexto, uma alteração na fisiologia de qualquer componente pode levar potencialmente a um desequilíbrio imunológico e, conseqüentemente, a um estado de patologia. Por outro lado, o entrelaçamento de vários fatores de regulação e a redundância inerente aos sistemas biológicos possibilita a existência de vários mecanismos de compensação para lidar diariamente com os desafios normais da estimulação. Como resultado, a mucosa intestinal é um ambiente altamente regulado, onde é difícil desencadear uma resposta inflamatória patológica. Mesmo após administração de ciclofosfamida pela via oral, uma droga imunossupressora, a única alteração observada no intestino é aumento no número de IELs ((Mowat and Ferguson, 1981). A inflamação intestinal pode surgir, no entanto, como consequência de perturbações em eventos chave na manutenção da regulação intestinal. Pretendemos mostrar, nesse trabalho, que a perda da imuno-regulação inevitavelmente resulta em exarcebação da resposta contra antígenos da dieta gerando um contexto inflamatório que leva ao desencadeamento de doenças como hipersensibilidade a proteínas alimentares e doenças inflamatórias do trato gastrointestinal.

Animais geneticamente deficientes (*knockouts*) têm sido amplamente usados para se estudar a contribuição de vários fatores na manutenção da homeostase imunológica, pela possibilidade de deleção em genes que codificam uma proteína específica. Existem críticas a respeito do uso de um método pouco biológico, mas é inegável que ele tem sido uma importante ferramenta por fornecer direcionamentos a respeito da fisiologia do sistema imune.

Nos modelos experimentais de inflamação induzida pela eliminação (*knockout*) de alguns genes alvo, os animais desenvolvem inflamação no intestino com alterações patológicas que se assemelham clinicamente a doenças inflamatórias do intestino (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*) que ocorrem em humanos. IBD é uma condição inflamatória crônica, remitente, cuja etiologia é desconhecida e acomete pessoas de ambos os sexos ao longo da vida. A doença é clinicamente caracterizada por apresentar duas formas: colite ulcerativa (UC, *Ulcerative Colitis*) e doença de Crohn (CD, *Crohn's Disease*). As IBDs afetam predominantemente o cólon (UC e CD) e/ou o intestino delgado (CD) de uma maneira superficial (UC) ou transmural (CD). Estudos clínicos em humanos com IBD têm sugerido que fatores genéticos e ambientais desempenham um papel interrelacionado na patogênese da doença. Estudos em modelos animais têm fornecido evidências de um componente imunológico importante na gênese da doença, mostrando a possibilidade de IBD estar associada a uma desregulação da resposta imune na superfície da mucosa (Blumberg, et al., 1999).

Em camundongos  $IL-2^{-/-}$ , aproximadamente 50% dos animais morrem entre a 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semanas de uma doença que é caracterizada por esplenomegalia, perda de peso e anemia. Todos os animais que sobrevivem desenvolvem colite crônica, caracterizada por inflamação não granulomatosa da mucosa e submucosa, com grande aumento no número de linfócitos B e T na *lamina propria*. Os linfócitos T apresentam fenótipo de células ativadas expressando níveis elevados de CD44 e CD69. Além disto, eles se diferenciam em um padrão Th1 de secreção, caracterizado pela produção de  $IFN-\gamma$ , que pode inclusive estar envolvido na injúria da mucosa e diminuição na produção de IL-4 e IL-10. Um aumento no número de macrófagos e células dendríticas contribui para a perpetuação da inflamação já que macrófagos ativados secretam vários agentes lesivos para o tecido como radicais livres, enzimas, além de citocinas inflamatórias. O número aumentado de células dendríticas pode também contribuir para amplificar a inflamação por apresentarem antígenos locais. Foi observado também um aumento na expressão de MadCAM-1 nas HEVs (*High endothelium venules*) no ceco e na *lamina propria* do

cólon contribuindo para o aumento no recrutamento de células inflamatórias no tecido (McDonald, et al., 1997).

Animais IL-10<sup>-/-</sup> apresentam inicialmente um desenvolvimento imunológico normal. Entretanto, em condições convencionais e com a idade, esses animais desenvolvem anemia, retardo no crescimento e uma IBD crônica que afeta todo o trato intestinal. O duodeno, o jejuno proximal e o cólon são mais severamente afetados. As lesões são caracterizadas por hiperplasia das criptas epiteliais; a *lamina propria* e submucosa apresentam grande infiltrado de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas ocasionais. Há um aumento da expressão de moléculas de classe II do MHC no epitélio do intestino delgado e do cólon. Os animais apresentam um padrão inflamatório predominantemente Th1, com aumento na produção de IFN- $\gamma$ . Já foi constatada, nesses animais, uma resposta aumentada contra antígenos bacterianos entéricos e sua manutenção em ambientes livres de patógenos específicos (SPF) retarda e ameniza a patologia intestinal (Kuhn, et al., 1993).

O papel central de TGF- $\beta$  na regulação imunológica também já foi demonstrado em camundongos deficientes de TGF- $\beta$ 1, que desenvolvem uma variedade de lesões inflamatórias em diferentes órgãos, incluindo cólon e estômago (Yaswen, et al., 1996) (Letterio and Roberts, 1998). Nesses animais, no entanto, os fenômenos inflamatórios não se restringem à mucosa indicando que TGF- $\beta$  é uma citocina fundamental na homeostase imunológica sistêmica.

Entretanto, não somente deleção de genes de citocinas, mas a interferência em qualquer componente dessa complexa interação entre fatores imunológicos e não imunológicos, pode eventualmente desencadear uma desregulação local e sistêmica com consequentes alterações patológicas.

Animais portadores de deleção seletiva na subunidade  $\alpha$  da proteína G, também apresentam inflamação intestinal. Proteínas G são importantes na transdução de sinal, acoplando receptores específicos a várias vias efetoras dentro da célula. Essa proteína é amplamente distribuída nas células, incluindo células epiteliais e células linfóides. Nessas últimas, essa sinalização desempenha um papel na recirculação de linfócitos T e produção de certas citocinas tais como TNF- $\alpha$ . Camundongos com deleção seletiva da subunidade  $\alpha$  da proteína G apresentam colite progressiva que começa na oitava a décima segunda semana de idade. A análise histopatológica da mucosa intestinal desses animais mostra uma inflamação crônica e aguda, abscesso das criptas, fibrose, ulceração

superficial e profunda e intensa proliferação. Além disto, quando estimulados com ativadores policlonais, células do baço e do timo produziram maiores quantidades de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF (Tumor Necrosis Factor) (Rudolph, et al., 1995).

Interessantemente, deleções alvo na cadeia  $\alpha$  (TCR $\alpha^{-/-}$ ) ou  $\beta$  (TCR $\beta^{-/-}$ ) do receptor clonal dos linfócitos T também induzem inflamação localizada no intestino, mas somente no intestino grosso (Mombaerts, et al., 1993). Além das alterações inflamatórias semelhantes aos outros modelos descritos acima, esses animais apresentam aumento de linfócitos B secretando IgA, IgG e IgM no intestino grosso.

A mais convincente evidência da participação de linfócitos regulatórios na homeostase da mucosa intestinal são os experimentos de transferência de diferentes populações de linfócitos T. A transferência adotiva de pequena quantidade de uma subpopulação de linfócitos T normais CD4+ expressando altos níveis de CD45RB (CD45RB<sup>high</sup>) para recipientes SCID resulta no desenvolvimento de uma colite crônica. Entretanto, a co-transferência da subpopulação expressando baixos níveis da molécula CD45RB (CD4+, CD45RB<sup>low</sup>) ou simplesmente a transferência da população total de linfócitos T CD4+ não resulta em doença (Powrie, et al., 1993). A doença pode ser prevenida ainda pelo tratamento com anticorpos monoclonais anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$  ou pela administração de IL-10 murina. Esses experimentos indicam claramente a presença, no repertório normal do camundongo, de uma subpopulação de linfócitos T regulatórios que exerce sua ação sobre uma população potencialmente patogênica através de citocinas como IL-10 (Powrie, et al., 1994).

A mucosa é um ambiente complexo cuja fisiologia é regulada não apenas por linfócitos, mas por uma variedade de tipos celulares como células mielóides, células epiteliais, fibroblastos, células nervosas, dentre outras. A interferência na atividade de algumas dessas células pode também resultar em processos inflamatórios. Em vários modelos de inflamação da mucosa há um aumento no recrutamento e ativação de macrófagos, que pode ser de grande importância na patogênese da doença. Relatos recentes em camundongos deficientes de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of transcription 3*), uma proteína responsável pela transdução de sinal e ativação da transcrição em vários tipos celulares, têm suportado essa possibilidade. Esses animais apresentam uma incapacidade de produzir várias citocinas dependentes de STAT3, tais como IL-10. Na ausência de IL-10, a ativação de macrófagos com LPS *in vitro* resulta em excessiva atividade pró-inflamatória, caracterizada pelo aumento da secreção de IL-

12, TNF, IL-6 e IL-1. A administração de LPS *in vivo* nesses animais também resulta em inflamação na mucosa intestinal (Blumberg, et al., 1999) (Takeda, et al., 1999).

Em outro estudo recente, Malmstrom e colaboradores (Malmstrom, et al., 2001) demonstraram um importante papel da interação entre linfócitos T CD4+ ativados expressando a molécula CD134 e células dendríticas expressando o seu ligante, CD134L. No modelo de colite induzido pela transferência de linfócitos TCD4+CD45RB<sup>high</sup>, animais tratados com anticorpos monoclonais anti-CD134L no dia da transferência de células não apresentaram inflamação intestinal. O bloqueio da interação entre CD134 e seu ligante parece afetar a expressão de  $\alpha 4\beta 7$  pelos linfócitos ativados na mucosa inibindo sua expansão posterior nos linfonodos mesentéricos e seu retorno para a mucosa.

Várias características das células epiteliais do intestino as tornam relevantes na patogênese da inflamação crônica na mucosa. Além delas formarem uma barreira impedindo a passagem de microorganismos e restringindo a passagem de macromoléculas para a *lamina propria*, elas apresentam importantes interações com linfócitos intraepiteliais (IELs) e com linfócitos na LP (Pesce, et al., 1996). Alguns autores já mostraram evidências do papel das células epiteliais da mucosa intestinal (enterócitos) na apresentação de antígenos derivados do lúmen para IELs CD8+. A ação dos IELs assim ativados, no entanto, é fruto de controvérsia. Enquanto que alguns acreditam que esses linfócitos T CD8+ exerçam um efeito supressivo na mucosa, outros mostram evidências da participação dessas células em atividades inflamatórias e citotóxicas. O número de IELs está aumentado em diferentes tipos de doenças intestinais onde ocorre atrofia dos vilos, como a doença celíaca, a enteropatia autoimune, a intolerância ao leite (Shanahan, 1999). Esse aumento pode estar relacionado tanto ao processo inflamatório quanto pode representar um processo protetor de modulação desse processo. Enterócitos também podem participar no processo de atração de leucócitos para a mucosa intestinal e regular a composição de diferentes subpopulações de leucócitos na *lamina propria* intestinal. A expressão, pelos enterócitos, de ligantes de moléculas de adesão de linfócitos, como E-caderina que se liga à  $\alpha E\beta 7$  expressa nos IELs, parece ser fundamental tanto para o recrutamento de novos linfócitos T vindos do timo para o compartimento intraepitelial quanto para a integridade da própria camada epitelial (Simpson, et al., 1998). Em camundongos que expressam um gene dominante de uma molécula de adesão intercelular, N-caderina em substituição à E-caderina, a integridade das junções intercelulares (*tight junctions*) está



comprometida. Esses animais apresentam uma inflamação semelhante à colite ulcerativa, localizada nas regiões onde as células epiteliais expressando N-caderina estão presentes (Hermiston and Gordon, 1995).

A modificação estrutural de proteínas da mucosa também resulta em inflamação local. Modelos experimentais de colite têm sido desenvolvidos pela administração de um sensibilizante de contato como ácido trinitrobenzeno sulfônico (*TNBS*, *Trinitrobenzene Sulfonic acid*) diluído em etanol em camundongos, ratos e coelhos. O processo inflamatório observado apresenta características clássicas de uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (*DTH*, *Delayed-Type Hypersensitivity*). São observados linfócitos T CD4+ reativos contra antígenos *self* modificados pela ligação covalente do hapteno trinitrofenil (Elson, et al., 1995). Interessantemente, estudos em coelhos têm demonstrado que inibidores de óxido nítrico bloqueiam completamente a indução da doença indicando mais uma vez o papel dos macrófagos no fenômeno inflamatório (Miller, et al., 1993).

Com relação a processos inflamatórios no estômago, há várias formas de intervenções na mucosa gástrica que levam à indução de gastrite. Dentre elas podemos citar o uso abusivo de drogas anti-inflamatórias não esteróides, como aspirina, consumo excessivo de álcool, gastrite de origem nervosa e decorrente de infecções. É amplamente pesquisado experimentalmente a indução de gastrite em camundongos através da infecção com um patógeno humano, *Helicobacter pylori*, presente em alta porcentagem na população normal e em pacientes com gastrite crônica. A gastrite descrita na presença do *H. pylori* afeta a região do antro e corpo do estômago (Robins, et al., 1994). Essa inflamação é caracterizada por intenso infiltrado celular de linfócitos T, plasmócitos e macrófagos na LP, e neutrófilos na camada epitelial (Eck, et al., 2000). Nesse infiltrado celular, foi observado um aumento de células T CD4+ secretando IFN- $\gamma$  (Lohoff, et al., 2000), um acúmulo na mucosa de linfoblastos secretando IgA e IgM (Quiding-Jarbrink, et al., 2001) e um aumento de absorção na mucosa do estômago e do intestino (Fukuda, et al., 2001).

Alguns autores sugerem que os processos patológicos crônicos mais severos associados à infecção pelo *H. pylori* se relacionam a distúrbios de imuno-regulação na mucosa gástrica. As consequências mais drásticas surgem quando o patógeno entra em contato com uma mucosa desregulada por um evento anterior ou concomitante. Confirmando esta hipótese, há o relato de que voluntários saudáveis humanos que

ingeriram uma grande quantidade do patógeno desenvolveram apenas uma gastrite aguda, totalmente curada em poucos dias (Robins, et al., 1994).

De fato, um grupo de pesquisadores demonstrou há alguns anos atrás que a interferência em fenômenos regulatórios sistêmicos pela timectomia pode levar ao desenvolvimento de gastrite autoimune com o aparecimento de altos níveis de anticorpos circulantes anti-células parietais do estômago. Sakaguchi e colaboradores demonstraram que a deleção de células T CD4+CD25+ emigrantes do timo interfere na homeostase imunológica de vários órgãos, resultando em inflamações autoimunes em várias glândulas (tireóide, ovário) e no estômago (Sakaguchi, et al., 1985) (Sakaguchi and Sakaguchi, 1988). Esses experimentos pioneiros foram a base para o início do estudo do marcador CD25 em células T regulatórias e eles sugerem que patologias inflamatórias do trato gastro-intestinal podem envolver distúrbios da tolerância imunológica sistêmica a autocomponentes e a antígenos da dieta e da microbiota.

Na mesma linha dos trabalhos em imuno-regulação, nosso objetivo nesse estudo é mostrar que, por ser um local especialmente regulado imunologicamente, fenômenos inflamatórios patológicos da mucosa do trato gastrointestinal envolvem necessariamente perturbações nos mecanismos que mantém diariamente a tolerância oral a antígenos naturais como os antígenos da dieta. Por outro lado, do ponto de vista de uma aplicabilidade clínica, pretendemos estudar modelos onde o distúrbio nessa regulação provém de substâncias de uso comum, como o álcool.

---

**OBJETIVOS**

## OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos de perturbações da imuno-regulação no trato gastrointestinal, por processos inflamatórios iniciados na mucosa gástrica ou colônica, sobre a indução de tolerância oral.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Induzir processos inflamatórios nas porções proximal (estômago) e distal (cólon) do trato gastrointestinal. Para caracterização dos modelos, serão analisados os seguintes parâmetros:
  - a. Análise histológica dos tecidos pela coloração com HE
  - b. Análise morfológica da produção de muco pela coloração com PAS-HE
  
- 2- Analisar alterações inflamatórias e funcionais, locais e sistêmicas, iniciadas após a administração de etanol, através dos seguintes parâmetros:
  - a. Produção de IgA secretória por ELISA
  - b. Perfil de citocinas em extratos de tecidos
  - c. Produção de quimiocinas em extratos de tecidos
  - d. Atividade proteolítica da pepsina
  - e. Absorção de proteínas
  - f. Contagem de hemácias e leucócitos na circulação
  - g. Padrão de citocinas secretadas pelas células do baço e linfonodos de drenagem local estimuladas *in vitro* com ConA
  - h. Produção de anticorpos séricos totais (Ig, IgM, IgG, IgE, IgA)
  
- 3- Analisar a susceptibilidade à indução de tolerância por via oral ou sistêmica a ovalbumina nos animais com gastrite ou colite utilizando os seguintes parâmetros imunológicos:
  - a. Produção de anticorpos específicos por ELISA
  - b. Reatividade celular *in vivo* medida pela reação de DTH

- 4- Investigar o efeito da administração oral de Ova no processo inflamatório desencadeado pelo tratamento com etanol (gastrite), analisando os seguintes parâmetros:
  - a. Permeabilidade vascular no estômago e intestino após a administração de Ova por via oral
  - b. Caracterização do processo inflamatório induzido na pata após o desafio com Ova por via subcutânea
  - c. Produção de anticorpos específicos (IgG1, IgG2a, IgE)
  - d. Comportamento alimentar dos animais frente à re-exposição opcional de uma solução contendo o antígeno
  - e. Atividade de macrófagos
  
- 5- Observar os efeitos do processo inflamatório iniciado após a administração de etanol sobre a tolerância já estabelecida para uma proteína da dieta (caseína), e sobre animais geneticamente susceptíveis à indução de tolerância oral para ovalbumina, analisando:
  - a. Produção de anticorpos específicos por ELISA
  - b. Reatividade celular *in vivo* através do DTH

---

**MATERIAIS E MÉTODOS**

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1- Animais

Foram utilizados, nesse trabalho, camundongos C57BL/6 e BALB/c, com 8-10 semanas de idade, de ambos os sexos, fornecidos pelo Biotério Central (CEBIO) e mantidos pelo Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG. Animais selecionados geneticamente para susceptibilidade à indução de tolerância oral para Ova (TS-Ab/Hets) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Antônio Carlos da Silva do Depto. Biologia Celular e Genética da UERJ, Rio de Janeiro.

### 2- Modelos de inflamação gastrointestinal

#### 2.1- Gastrite

Para indução de gastrite, camundongos C57BL/6 receberam 4 administrações intragástricas de 0,2ml de etanol diluído em salina fisiológica (EtOH 50% v/v, pH=7) ou salina fisiológica NaCl 0,15 M (animais controles) durante 4 dias consecutivos, através de uma agulha de ponta arredondada acoplada a uma seringa de 1ml. Após vários experimentos de padronização, determinamos o tempo de 24 horas após a última administração como o pico do processo de inflamação aguda induzido. Nesse tempo, foram realizadas as análises das atividades imunológicas e das alterações inflamatórias resultantes do tratameto com etanol.

#### 2.2- Colite

Para a indução de colite, camundongos BALB/c receberam uma administração intrarectal com uma agulha de ponta arredondada acoplada a uma seringa de 1ml, com uma solução de 0,2 ml de etanol diluído em salina fisiológica (EtOH 50% v/v, pH7), ou somente salina fisiológica (controles). Cinco dias após, foi realizada uma nova administração intra-retal de 0,1 ml de etanol 50%. O terceiro dia depois do desafio foi determinado como pico do processo inflamatório. Nesse tempo, foram realizadas as análises das atividades imunológicas e das alterações inflamatórias resultantes do tratameto com etanol.

### 3- Análise Histológica

Alguns órgãos foram retirados para caracterização histológica do processo inflamatório. Para obtenção dos órgãos, os animais foram anestesiados em éter etílico e depois sacrificados para realização da necrópsia. Nos dois modelos, foram retirados estômago, intestino delgado (subdividido em duodeno, jejuno proximal, distal e íleo), intestino grosso e fígado. Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção foi baseado segundo FERRARIS e colaboradores (Ferraris and Diamond, 1992). O intestino delgado foi lavado com PBS 1x gelado e então dividido em quatro partes, da parte proximal para a distal em tamanhos 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 “rocambolê”, com a porção proximal no interior. Em seguida, todas as porções do intestino delgado e os outros órgãos foram fixados em metanol 80% ou 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 4µm foram obtidas usando um micrótomo Spencer.

#### 3.1- Colorações de rotina

Para a análise geral dos tecidos, os cortes em lâmina foram corados com hematoxilina-eosina (HE) ou PAS (*Periodic Acid Schiff*)-Hematoxilina para corar muco e as características morfológicas determinadas usando microscópio Olympus.

#### 3.2- Contagem de linfócitos intraepiteliais (IELs) e de células totais da *lamina propria*

O epitélio foi examinado em aumento de 40X em microscópio óptico. Os IELs foram identificados pela sua localização caracteristicamente basal em relação ao núcleo dos enterócitos e por apresentarem halo claro de citoplasma ao redor de seu denso



núcleo esférico e regular. Para cada região do intestino delgado, foram escolhidas 5 vilosidades de mesmo tamanho entre os grupos e anotados o número de linfócitos entre as células epiteliais. Foram contados somente os linfócitos que estão presentes no epitélio, excluindo-se os que atravessavam a membrana basal.

Para contagem das células da *lamina propria* (LP), foi feita uma contagem geral das células observadas em pelo menos 5 vilosidades nas 4 regiões do intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, distal e íleo), tomando-se o cuidado de escolher a mesma região em diferentes cortes de tecido. Os resultados foram expressos como número total de células contadas na LP.

#### **4- Medida da concentração de EtOH na circulação**

Para avaliação da concentração de etanol na circulação, os animais receberam EtOH 50% por gavagem e foram sacrificados 5, 15, 30, 45 e 60 minutos depois e o sangue coletado em um tubo contendo uma solução de ácido tricloroacético (TCA, 1.8 ml para 200 µl de sangue) para obtenção de sobrenadantes livres de proteínas. As amostras foram levemente agitadas no vórtex, deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos para obtenção dos sobrenadantes. A determinação da quantidade de etanol na circulação foi realizada utilizando-se um *kit* de medida disponível comercialmente (SIGMA, NAD-ADH single assay vial) que funciona baseado na detecção espectrofotométrica a 340 nm de etanol oxidado (acetaldeído) pela reação com a enzima ADH (álcool desidrogenase). Os procedimentos para a medida foram realizados conforme as especificações do fabricante.

#### **5- Atividade proteolítica no estômago**

Para avaliação dessa atividade, os animais foram mantidos em jejum 8 horas antes da necrópsia. Foi retirado o estômago 24 horas após a última administração de etanol ou salina e realizado um lavado do conteúdo estomacal com 1ml de PBS 1X pH7. Uma alíquota foi usada para leitura no espectrofotômetro (280 nm) com o objetivo de determinar a quantidade de proteína presente nas amostras. Essa medida nos permitiu normalizar a quantidade de enzima do lavado com a quantidade de proteína utilizada como substrato. As amostras (100 µl) foram, então, incubadas a 37°C com 100 µl de

Ova 0.25% preparada em tampão citrato-fosfato (200 mM, pH2.5). Após variados tempos de incubação 0, 10, 20, 40, 60 e 90 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de TCA gelado (ácido tricloroacético), cujos ânions derivados combinam-se com a proteína formando um precipitado insolúvel. Após incubação de 15 minutos no gelo, as amostras foram centrifugadas (15 minutos – 12000 rpm) e o sobrenadante coletado. A concentração dos produtos da proteólise (peptídeos solúveis em TCA) foi determinada, em espectrofotômetro (750 nm), pela reação de Folin. Os valores obtidos foram representados em um gráfico de abs x tempo e a inclinação da reta forneceu uma função de primeiro grau com a unidade abs/tempo.

## **6- Coleta de muco no trato gastrointestinal**

Foi utilizada, para a coleta de muco, a técnica descrita por Elson e colaboradores (Elson, et al., 1984), com algumas modificações. Os órgãos foram retirados, sendo que o intestino delgado foi dividido ao meio e lavado com 10 ml de PBS 1X pH 7.4 gelado (5 ml para cada metade); o estômago e intestino grosso foram lavados com 5 ml da mesma solução. Os conteúdos dos lavados foram transferido para tubos, estes foram agitados em vórtex e posteriormente centrifugados a 4°C por 30 minutos a 2000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes foi coletados e estocadoram para a medida da concentração de IgA secretória.

## **7- Preparação de extratos de tecidos**

Os órgãos (estômago e intestino delgado) foram retirados, imediatamente lavados com PBS 1X gelado, secos, pesados, picotados e colocados em tampão de extração contendo inibidores de proteases (1 ml para cada 100 mg de tecido). Em seguida, o material foi triturado em um misturador até se obter uma solução homogênea. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm 4°C durante 10 minutos e os sobrenadantes coletados e estocados a -20°C para posterior medida de citocinas e quimiocinas.

## 8- Contagem de hemácias e leucócitos no sangue

Os animais foram sangrados e o sangue coletado em EDTA. Para contagem de hemácias, 2 µl de sangue foram diluídos em 4 ml de uma solução diluidora, transferidos para câmara de Neubauer e contados em microscópio óptico nos 5 campos determinados para contagem de hemácias, usando-se objetiva de 40X. A quantidade de hemácias foi determinada através da fórmula:

$$\text{n}^{\circ}\text{total de hemácias (mm}^3\text{)} = \text{n}^{\circ}\text{ de hemácias contadas nos 5 campos} \times 5 \times 10 \times 200$$

Para a contagem de leucócitos, 10 µl de sangue foram diluídos em 90 µl de solução de Turk, homogeneizados, transferidos para câmara de Neubauer, contados em microscópio óptico nos campos 4 determinados para contagem de leucócitos, usando-se objetiva de 40X. A quantidade de hemáceas foi determinada através da fórmula:

$$\text{n}^{\circ}\text{ total de leucócitos (mm}^3\text{)} = \text{n}^{\circ}\text{ de hemáceas contadas nos 4 campos} \times 50$$

Para a contagem diferencial de leucócitos, foi preparado um esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro. Após secagem, foi realizada a coloração da lâmina com a solução May-Grunwald/Giemsa. Em seguida, as células foram identificadas e contadas utilizando-se um microscópio óptico.

## 9- Preparação de suspensões celulares

### 9.1- Cultura de células linfóides

#### Meio de cultura

Foi utilizado, como meio de cultura, RPMI 1640 enriquecido com 2 mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercapto-etanol, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de fungizona, 1 mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 25 mM de HEPES, e 5-10% de soro fetal bovino inativado.

As suspensões de células do baço e linfonodos foram preparadas de acordo com o método descrito por Taylor e colaboradores (Taylor, et al., 1987). Os órgãos foram retirados, colocados em uma rede de *nylon* em uma placa de Petri com 10 ml de RPMI e pressionados com o êmbolo de uma seringa de 5ml. Em seguida, a suspensão contendo um *pool* de células foi transferida para um tubo de 10 ml mantido em posição inclinada. Com uma pipeta Pasteur, a suspensão foi retirada deixando-se os debris no fundo do

tubo. A suspensão de células em meio foi transferida para outro tubo e centrifugada a 1100-1200 rpm por 5 minutos. No caso do baço, o sobrenadante foi desprezado e 9 ml de água bidestilada foram acrescentados para lisar as hemácias. Imediatamente depois, foi adicionado 1 ml de PBS 10X concentrado para restabelecer a osmolaridade e interromper a lise. A suspensão foi centrifugada novamente a 1100-1200 rpm por 5 minutos e as células ressuspensas e realizada a contagem das células viáveis.

#### **Contagem das células viáveis**

Para contagem das células viáveis, foi utilizado o corante eritrocina que cora células mortas. Foi preparada uma solução estoque contendo 0,8 mg/ml de eritrocina em meio RPMI completo. Para a contagem, foi misturado 50 µl da suspensão celular em volume igual da solução de eritrocina e a suspensão foi colocada uma quantidade suficiente para preencher a câmara de Neubauer. Foram contadas as células não-coradas (viáveis) e as coradas (não-viáveis) em um microscópio óptico. O número de células foi calculado pela fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ céls/ml} = (\text{n}^\circ \text{cels viáveis} \times \text{diluição} \times 10^4) / \text{n}^\circ \text{campos contados na câmara de Neubauer.}$$

#### **Coleta dos sobrenadantes de cultura**

Culturas de células (125 µl/poço –  $1 \times 10^7$  células/ml) foram plaqueadas em triplicatas em placas de 96 poços e estimuladas com concanavalina A (ConA, 125 µl/poço – 16 µg/ml) ou meio (125 µl/poço). As placas foram mantidas em cultura a 37°C em estufa umidificada com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os sobrenadantes de cultura foram coletados 24, 48 e 72 horas depois para a medida da concentração de citocinas por ELISA.

### **9.2- Cultura de células peritoneais enriquecidas de macrófagos**

#### **Meio de cultura**

Foi utilizado, como meio de cultura, DEMEM enriquecido com 2 mM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercapto-etanol, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de fungizona, 1 mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 25 mM de HEPES, e 5-10% de soro fetal bovino inativado.

Os animais receberam uma injeção de tioglicolato 3% no peritônio 3 dias antes da coleta de células da cavidade peritoneal que foi realizada como descrito a seguir. Após

exposto o peritônio, foi utilizada uma seringa para injetar 5 ml de meio DEMEN incompleto na cavidade peritoneal. O abdômen foi, então, vigorosamente agitado para facilitar a liberação das células do peritônio. Em seguida, com a mesma seringa, foi feita a coleta da solução injetada na cavidade peritoneal e esta foi transferida para um tubo cônico de 15 ml. A suspensão de células foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 1000 rpm, as células ressuspendidas em 1 ml de DEMEN completo e contadas (da mesma maneira descrita anteriormente).

#### **Coleta dos sobrenadantes de cultura de macrófagos**

Após ajustar a concentração de células ( $2 \times 10^6$  células/ml), a suspensão celular foi plaqueada (100 µl/poço) em triplicata em placas de 96 poços, mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 horas para facilitar a adesão dos macrófagos nas placas. Após esse tempo, os sobrenadantes foram retirados e as placas cuidadosamente lavadas 3 vezes com 200 µl de meio incompleto por poço. Após lavagem, as células foram estimuladas com 100 µl/poço de uma solução de meio completo contendo IFN-γ (20 unidades/poço), LPS (20 ng/poço), uma combinação de ambos (IFN-γ+LPS) ou somente meio, mantidas em cultura na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Os sobrenadantes foram coletados 72 horas depois para a medida da produção de óxido nítrico (NO) e de IL-6.

#### **10- Análise da atividade fagocítica de macrófagos pela pinça óptica**

Esse experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Oscar Nassif de Mesquita e seu grupo no laboratório de Física Estatística, do Departamento de Física-ICEX, UFMG.

Um *pool* de células peritoneais enriquecidas de macrófagos foi coletado de cada grupo (como descrito no item 9.2), 1 ou 30 dias após a última administração de etanol ou salina. Depois de ajustada a concentração ( $3 \times 10^5$ /ml), a suspensão celular obtida foi plaqueada (1ml) em uma lamínula com um suporte de resina adaptado e mantida na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 horas para facilitar a aderência dos macrófagos na lamínula. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e a lamínula cuidadosamente lavada 3 vezes com 1 ml de meio incompleto. Após lavagem, a lamínula foi analisada em um microscópio óptico adaptado a um sistema de geração de imagens. Foi adicionado, à suspensão celular, partículas de zimosan não opsonizadas (3 a 4 partículas/célula) como

estímulo fagocítico e, então, ligada a pinça óptica. Esta consiste de um feixe concentrado de laser capaz de segurar partículas. Esse feixe foi utilizado para posicionar o zimosan junto aos macrófagos aderidos. Após a adesão do zimosan na superfície dos macrófagos, foi então desligada a pinça óptica e iniciada a gravação do tempo total de fagocitose. Esse tempo foi subdividido em tempo de adesão, caracterizado pelo tempo em que o zimosan ficou ligado à superfície do macrófago até que se iniciasse o englobamento da partícula e em tempo de internalização, período que compreende desde o início das alterações na membrana do macrófago até a localização do zimosan no interior do citoplasma. A presença do zimosan no interior da célula foi confirmada pela técnica de desfocalização da imagem desenvolvida no laboratório.

### **11- Medida da produção de óxido nítrico (NO)**

A produção de óxido nítrico (NO, nitric oxide) nos sobrenadantes de cultura foi medida indiretamente pela produção de nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ) pela reação de Griess. Resumidamente, alíquotas de 50  $\mu\text{l}$  das amostras foram incubadas com 50  $\mu\text{l}$  de 1% de dihidroclorato de N-naftil-etileno-diamina em 2,5% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  à temperatura ambiente por 5 minutos. Com a ajuda de uma curva padrão (100  $\mu\text{M}$  - 1  $\mu\text{M}$ ), a concentração desse produto foi calculada após a leitura da absorvância em leitor de ELISA a 540 nm.

### **12- Medida da produção de citocinas por ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*)**

As placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal contra IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (100  $\mu\text{l}$ /poço de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Pharmingen, Becton Dickinson, Mountain View, California), diluído em tampão de cobertura e mantidas por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, foi feito o bloqueio com 200  $\mu\text{l}$ /poço de uma solução de PBS contendo 0.25% de caseína à temperatura ambiente durante 1 hora. Após esse tempo, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes coletados após 24 horas de cultura para a medida de IL-2, e após 72 horas de cultura para a medida de IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. Esses sobrenadantes foram incubados durante toda a noite a 4°C. No dia seguinte, foram colocados 100  $\mu\text{l}$ /poço dos anticorpos monoclonais de detecção específicos para IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 de camundongos (Pharmingen, Becton Dickinson, Mountain

View, California) marcados com biotina e as placas incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:10000 (100µl/poço) foi adicionada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A revelação foi feita colocando-se o substrato da peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) juntamente com um cromógeno (OPD) diluídos em tampão citrato (100µl/poço). Após a interrupção da reação pela adição de 20µl/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N), as placas foram lidas em Leitor automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm. Foram utilizadas curvas padrão obtidas a partir da diluição de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes. As concentrações utilizadas para cada citocina foram: IL-2 (10ng/ml - 0,078ng/ml), IFN-γ (40ng/ml - 0,31 ng/ml), IL-4 (500 pg/ml - 2pg/ml), IL-10 (10ng/ml - 0,078 ng/ml). Os resultados, com exceção de IL-6, foram expressos em concentração.

### **13- Medida da produção de quimiocinas - MIP-2 e MCP-1**

Resumidamente, placas foram sensibilizadas com 100 µl/poço de anticorpos policlonais anti-MCP-1 e anti-MIP-2 de camundongo (2 µg/ml), incubadas por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, elas foram lavadas e então bloqueadas com uma solução de PBS contendo 1% de BSA (*Bovine serum albumin*). Em seguida, as placas foram incubadas com as amostras de extrato de tecido por 1 hora a 4°C. Anticorpos policlonais biotinizados anti-MCP-1 ou anti-MIP-2 foram usados na diluição de 1:2000 para detecção. Uma solução adicional de detecção contendo estreptoavidina conjugada à peroxidase (100 µl/poço) foi adicionada e as placas incubadas por 1 hora a 4°C. Para cada quimiocina, foi obtida uma curva padrão com MCP-1 ou MIP-2 recombinantes de camundongos sendo a sensibilidade do ensaio de 16 pg/ml.

### **14- Medida de imunoglobulinas séricas e IgA secretória por ELISA**

As placas foram incubadas com anticorpos policlonais de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongo (100 µl/poço de 1 µg/ml; Southern Biotechnology, Birmingham, AL) . O soro ou o muco foram adicionados (100µl/poço) em diluições seriadas (fator 0.5) a partir de 1:40000 para Imunoglobulinas totais (Ig) e IgG, 1:2000 para IgM e IgA sérica, 1:20 para IgA do lavado intestinal, e total (sem

diluição) para IgA do lavado estomacal e do intestino grosso. As imunoglobulinas ligadas foram reveladas com 0.5 µg/ml de anticorpos policlonais de cabra polivalente ou específicos para as cadeias  $\alpha$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$  de camundongos (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) marcados com biotina. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:10000 (100µl/poço) foi adicionada e as placas incubadas por 1 hora a 37°C. Foi obtida uma curva padrão com concentrações de 0.05 µg/ml- 300pg/ml para Ig, IgG e IgM e de 1 µg/ml – 0.007 µg/ml (7 ng/ml) para IgA.

### **15- Medida de IgE total por ELISA**

Essa medida foi realizada como descrito no item 14, com algumas modificações. Placas foram sensibilizadas com 100 µl/poço de anticorpos de rato anti-IgE de camundongo diluídos a 1:500 (*Rat anti-mouse IgE*, Southern Biotechnology Ass, Inc.). No dia seguinte, após 3 lavagens (salina-Tween) e bloqueio com 200 µl/poço de solução de PBS-caseína (por 1 hora à temperatura ambiente, TA), foram adicionadas as amostras de soros de camundongos (100 µl/poço) diluídos a 1:4 em PBS-caseína. Após incubação (1 hora, TA), as placas foram lavadas com salina-Tween por 6 vezes. Foi adicionada uma solução contendo anticorpos de rato anti-IgE de camundongos conjugados à biotina e diluídos a 1:15000 (*Rat anti-mouse IgE BIOT*, Southern Biotechnology Ass, Inc.) – 100 µl/poço – e as placas foram incubadas por 1 hora, TA. Uma solução adicional de detecção contendo estreptoavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology Ass, Inc.) na diluição de 1:10000 (100 µl/poço) foi adicionada e as placas incubadas por 1 hora TA. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação como já descrito.

### **16- Tolerância e imunização parenteral**

#### **Tratamento oral para indução de tolerância oral à ovalbumina**

O tratamento oral foi realizado através de gavagem ou, em um experimento específico, de ingestão voluntária. Camundongos controle e com gastrite receberam, 24 horas após a última administração de salina ou etanol, respectivamente, uma única dose



de 20mg de Ova (3 vezes cristalizada, Sigma, St. Louis, Missouri), em 0.2 ml de salina (Ova ig) ou somente salina (salina ig) por gavagem. Ingestão voluntária refere-se à administração do antígeno na água dos animais. A dose total diária de antígeno nesse protocolo é baseada na média do consumo por animal (5 ml/dia). Mamadeiras contendo a solução de Ova (5mg/ml) foram oferecidas durante 4 dias como única fonte líquida e trocadas todo dia para evitar contaminação. No modelo de colite experimental, a Ova foi administrada por gavagem 3 dias após a segunda administração intra-retal de etanol.

Em um outro experimento no modelo de gastrite experimental, o tratamento tolerogênico (através de gavagem de uma solução contendo 20 mg de Ova) foi realizado 30 dias após a última administração de etanol ou salina.

### **Tolerância endovenosa à ovalbumina**

Os animais receberam uma injeção de 1µg de Ova em 50 µl de salina no plexo venoso ocular 24 horas após a última administração de salina ou etanol.

Sete dias após os tratamentos tolerogênicos, todos os animais foram submetidos às imunizações parenterais, como descrito a seguir.

### **Imunizações parenterais**

#### **Para análise da resposta humoral**

Para medir a produção de anticorpos específicos, a imunização primária foi feita por via intraperitoneal com 10 µg de Ova + 3mg de Al(OH)<sub>3</sub> como adjuvante, diluídos em 0,2 ml de solução salina. Em um experimento isolado no modelo de gastrite, os animais receberam essa imunização primária 24 horas após a última administração de etanol ou salina.

A imunização secundária foi realizada 14 dias após a imunização primária por via intraperitoneal com 10 µg de antígeno solúvel diluído em 0,2 ml de salina.

### **Reforço**

Nos experimentos realizados para verificar se os animais com gastrite foram sensibilizados por via oral, uma solução contendo 10 µg de Ova diluído em 0,2 ml de salina foi administrado intraperitonealmente 14 dias após o tratamento oral com Ova.

## **Obtenção dos soros**

Os animais foram sangrados na veia axilar 7 dias após a última imunização. Os soros foram obtidos após coagulação por centrifugação a 2500 rpm e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise dos títulos de Ig totais ou de diferentes isotipos de imunoglobulinas (IgG1, IgG2a, IgE) anti-Ova.

## **Para análise da reatividade celular *in vivo* – DTH**

Camundongos C57BL/6 ou TS-Ova/Hets foram imunizados na base da cauda com 40  $\mu\text{l}$  de uma solução contendo 100  $\mu\text{g}$  de Ova em adjuvante completo de Freund (CFA). Trinta dias após, os animais receberam, no coxim plantar esquerdo, uma injeção de 30  $\mu\text{l}$  de uma solução de Ova a 2% (600  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) desnaturada termicamente e, no coxim direito, 30  $\mu\text{l}$  de salina. O inchaço das patas direita e esquerda foi medido 24, 48 e 72 horas após a injeção. Em um experimento específico (cinética), a medida do inchaço foi realizada até 9 dias após o desafio. A diferença entre o inchaço da pata que foi injetada com Ova e a contralateral, injetada com salina, forneceu o valor real do aumento da pata de cada animal (em polegadas). No último, dia os animais foram sacrificados e as patas retiradas para análise histológica.

## **17- Medida da tolerância estabelecida para uma proteína da dieta – caseína**

Camundongos C57BL/6 de 3-4 semanas de idade foram alimentados com uma dieta contendo 15% de caseína (Rhoster Indústria e Comércio LTDA, SP) como fonte protéica, oferecida *ad libitum* em forma sólida, desde o desmame até o final dos experimentos (aproximadamente por 2 meses). Animais controle foram alimentados com uma dieta padrão usada na alimentação de camundongos (ração comercial) onde a caseína está ausente. Na idade de 8 semanas, os animais alimentados com caseína (cas) ou ração (rac) foram submetidos ao protocolo de indução de gastrite como descrito no ítem 2.1. Uma semana depois, os animais receberam o desafio sistêmico com 100  $\mu\text{g}$  caseína + 3 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e quatorze dias depois uma nova imunização com 100  $\mu\text{g}$  de caseína. Uma semana depois, os animais foram sangrados e o soro coletado para análise da produção de anticorpos específicos por ELISA.

### **18- Medida da absorção de proteínas**

Os animais receberam, 24 horas após a última administração de etanol ou salina, 0,5 ml de uma solução contendo 80 mg de Ova (160 mg/ml) administrada por gavagem. Setenta e cinco minutos depois, os animais foram ligeiramente anestesiados com éter e o sangue retirado para determinação da concentração de Ova no soro por ELISA.

### **19- Avaliação da permeabilidade vascular**

A alteração na permeabilidade vascular após a re-exposição ao antígeno em animais previamente sensibilizados foi avaliada pelo método de extravasamento de albumina corada pelo azul de Evans (Jancar, et al., 1991) com algumas modificações. Os animais receberam uma gavagem com 20 mg de Ova em 0,2 ml de salina 24 horas após a última administração de salina (controle/Ova ig) ou etanol (gastrite/Ova ig). Duas semanas depois, os animais receberam uma nova gavagem com 80 mg de Ova e, uma hora depois, uma injeção, no plexo venoso ocular, com azul de Evans (50mg/kg). Camundongos normais receberam azul de Evans por via endovenosa para um controle do nível basal de extravasamento. Após 20 minutos, os animais foram sacrificados e retirados o estômago e duodeno para análise do extravasamento do azul de Evans. Os órgãos foram pesados para cálculo da quantidade de formamida usada para extração do corante (4 ml/g de peso úmido à temperatura ambiente por 24 horas). A densidade óptica das amostras foi determinada pelo leitor de ELISA (Automated Microplate Reader EL-800 Bio-Tek instruments, Inc) utilizando-se filtro de 630 nm. A quantidade do corante/g de tecido úmido foi calculada pela comparação das densidades ópticas de cada amostra com as obtidas pela curva padrão de diluições seriadas do corante (20 – 0.15 µg/ml).

### **20-Teste de aversão**

Os animais receberam, 24 horas após a última administração de etanol (EtOH) ou salina (SAL), uma gavagem com 20 mg de Ova (EtOH/Ova ig e SAL/Ova ig) ou salina (EtOH/ sal ig e SAL/sal ig) e foram expostos, 14 dias depois desse tratamento, a duas mamadeiras: uma contendo água de torneira e outra contendo uma solução de clara de ovo diluída a 1:5 em água de torneira e adoçada com 0,1% de sacarina. Os animais receberam essa solução durante 10 dias, sendo as mamadeiras pesadas e trocadas diariamente para evitar contaminação. A posição das mamadeiras foi alternada a cada dia para se controlar a preferência por posições. A quantidade de líquido ingerida por cada grupo foi determinada a cada 24 horas de exposição através da diferença entre o peso inicial e final das mamadeiras expressa como mg de solução ingerida.

No 10º dia, os animais foram sacrificados, o soro coletado e estocado para posterior análise do nível de anticorpos específicos e o lavado intestinal foi obtido como descrito no item 6 para posterior medida de IgA secretória anti-Ova por ELISA.

### **21- Medida de anticorpos séricos anti-Ova e anti-caseína por ELISA**

Placas de poliestireno (Nunc) foram sensibilizadas com a solução do antígeno Ova ou caseína (2µg/poço) em tampão carbonato pH=9,6 (100µl/poço) por, no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina-Tween por duas vezes. O bloqueio foi feito com PBS-caseína por uma hora à temperatura ambiente (200 µl/poço). Em seguida, as placas foram lavadas com salina-Tween por duas vezes e incubadas com o soro dos camundongos em diluição seriada (1:100 a 1:12800) em PBS-caseína durante uma hora a 37°C. Após essa incubação, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Em seguida, foi adicionada uma solução contendo anticorpos conjugados à peroxidase anti-Igs totais de camundongo (Southern Biotechnology Ass, Inc.) -100 µl/poço - às placas e estas incubadas durante uma hora a 37°C. Após esse tempo, as placas foram novamente lavadas com salina-Tween por seis vezes e o complexo antígeno-anticorpo-conjugado foi revelado através da incubação com o substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato (100 µl / poço) durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico (20µl por poço), e as placas lidas no leitor de *ELISA* automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando-se o filtro de 492 nm. Todas as placas tiveram, como controle positivo, um

### **22- Medidas de IgG1 e IgG2a anti-Ova por ELISA**

Esse protocolo foi realizado como o descrito no ítem 22 com algumas modificações. Resumidamente, placas foram incubadas com 100 µl/poço de uma solução de Ova (2 µg/poço) diluída em tampão de cobertura e incubadas por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, após 3 lavagens, foi feito o bloqueio com 200 µl/poço de PBS-cas durante 1 hora à temperatura ambiente. Após essa etapa, foi colocado o soro diluído a 1:10, realizadas 8 diluições seriadas e as placas ficaram incubando a 37°C durante 1 hora. Após lavagem, foram colocados (100 µl/poço) os anticorpos anti-isotipos não marcados (*Goat-anti mouse IgG1* e *Goat-anti mouse IgG2a –UNLB*, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na diluição de 1:20000. As placas ficaram incubando durante 1 hora a 37°C e, após lavadas, foi adicionado (100 µl/poço) uma solução contendo anticorpo anti-isotipo de Ig marcado com peroxidase (Rabbit anti-goat IgG-HRP,) na diluição de 1:10000. Após incubação durante 1 hora a 37°C, foi usado o sistema de revelação com OPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> já descrito anteriormente.

### **23- Medida de IgE anti-Ova por ELISA**

Placas foram incubadas por toda a noite a 4°C, com 50 µl/poço de uma solução contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongo (*rat anti-mouse IgE-UNLB*, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na diluição 1:250. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com salina-Tween e, em seguida, realizado o bloqueio com 100 µl/poço de PBS-caseína. Foram adicionados, em seguida, 50 µl de amostras de soro total que ficaram incubando por 2 horas a temperatura ambiente (TA). Em seguida, após 5 lavagens com salina-Tween, foi adicionada uma solução de Ova biotinizada (50 µl/poço) diluída em PBS-caseína (1:200) e as placas foram incubadas durante 1 hora TA. Após esse tempo, uma solução adicional de detecção contendo estreptoavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL.) na diluição de 1:4000 (50 µl/poço) foi adicionada e as placas incubadas por 45 minutos à TA. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação.

### **24- Medida de IgA secretória anti-Ova por ELISA**

Placas foram incubadas por toda a noite a 4°C com 100 µl/poço de uma solução contendo Ova (4 µg/poço) diluída em tampão de cobertura. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina-Tween (3 vezes) e, após bloqueio com 200 µl/poço de PBS-cas, foram adicionadas as amostras de muco total (100µl/poço) seguidas de diluições seriadas (fator 0.5) e as placas ficaram incubando por 1 hora, TA. Em seguida, foi adicionada uma solução contendo anticorpos anti-IgA de camundongo conjugados a biotina (100 µl/poço - *Goat anti-mouse IgA- Biotin Conjugate*, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na diluição de 1:20000. As placas ficaram incubando por 1 hora a 37°C. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:10000 (100µl/poço) foi adicionada e as placas incubadas por 1 hora a 37°C. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação.

## **25-Medida da concentração de Ova na circulação por ELISA**

Placas de poliestireno (Nunc) foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Ova (*anti-chicken egg albumin* -clone Ova-14, Sigma Chemical CO, St Louis, MO) diluído em tampão carbonato pH=9,6 (100µl/poço) por, no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina-Tween por duas vezes. O bloqueio foi feito com PBS-caseína por uma hora à temperatura ambiente (200 µl/poço). Em seguida, as placas foram novamente lavadas com salina-Tween por duas vezes e incubadas com o soro dos camundongos diluídos em PBS-caseína (diluição 1:2) e ficaram reagindo por toda a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foi então adicionado uma solução de anticorpos policlonais anti-Ova diluídos em PBS-caseína a 1:20000 (*Rabbit anti-chicken egg albumin*, Sigma Chemical CO, St Louis, MO), 100 µl/poço e as placas incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, após 6 lavagens com salina-Tween, foi adicionada solução de PBS-cas contendo anticorpos de cabra anti-Ig de coelho marcados com biotina (*anti-IgG rabbit biotin conjugate*, Sigma Chemical CO, St Louis, MO) e diluídos a 1:20000. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:10000

(100µl/poço) foi adicionada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A revelação foi feita colocando-se o substrato da peroxidase ( $H_2O_2$ ) juntamente com um cromógeno (OPD) diluídos em tampão citrato (100µl/poço). Após bloqueio da reação com 20µl/poço de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  2N), as placas foram lidas em Leitor automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando-se o filtro de 492 nm. Em todas as placas, foram utilizados um controle negativo (soro normal) e uma curva de uma solução de Ova diluída em soro normal na concentração de 0.1 mg/ml, sendo a amplitude de leitura de 12.5 µg/ml- 97ng/ml.

## 26-Análise Estatística

A análise foi feita através do teste t de *Student* bi-caudal para computar a diferença significativa entre os grupos.

## 27-Soluções usadas

### ELISA

Tampão Carbonato – pH= 9,6

$Na_2CO_3$  – 0,015 M

$NaHCO_3$  – 0,035 M

Tampão Fosfato (PBS) – pH= 7,2

$NaCl$  – 0,0015 M

$KCl$  – 0,0081 M

$Na_2HPO_4$  – 0,1369 M

$KH_2PO_4$  – 0,0027 M

PBS – caseína

Tampão fosfato – pH= 7,2

Caseína – 0,25%

Salina fisiológica

$NaCl$  – 0,15 M

Salina-Tween

Salina fisiológica – 0,15 M

Tween 20 – 0,05%  
 Tampão citrato – pH= 5,0  
      $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 0,2 M  
     Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) – 0,1 M  
 Solução de ácido sulfúrico  
      $\text{H}_2\text{SO}_4$  – 2,0 N  
 Solução do substrato para o *ELISA* – por placa  
     OPD – 4 mg  
      $\text{H}_2\text{O}_2$  – 2  $\mu\text{l}$   
     Tampão citrato pH= 5,0 – 10 ml

#### **Tampão usado no extrato de tecido**

Na Cl – 2,34 g  
 Tween 20 – 50  $\mu\text{l}$   
 BSA – 500 mg  
 PMSF (*Phenil Methil Sulfonil Fluoride*)– 1,7 mg  
 BC (*Benzetone Cloride*) – 4, 48 mg  
 EDTA – 37,2 mg  
 Aprotinina – 4700 UIC/ml  
 Água mili-Q – 100 ml

#### **Soluções usadas no ensaio de atividade proteolítica**

Tampão citrato–fosfato 200 mM - pH= 2.5  
 TCA (ácido tricloroacético) – 50%

#### **Soluções usadas para determinação de hemácias e leucócitos**

##### Solução diluidora de hemácias

Citrato de sódio – 3,8 g  
 Formol 40 % - 2 ml  
 Água deionizada – 100 ml

##### Solução de Turk

Ácido acético glacial – 15 ml  
 Violeta de genciana 2% - 0,2 ml  
 Água deionizada – 500 ml



Solução May-Grunwald

May-Grunwald – 0,15 g

Álcool metílico – 240 ml

Acetona – 290 ml

**Solução de Giemsa**

Giemsa – 0,3 g

Glicerina – 25 ml

Álcool metílico – 25 ml

**• Fixadores de tecido**Formol tamponado 10%

Fosfato de sódio monobásico – 4,25 g

Fosfato de sódio bibásico – 6,5 g

Formol – 100 ml

Água destilada – 900 ml

Metanol 80%

Metanol – 80 ml

DMSO – 20 ml

---

**RESULTADOS**

**I- Caracterização da gastrite e das alterações resultantes do processo  
inflamatório após o tratamento com etanol**

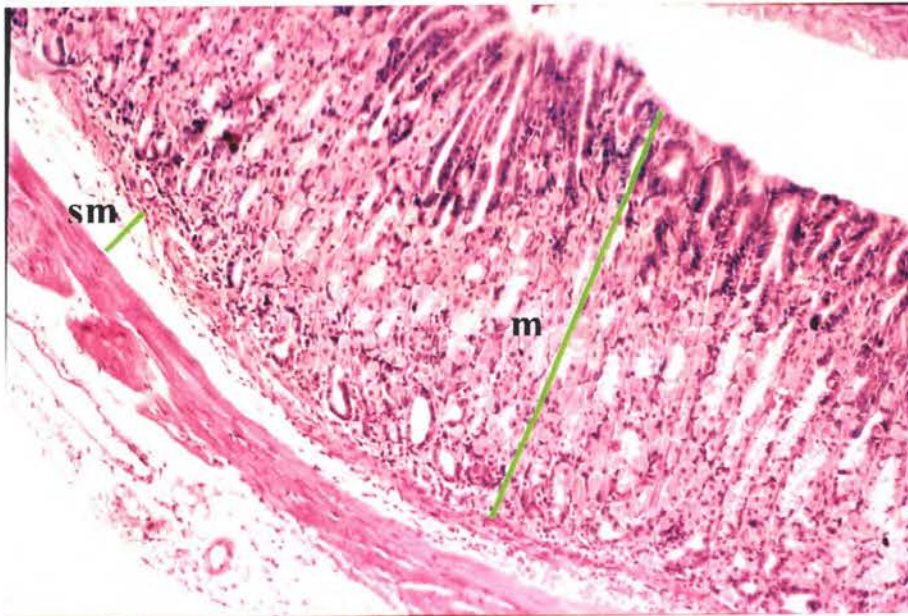
*I-1. O tratamento agudo com etanol resultou em alterações morfológicas no estômago.*

Para induzir gastrite, animais C57BL/6 receberam administrações intragástricas de etanol (EtOH 50% v/v) ou somente salina (animais controle) por 4 dias consecutivos e foram sacrificados 24 horas após a última administração.

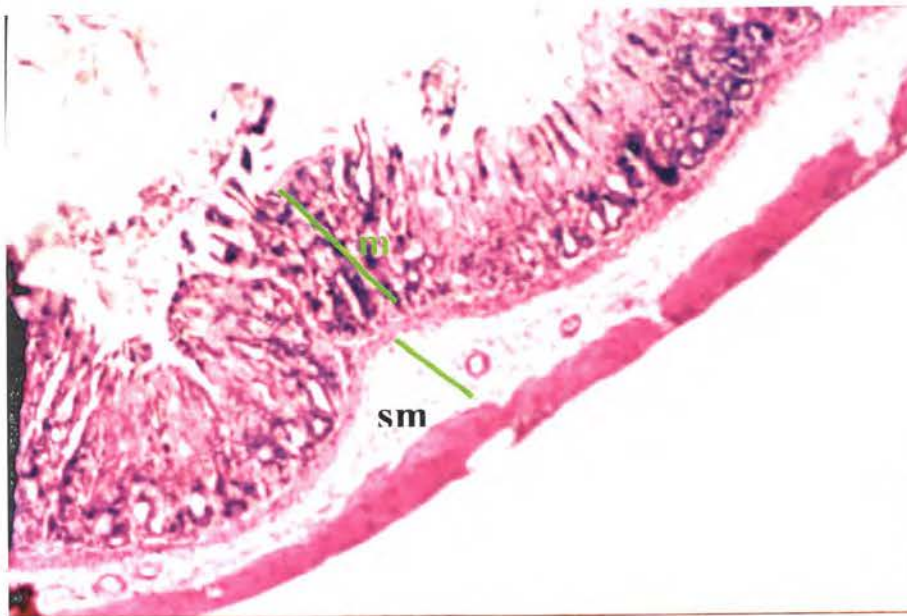
Macroscopicamente, observamos várias alterações que incluem lesões e intensa hiperemia na região do corpo do estômago. O quadro de gastrite aguda foi caracterizado pelas alterações morfológicas demonstradas pela análise microscópica. Quando comparados com animais tratados com salina (Figura 1A), animais tratados com etanol (Figura 1B) apresentam várias alterações inflamatórias nas regiões mucosa (m) e submucosa (sm) do corpo do estômago. Observamos focos hemorrágicos na *lamina propria* e pontos erosivos na superfície epitelial. Além disso, também foram identificados atrofia de mucosa, edema na submucosa e intenso infiltrado celular misto constituído por células mono e polimorfonucleares nos animais tratados com etanol.

É importante ressaltar que as consequências inflamatórias do tratamento com álcool foram restritas ao estômago uma vez que não houve alteração histológica em qualquer porção do intestino delgado (Figura 2A) nem no intestino grosso (Figura 2B). Podemos observar que a integridade da superfície epitelial e tecidos adjacentes está mantida e nenhuma diferença no número de células totais da *lamina propria* e dos linfócitos intra-epiteliais (IELs) foi observada por toda mucosa do intestino delgado entre animais controles e tratados com álcool (Figura 3). Também não observamos nenhuma alteração no fígado desses animais (dados não mostrados).

A

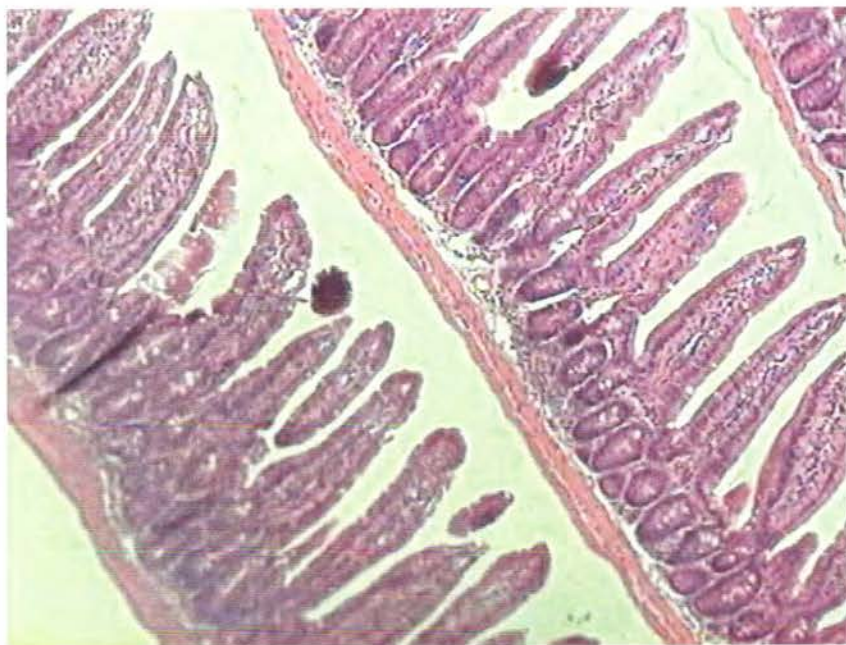


B

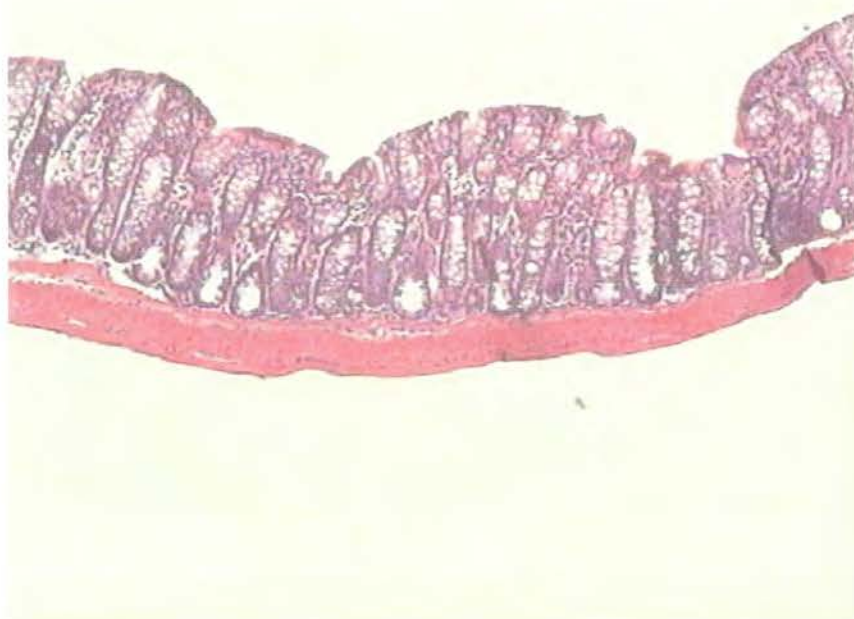
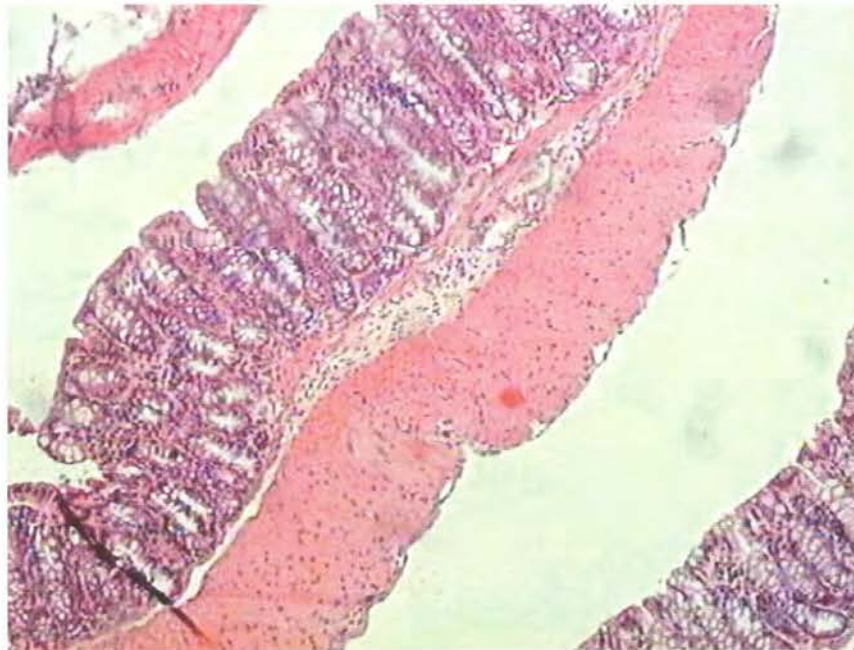


**Figura 1-** Análise histológica do estômago de camundongos C57BL/6. Visualização (100x) da mucosa gástrica na região do corpo, 24 horas após o último tratamento com salina (A) ou etanol (B). As linhas mostram o tamanho da mucosa (m) e submucosa (sm) em cada foto.

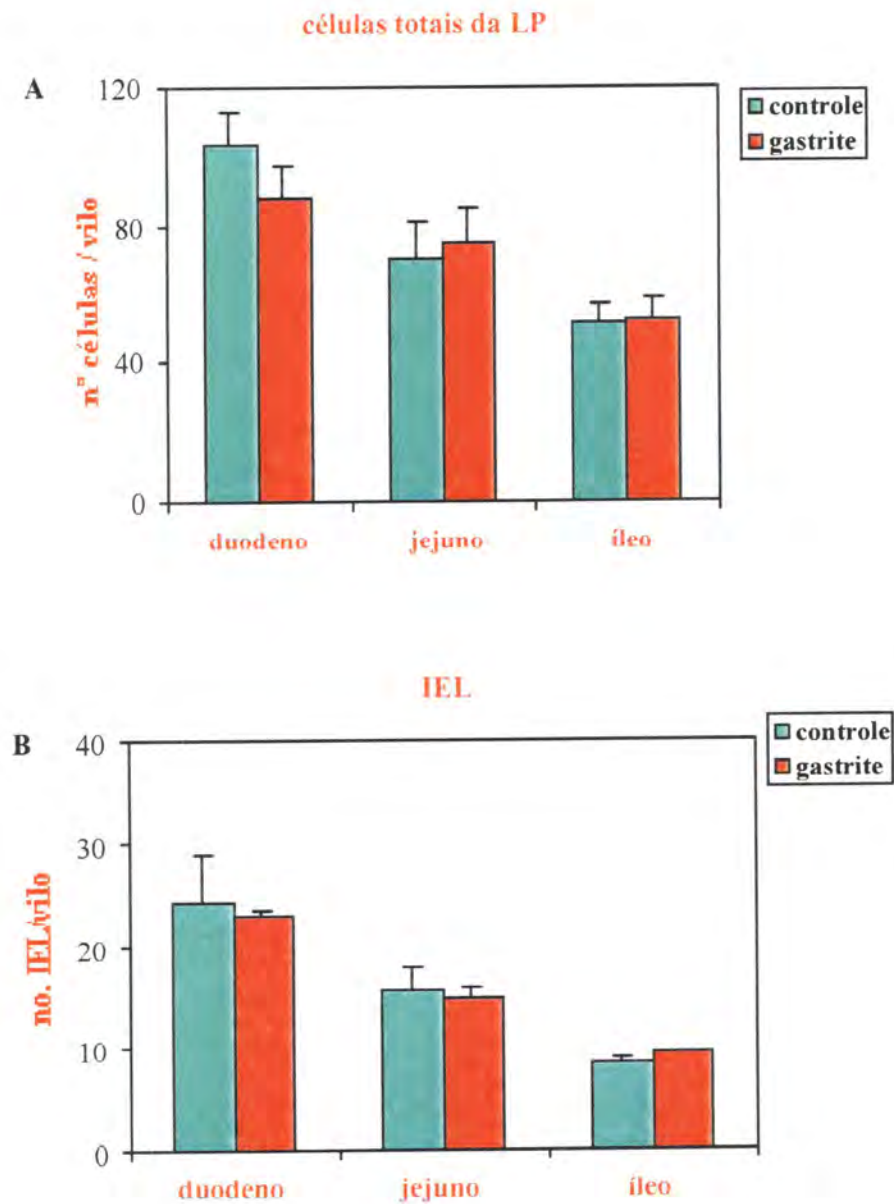
A



B



**Figura 2-** Análise histológica dos intestinos delgado e grosso. Visualização (100x) da morfologia do intestino delgado (A) e intestino grosso (B) de animais controle (**fotos de cima**) e com gastrite (**fotos de baixo**), retirados 24 horas após a última administração de salina ou etanol.



**Figure 3-** Quantificação de células da *lamina propria* e dos linfócitos intraepiteliais. Seções do intestino delgado divididas em duodeno, jejuno e íleo foram obtidas 24 horas após a última administração de salina ou etanol em animais controles e com gastrite, respectivamente. **A-** contagem de todas as células presentes na *lamina propria* dos vilos. **B-** Contagem de linfócitos intraepiteliais por vilosidade. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão (EP) da contagem das células dividida pelo número de vilos contados em cada grupo de 5 camundongos.

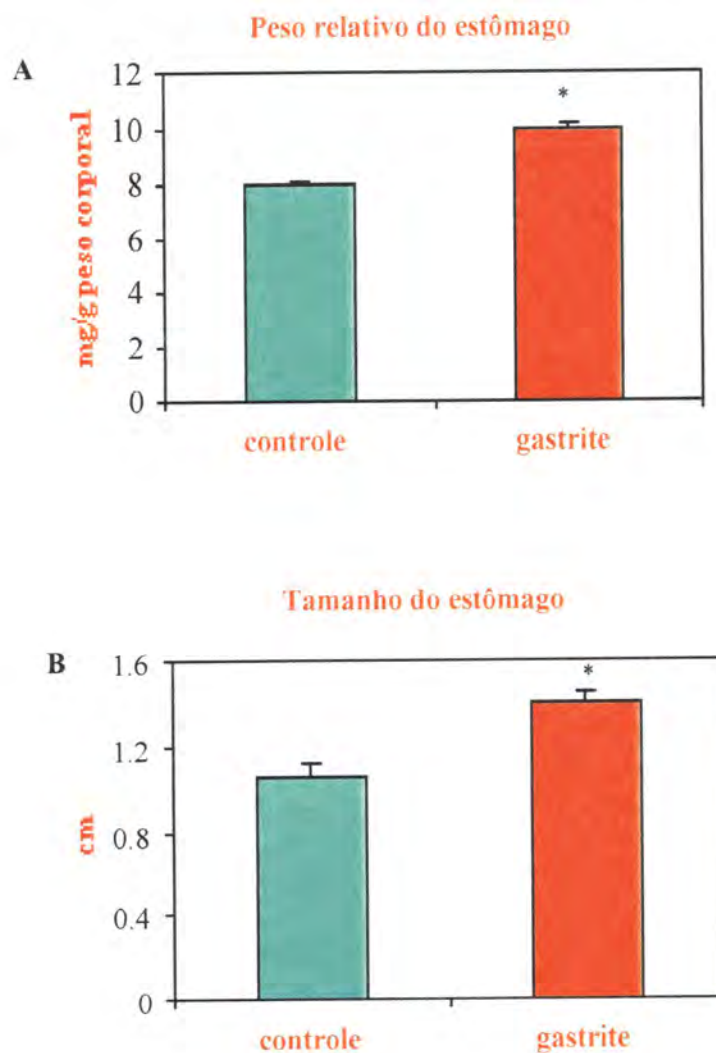


Sendo o álcool uma substância com um amplo espectro de ações, nosso próximo passo foi analisar o impacto da administração de etanol e do processo inflamatório iniciado por ele na homeostase do organismo. Todas as análises foram feitas 24 horas após a administração de etanol, determinado como o tempo ótimo de inflamação com base na análise histológica.

## *I-2. Alterações gastrointestinais funcionais induzidas pelo processo inflamatório.*

### *I-2.1. Animais com gastrite apresentam gastromegalia.*

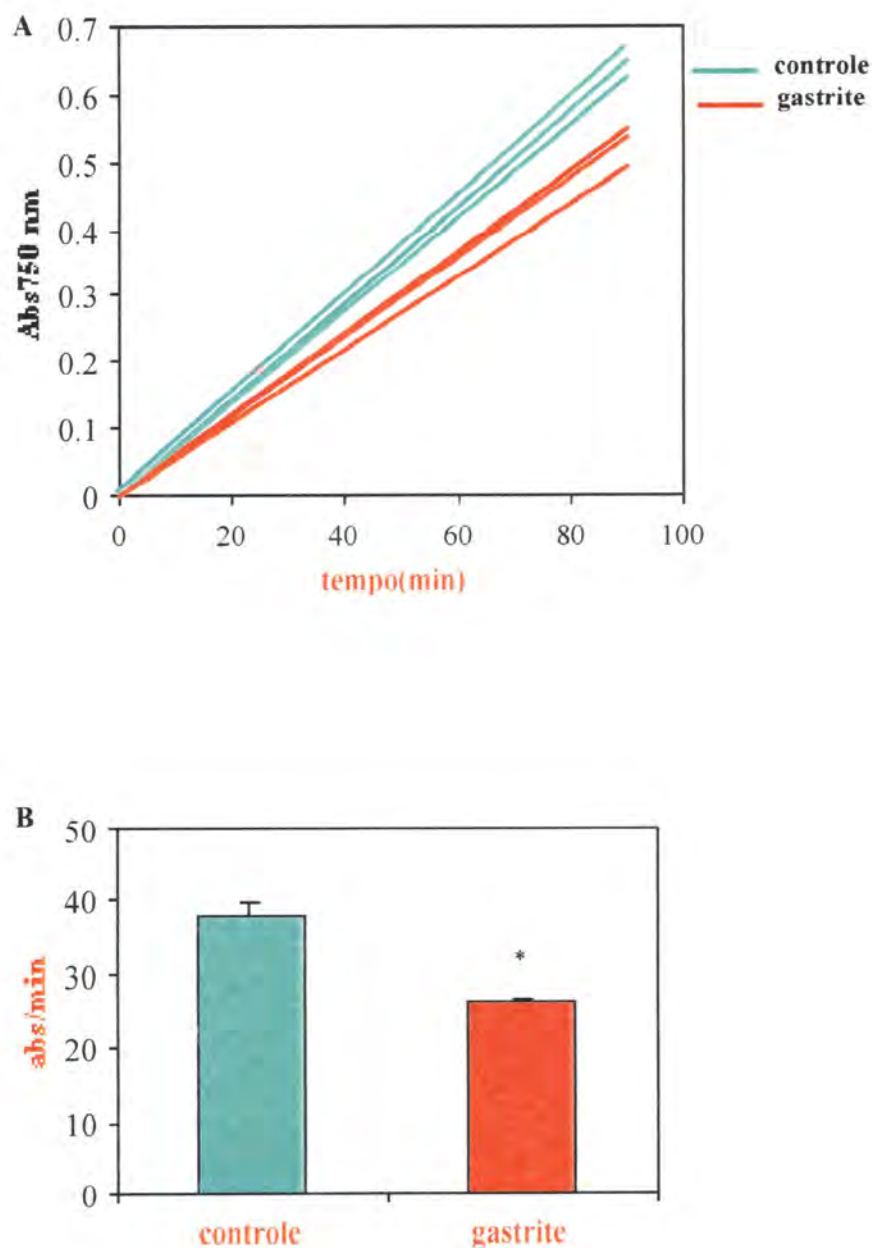
O estômago é um importante órgão do sistema digestivo e alterações patológicas podem interferir na função do trato gastrointestinal. De fato, os animais com gastrite apresentaram gastromegalia por dilatação do órgão aparentemente devido à presença de gases. Essa gastromegalia pode ser comprovada na figura 4 pelo aumento do peso e do tamanho do estômago de animais com gastrite comparado com animais controles.



**Figura 4-** Peso e tamanho do estômago. O estômago de camundongos controle e com gastrite foi retirado, 24 horas após a última administração de salina ou etanol, e lavado com PBS1x. Depois de seco o estômago foi pesado (**A**) e o resultado expressa a média do peso relativo (peso do órgão/peso animal) encontrado em cada grupo de 5 camundongos. Em **B** está expresso o tamanho do estômago (cm) medido desde a junção gastroesofágica até a gastroduodenal. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

*1-2.2. Há uma alteração na velocidade de degradação proteolítica no estômago de animais com gastrite.*

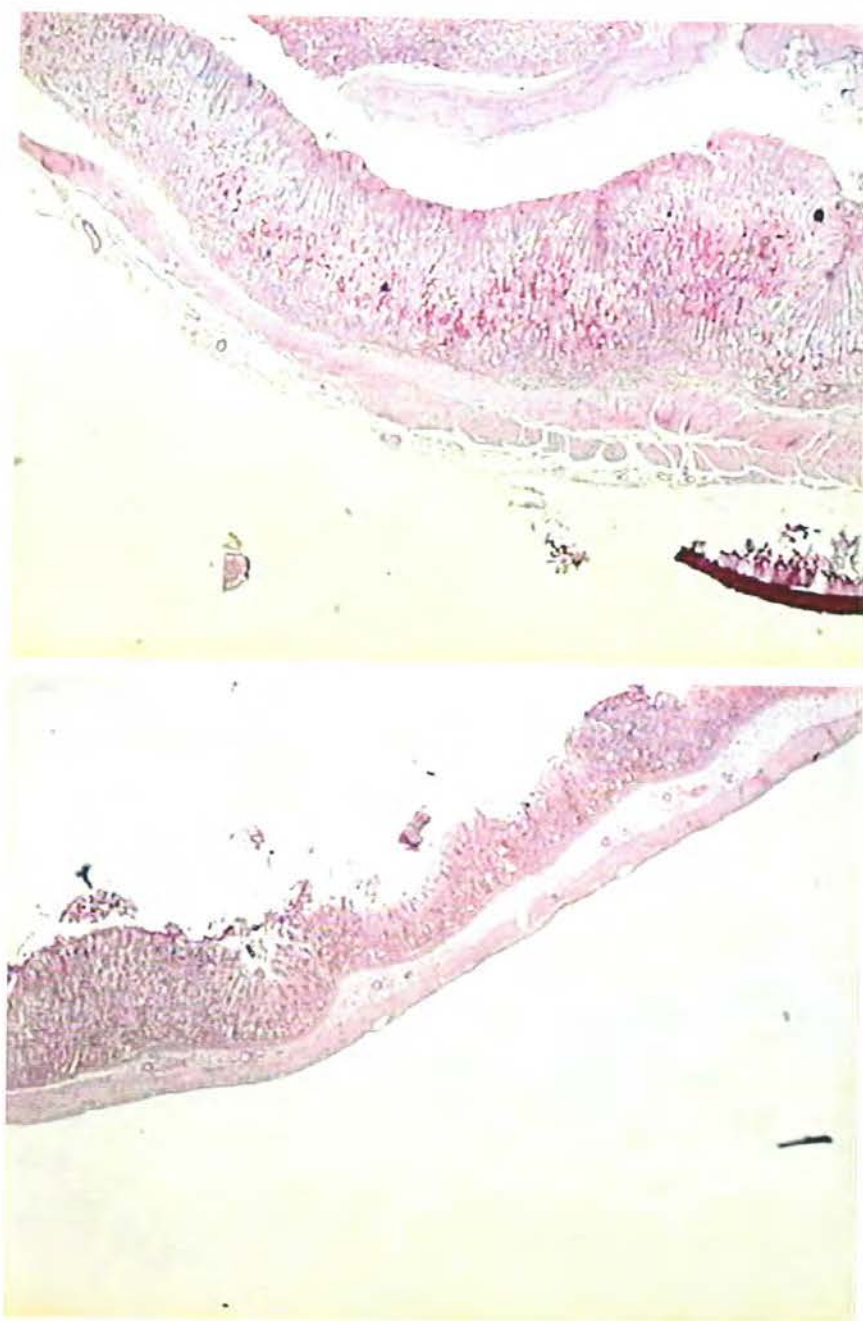
Processos bioquímicos no estômago como degradação enzimática de proteínas alimentares são extremamente importantes na função gastrointestinal. Verificamos a atividade proteolítica da pepsina, uma importante protease do estômago. Como camundongos são animais que comem durante todo o dia, mantivemos os animais 8 horas em jejum antes da realização dessa análise. Após o período de jejum, os estômagos dos animais foram retirados e os conteúdos estomacais obtidos através da lavagem com PBS 1x gelado (pH7). A concentração de proteína nos lavados foi ajustada e as amostras incubadas com ovalbumina 0.25% (Ova, diluída em tampão citrato-fosfato 200mM, pH2.5), proteína utilizada como substrato para analisarmos a atividade proteolítica do lavado estomacal. Após diferentes tempos de incubação, adicionamos TCA (ácido tricloroacético) para precipitar a proteína não degradada, e os peptídeos gerados pela proteólise foram determinados por uma reação colorimétrica (Folin) e lido no espectrofotômetro a 750 nm. Os valores obtidos foram plotados em um gráfico de abs x tempo (Figura 5A), e os valores da função de primeiro grau obtida através da inclinação da reta, expressos na figura 5B. Pela inclinação da reta (Figura 5A) observamos que a velocidade da reação enzimática foi menor nos animais com gastrite comparado com animais controle. Essa diferença foi confirmada na figura 5B.



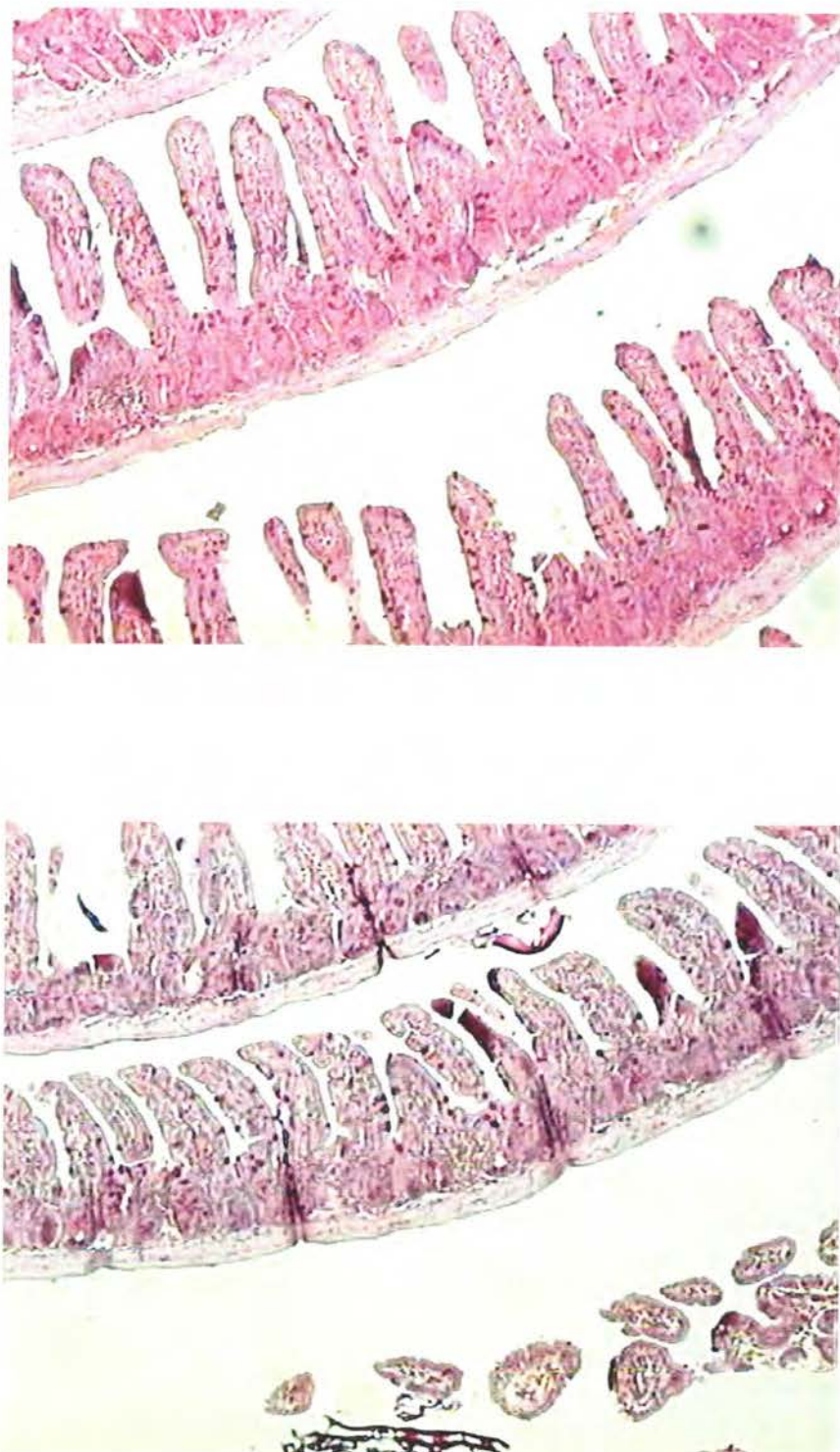
**Figura 5-** Atividade proteolítica no lavado de estômago. Foi realizado um lavado, com 1ml de PBS 1x (pH7), no estômago de camundongos controle e com gastrite (em jejum) 24 horas após a última administração de salina ou etanol, respectivamente. Após normalização da quantidade de proteínas do lavado, 100  $\mu$ l das amostras foram incubados com 100  $\mu$ l de Ova (0.25% diluída em tampão citrato-fostato pH2.5) em banho-maria 37°C durante vários tempos. A reação foi parada com TCA e a absorbância do sobrenadante determinada no espectrofotômetro a 750 nm pela reação de Folin. Os resultados de 3 animais por grupo foram plotados em um gráfico de abs x tempo (A). A média  $\pm$  EP dos valores obtidos pela inclinação da reta de cada grupo foram representados em B. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

*I-2.3. Nos animais com gastrite há uma nítida diminuição do muco estomacal devido a uma redução no número de células secretoras.*

Notamos que, nas amostras do lavado do estômago obtidas para o experimento descrito no ítem anterior, a quantidade de material mucoso era nitidamente menor nos animais com gastrite. Sendo um importante componente do trato gastrointestinal, analisamos histologicamente a presença de muco no estômago, intestinos delgado e grosso dos animais, através da coloração com PAS (*Periodic Acid Schiff*). Na figura 6B podemos observar que a redução do material mucoso no lavado do estômago dos animais com gastrite não é somente devido a uma redução do muco aderente ao epitélio pela perda da superfície epitelial, mas principalmente por uma significativa diminuição no número de células secretoras de muco por toda extensão da mucosa gástrica, quando comparado com o número dessas células nos animais controles (Figura 6A). Essas alterações estão restritas ao estômago uma vez que não há diferença entre os grupos no número de células produtoras de muco no intestino delgado (células caliciformes), demonstrado pela análise histológica na figura 7.



**Figura 6-** Análise histológica das células produtoras de muco na mucosa gástrica. Visualização (40x) morfológica da região do corpo do estômago de camundongos controle (**foto de cima**) e com gastrite (**foto de baixo**) corada com PAS-hematoxilina, 24 horas após a última administração de salina ou etanol.



**Figura 7-** Análise histológica das células produtoras de muco do intestino delgado. Visualização (100x) morfológica do jejuno de camundongos controle (**foto de cima**) e com gastrite (**foto de baixo**) corado com PAS-hematoxilina, retirado 24 horas após a última administração de salina ou etanol.

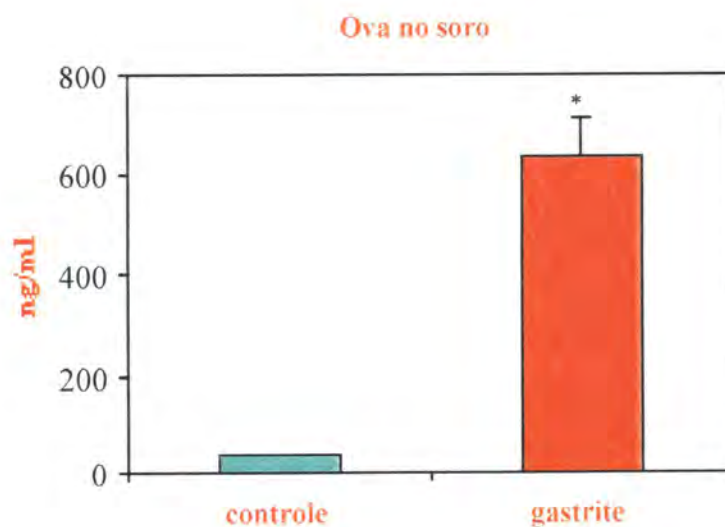
*1-2.4. Alterações epiteliais resultantes da gastrite interferem na absorção de proteínas.*

A perda da superfície epitelial na área de lesão da mucosa gástrica dos animais com gastrite, como demonstrado na figura 1B, indica um sério comprometimento na função de barreira característica dos tecidos epiteliais. No intestino delgado, além da função de barreira, outra atividade do tecido epitelial é a absorção de proteínas através dos enterócitos nas vilosidades, e das células M que fazem parte do epitélio que recobre as placas de Peyer. Pelo menos histologicamente, observamos uma manutenção da integridade da superfície epitelial no intestino desses animais (Figura 2).

Verificamos, em seguida, se haveria um efeito do tratamento com etanol na absorção de proteínas pela determinação da concentração sérica de uma proteína administrada pela via oral. Animais C57BL/6 controle e com gastrite receberam, 24 horas após a última administração de salina ou etanol, respectivamente, 80 mg de Ova em um volume de 0,5 ml. Como a porcentagem de proteína intacta que é absorvida no intestino está em torno de 0.01%, utilizamos uma dose alta de proteína para conseguirmos uma melhor detecção. Para dosar a quantidade de proteína no soro, realizamos um ensaio de ELISA de captura específico para detectar a presença de proteína intacta. Em experimentos prévios, determinamos que o tempo ótimo de detecção de Ova na circulação é em torno de 75 minutos após a administração oral.

Na figura 8, observamos um aumento de mais de 10 vezes na concentração de Ova no soro de animais com gastrite quando comparados com animais controle.



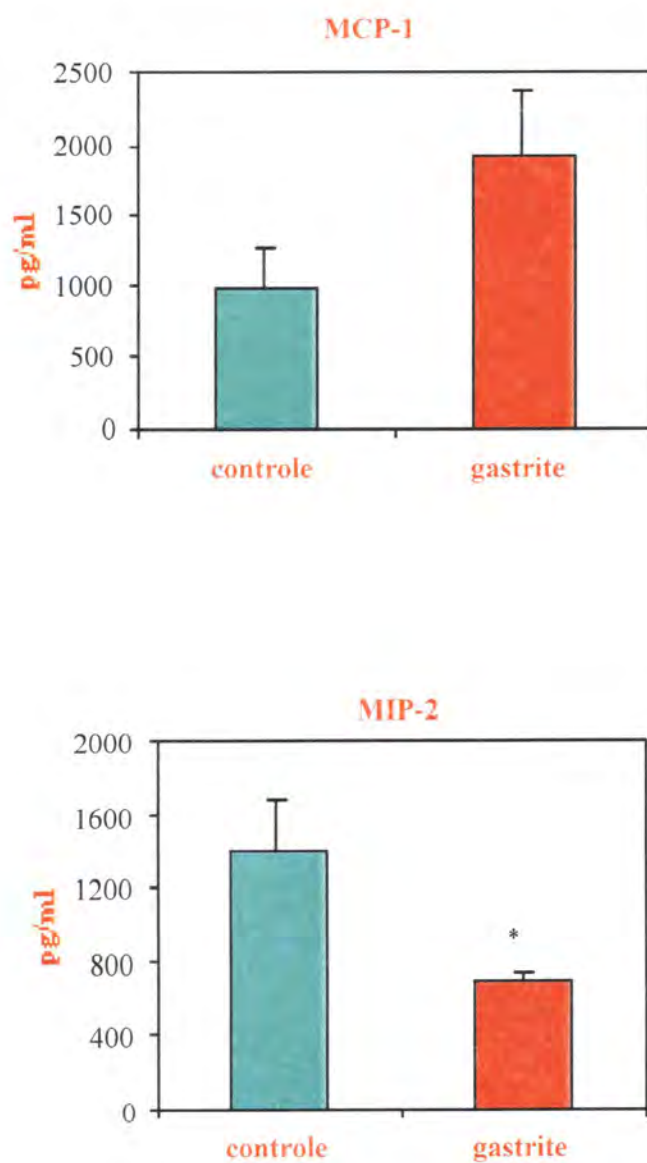


**Figura 8-** Concentração de Ova no soro. Camundongos controle e com gastrite receberam, 24 horas após a última administração e salina ou etanol, respectivamente, uma gavagem com 80 mg de Ova e 75 minutos depois foram sangrados e o soro coletado para dosagem Ova na circulação por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$  EP da concentração de Ova de 5 camundongos por grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

*1-3. Alterações imunológicas locais induzidas pelo álcool e pelo processo inflamatório.*

*1-3.1. Há uma alteração na concentração de quimiocinas no estômago de animais com gastrite.*

Quimiocinas são mediadores sabidamente envolvidos na migração de células tanto em situações fisiológicas como em eventos patológicos. Para avaliar quais os tipos celulares estariam sendo recrutados no foco inflamatório induzido pelo tratamento com álcool, analisamos o perfil de quimiocinas locais. Essas quimiocinas foram medidas pelo método de ELISA no sobrenadante de extrato de estômago. Na figura 9, observamos que há alterações na concentração de duas quimiocinas diferentes no estômago de animais com gastrite; alterações estas traduzidas pelo aumento de MCP-1(A) e pela diminuição de MIP-2 (B).



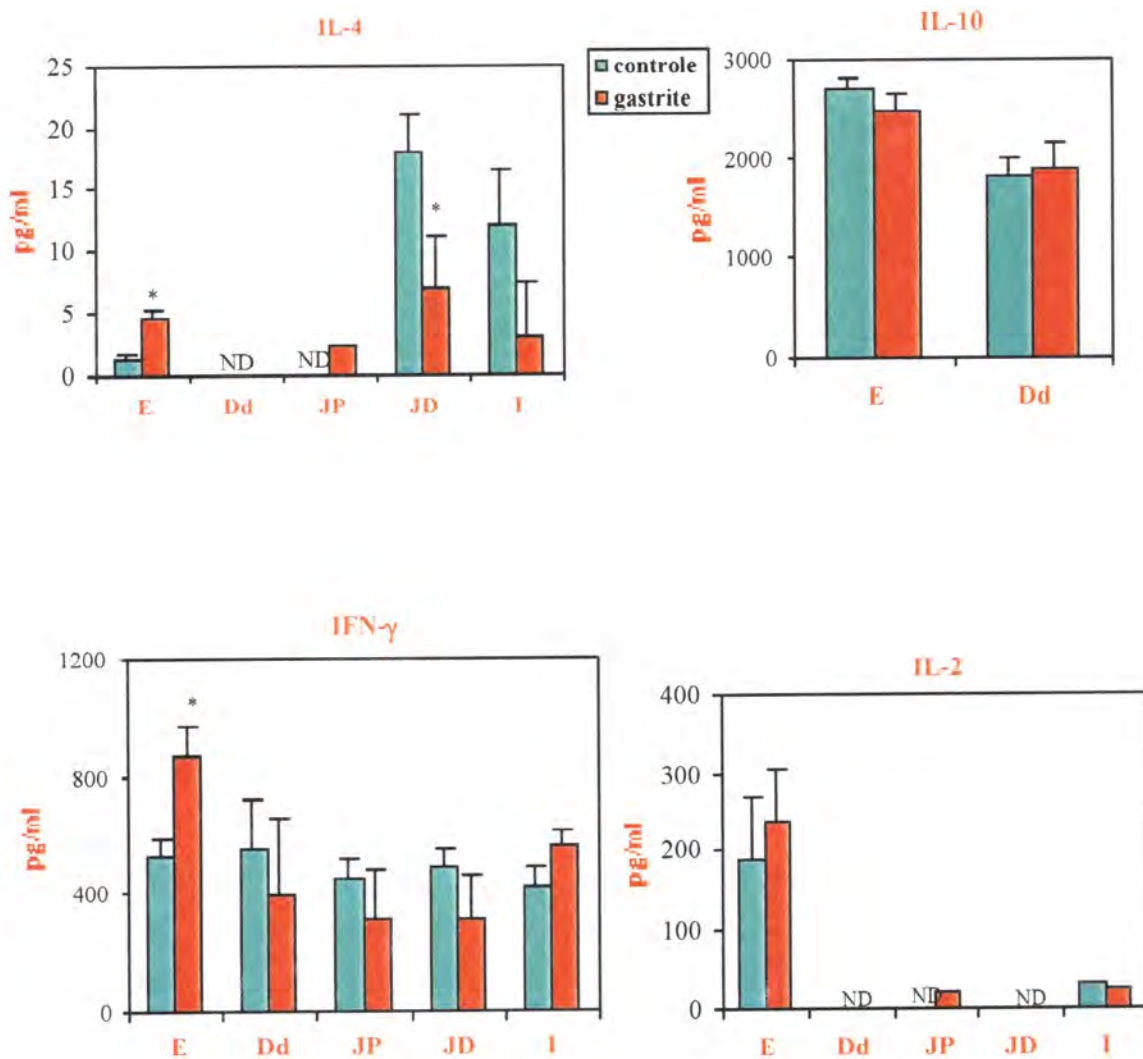
**Figura 9-** Concentração de quimiocinas no estômago. Extrato de estômago de camundongos controle e com gastrite foi preparado 24 horas após a última administração de salina ou etanol, respectivamente, e o sobrenadante usado para dosagem de MCP-1 e MIP-2 por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$  EP da concentração de quimiocinas de cada grupo de 5 camundongos. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

*1-3.2. A gastrite está associada à produção de um padrão misto de citocinas no estômago.*

Citocinas são importantes mediadores em vários eventos imunológicos e são indicativos de atividade celular. Para analisar o perfil de citocinas secretadas por células da mucosa gástrica e intestinal, retiramos o estômago e intestino delgado dos animais. Esse último foi ainda subdividido em 4 porções anatomicamente distintas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Produzimos um extrato desses tecidos e o sobrenadante de tais extratos foi coletado após centrifugação para a medida, por ELISA, da concentração local de citocinas.

Como demonstrado pela análise histológica (Figura 1), o processo inflamatório no estômago apresenta um padrão misto de células inflamatórias, com um aumento local de citocinas do tipo 1 e 2. A figura 10 mostra que, nos animais com gastrite quando comparados com os animais controle, ocorre um aumento na concentração de IL-4 no estômago e em uma porção inicial do intestino, representada pelo jejuno proximal. Curiosamente, nesses animais a concentração de IL-4 diminuiu nas porções distais do intestino (jejuno distal).

Uma citocina de extrema importância em eventos regulatórios na superfície das mucosas é a IL-10. No entanto, sua concentração não está alterada nem no estômago nem no intestino dos animais após o tratamento com etanol. Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e IL-2, estão aumentadas no estômago e jejuno proximal dos animais respectivamente.

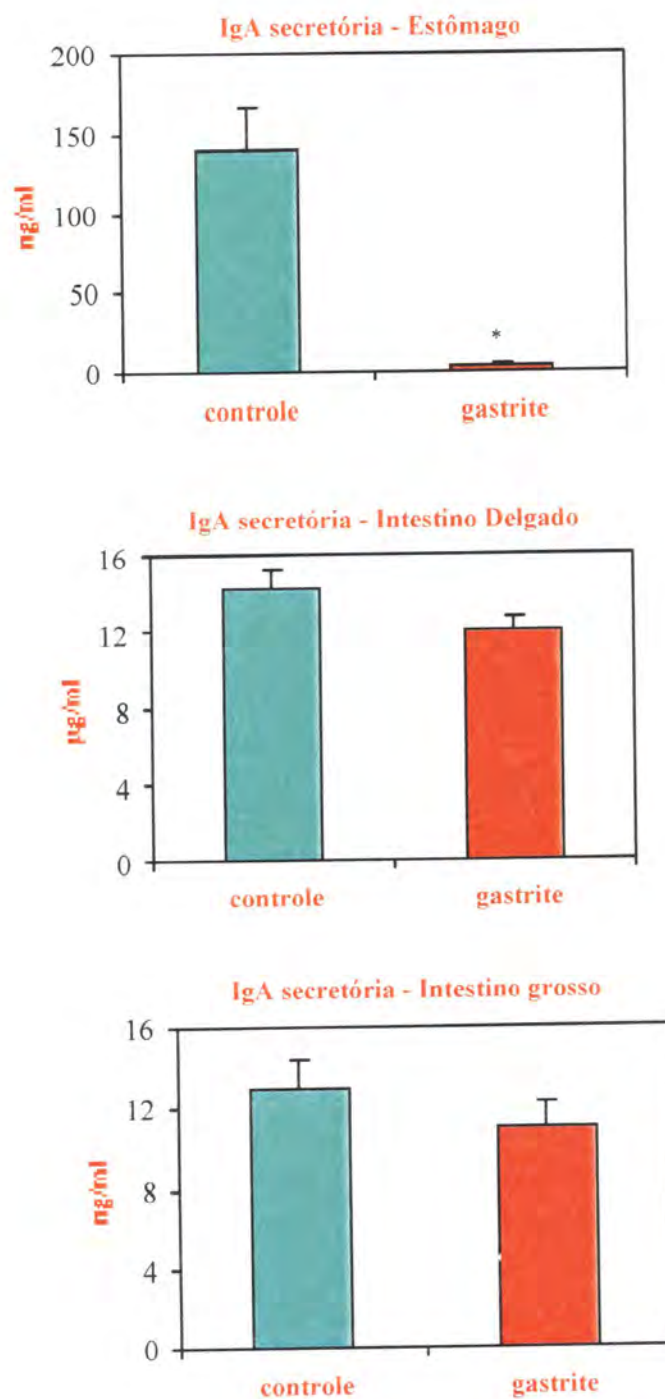


**Figura 10-** Análise da produção de citocinas no estômago e intestino delgado. Extrato de estômago e intestino delgado de camundongos controle e com gastrite foi preparado 24 horas após a última administração de salina ou etanol, respectivamente, e o sobrenadante usado para dosagem de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-2 por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da concentração de citocinas de cada grupo de 5 camundongos. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

*I-3.3. Há uma drástica redução na concentração de IgA secretória no estômago de animais com gastrite.*

Uma vez que observamos alterações locais na produção de quimiocinas e de citocinas, resolvemos analisar a produção de IgA secretória, uma atividade imunológica típica das mucosas. A IgA secretória é produzida por plasmócitos na *lamina propria* e transportada, via células epiteliais, para o muco no lúmen do trato gastrointestinal. Amostras do muco do estômago, do intestino delgado e intestino grosso dos animais controle e com gastrite foram coletadas e a IgA presente nas amostras medida por ELISA.

Na figura 11, observamos uma drástica redução na concentração de IgA secretória no muco do estômago dos animais com gastrite. Nenhuma alteração foi observada no intestino delgado ou no intestino grosso.

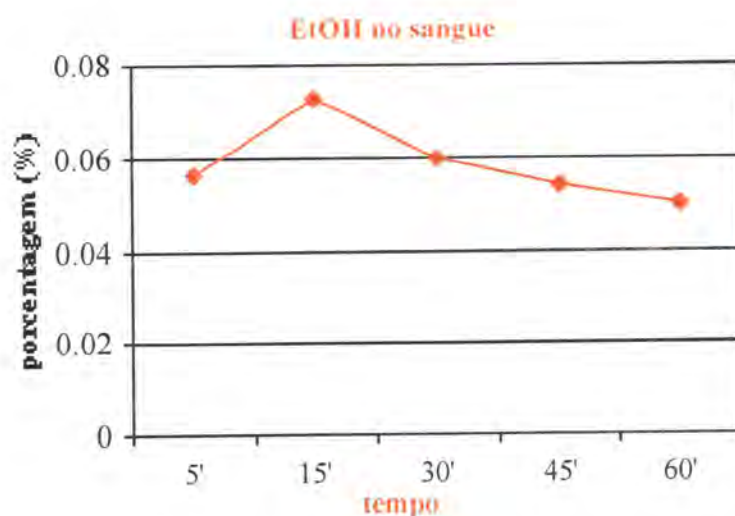


**Figura 11-** Concentração de IgA no trato gastrointestinal. O lavado do estômago, intestino delgado e intestino grosso de camundongos controle e com gastrite, coletado 24 horas após a última administração de salina ou etanol, foi analisado por ELISA para dosagem de IgA secretória. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da concentração de IgA de 5 camundongos por grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

#### I-4. Análise dos efeitos sistêmicos induzidos pelo álcool e pelo processo inflamatório.

##### I-4.1. O etanol é uma substância rapidamente metabolizada por camundongos C57BL/6.

Analisamos, num primeiro momento, a concentração de álcool na circulação sanguínea, através da detecção, pelo espectrofotômetro, de produtos derivados do metabolismo do EtOH pela enzima NADH. Amostras de sangue dos animais foram coletadas em diferentes tempos (5', 15', 30', 45' e 60') após o tratamento com EtOH 50%. O sangue de animais tratados com salina foi usado como controle. Aparentemente, o EtOH é uma substância eficientemente metabolizada pelos camundongos pois, 5 minutos após a administração de EtOH 50%, menos de 0.06% da quantidade administrada foi encontrada na circulação (Figura 12). Apesar de um pico observado aos 15 minutos (0.073%), essa concentração decai novamente após 30 minutos e, 1 hora após a administração de EtOH, os níveis de etanol estão a 0.05%.



**Figure 12-** Dosagem de etanol (EtOH) no sangue. Animais receberam uma gavagem com EtOH 50% e foram sangrados em diferentes tempos após a administração. Animais tratados com salina foram usados como controle. O gráfico expressa a porcentagem de EtOH detectada no soro de cada animal no respectivo tempo, já descontados do valor do grupo controle.



*I-4.2. Anemia e leucopenia são alterações sanguíneas marcantes após a indução de gastrite.*

Resolvemos analisar os efeitos da administração de etanol e do processo inflamatório na mucosa gástrica sobre a população de leucócitos e de hemácias no sangue desde tempos iniciais até prolongados após o tratamento dos animais. Grupos de animais foram sangrados em diferentes tempos (1, 7, 14 ou 30 dias) após a última administração de etanol ou salina e foi realizada a contagem de hemácias (em solução diluidora), a contagem do total de leucócitos (em solução de Turk) e a contagem diferencial pela coloração com solução de May-Grunwald/Giemsa.

A tabela 1 mostra os valores obtidos da contagem de hemácias. Observamos um quadro de anemia nos animais com gastrite estabelecido 7 dias após o tratamento definido pela redução significativa no número de hemácias no sangue desses animais. Essa diferença entre os grupos é ainda observada 14 dias após o tratamento. Entretanto, em um tempo prolongado (30 dias), não há mais diferença no número de hemácias entre os grupos.

Esse quadro anêmico não é suficiente para comprometer o transporte de oxigênio, pelo menos em se tratando da concentração de hemoglobina, que se manteve invariável entre os grupos em todos os tempos analisados (dados não mostrados).

Já o efeito do etanol sobre a população de leucócitos é muito mais prolongado. Uma leucopenia grave é observada 1, 14 e 30 dias após o tratamento, como demonstrado na tabela 2. Interessantemente, 7 dias depois, não há diferença no número de leucócitos entre os grupos. A análise diferencial (tabela 3) nos mostrou que essa redução é devido a uma alteração principalmente na população de células mononucleares. A porcentagem da população de eosinófilos na circulação dos animais com gastrite é baixa no 1º dia pós-tratamento e, em tempos posteriores, a presença dessas células não é mais detectada.

### Número de hemácias $\times 10^6/\text{mm}^3$

	Dias após o último tratamento com salina ou EtOH			
	1º dia	7º dia	14º dia	30º dia
<b>controle</b>	7.73±0.5	10.74±0.5	13.56±0.7	9.75±2.1
<b>gastrite</b>	8.8±1.7	5.85±0.06*	10.0±0.1*	10.2±0.26

**tabela 1-** Análise do número de hemácias no sangue de camundongos controle e com gastrite. Os animais foram sangrados em diferentes tempos após a última administração de salina ou etanol e o sangue coletado em uma solução diluidora para contagem de hemáceas. Os resultados expressam o número de hemáceas  $\times 10^6 / \text{mm}^3$ . \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

### Número de leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$

	Dias após o último tratamento com salina ou EtOH			
	1º dia	7º dia	14º dia	30º dia
<b>controle</b>	13.3±2.9	9.4±3.0	19.5±2.0	13.1±1.4
<b>gastrite</b>	4.5±0.65*	16±2.25	10.4±0.7*	7.0±1.52*

**tabela 2-** Análise do número de leucócitos no sangue de camundongos controle e com gastrite. Os animais foram sangrados em diferentes tempos após a última administração de salina ou etanol e o sangue coletado em solução de Turk para contagem de leucócitos. Os resultados expressam o número de leucócitos  $\times 10^3 / \text{mm}^3$ . \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

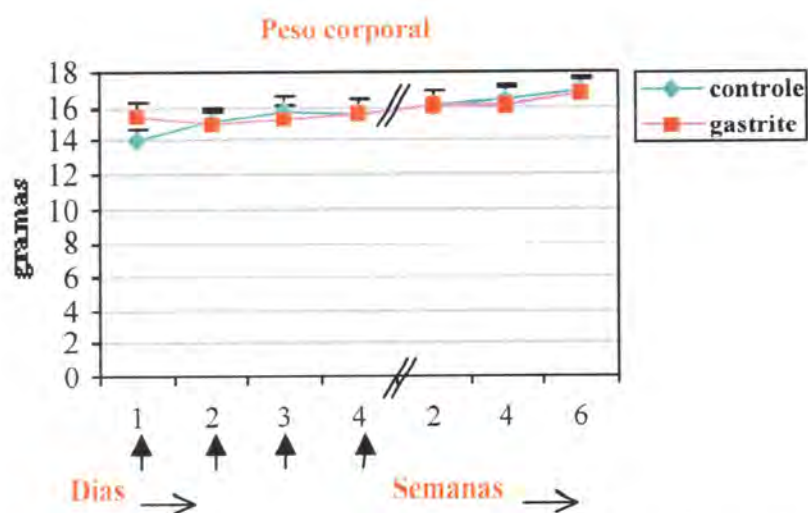
### Contagem diferencial de leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$

		Dias após o último tratamento com salina ou EtOH			
		1º dia	7º dia	14º dia	30º dia
<b>controle</b>	mononuclear	11.37±2.8 (85.5%)	6±0.8 (64%)	17.3±1.4(89.3%)	11.8±0.5(90.2%)
	neutrófilo	1.7±0.4(12.8%)	3±0.7(32.5%)	2.22±0.5(10.7%)	0.83±0.5(6.4%)
	eosinófilo	0.2±0.1 (1.7%)	0.4±0.3(3.5%)	ND	0.18±0.05(6.4%)
<b>gastrite</b>	mononuclear	3.4±0.7*(75.5%)	12.2±3.8*(76.5%)	10±0.5*(96%)	6.09±0.5*(87%)
	neutrófilo	1.0±0.09 (22.2%)	3.76±0.29(23.5%)	0.4±0.1*(4%)	0.89±0.05(13%)
	eosinófilo	0.1±0.02 (2.3%)	ND	ND	ND

**tabela 3-** Análise diferencial de leucócitos no sangue de camundongos controle e com gastrite. Os animais foram sangrados em diferentes tempos após a última administração de salina ou etanol, e realizado um esfregaço sanguíneo para coloração com solução May-Grunwald/Giemsa para contagem diferencial de leucócitos. Os resultados expressam o número de leucócitos  $\times 10^3 / \text{mm}^3$ . \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

### I-4.3. Efeito da administração de álcool e da gastrite no peso corporal dos animais:

Observamos várias alterações na aparência dos animais com gastrite, como pêlos arrepiados e oleosos. Investigamos, por isto, se o tratamento com álcool teria efeito no peso corporal desses animais. Antes e logo após o tratamento, eles foram pesados diariamente durante 4 dias e depois a cada 15 dias. Como demonstrado na figura 13, não há uma alteração do peso dos animais com gastrite quando comparado com o peso dos animais controle nos tempos analisados.



**Figura 13-** Curva de peso corporal. Camundongos C57BL/6 de 8 semanas de idade foram pesados diariamente durante os dias de tratamento oral com salina (controle) ou etanol (gastrite), demonstrados pelas setas, e depois a cada 15 dias durante um mês e meio. Os resultados expressam a média  $\pm$  EP de 5 camundongos de cada grupo.

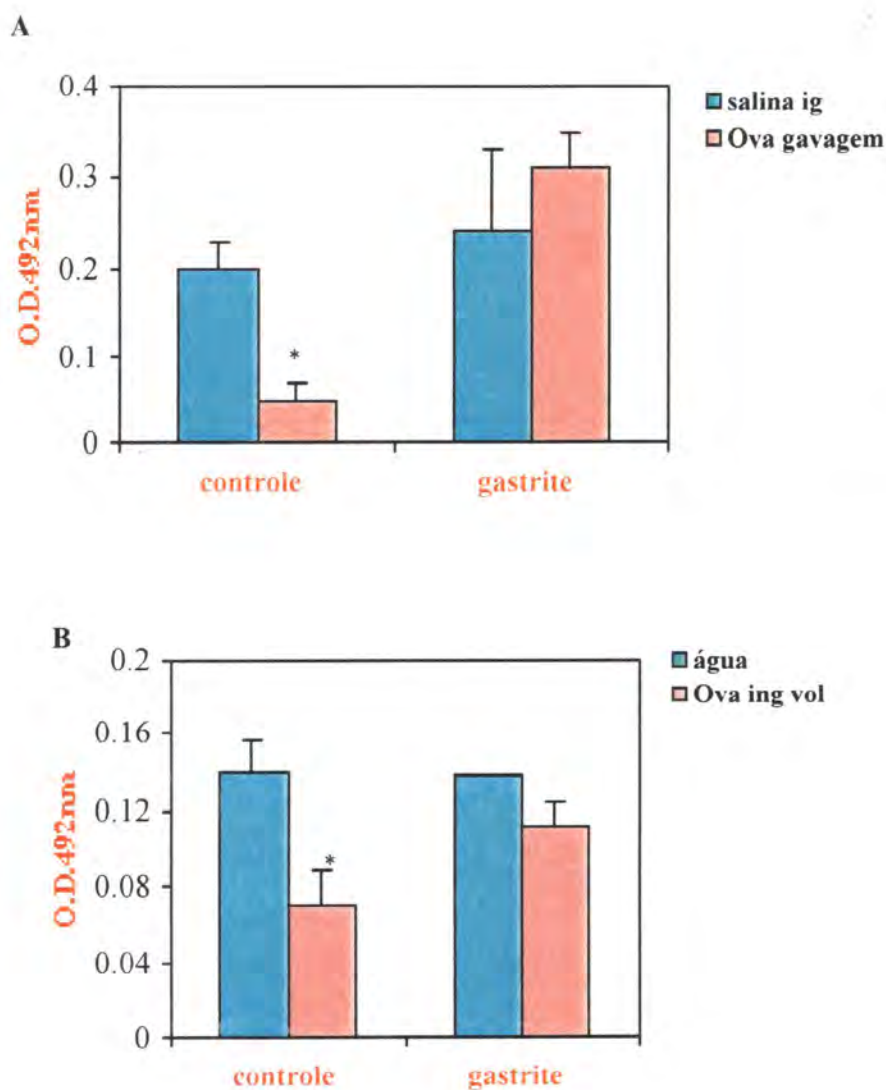
**II- Repercussão das alterações inflamatórias sobre eventos  
imunológicos fisiológicos como a tolerância oral**

*II-1. Animais com gastrite se tornam refratários à indução de tolerância oral à Ova analisada pela produção de anticorpos específicos.*

Para analisar diferenças na susceptibilidade à indução de tolerância oral, animais controle e com gastrite receberam, 24 horas após a administração de etanol ou salina, uma única gavagem com 20 mg de Ova (Ova ig) ou salina (salina ig) e, posteriormente, todos os animais foram desafiados com o antígeno por via sistêmica. O soro de todos os animais foi coletado para análise da produção de anticorpos específicos por ELISA.

Na figura 14A, podemos observar que os animais controle que receberam a Ova por via oral (Ova ig) tornam-se tolerantes, como demonstrado pela supressão da produção de anticorpos específicos quando comparada com a mesma produção pelo grupo apenas imunizado (salina ig). Entretanto, nos animais com gastrite, observamos uma refratariedade à indução de tolerância à Ova demonstrada pelo aumento nos títulos de anticorpos específicos dos grupos pré-tratados com Ova (Ova ig) em níveis semelhantes àqueles observados no grupo imunizado (salina ig).

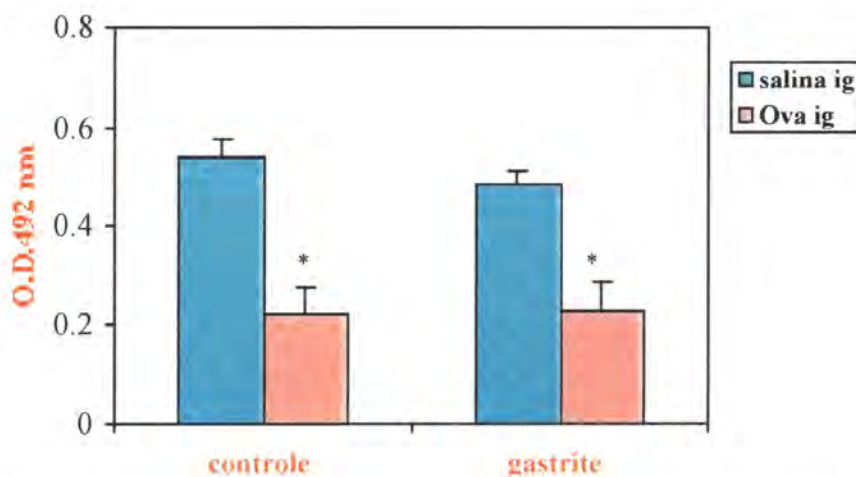
Para otimizar o protocolo de indução de tolerância, utilizamos outro protocolo de administração oral através da ingestão voluntária do antígeno, no qual uma concentração equivalente de Ova é diluída no conteúdo líquido que o animal bebe durante um dia. Esse método reflete a forma natural de ingestão e já foi demonstrado ser o protocolo mais eficiente na indução de tolerância oral. Para tal, os animais receberam uma dose equivalente de Ova (20 mg) dissolvida na mamadeira de água por 4 dias consecutivos, de modo que os animais tomaram aproximadamente 5mg de Ova por dia. A figura 14B mostra que, ainda assim, nos animais com gastrite nenhuma supressão da produção de anticorpos específicos nos animais pré-tratados com Ova é observada. O nível de anticorpos anti-Ova no grupo Ova oral é semelhante ao grupo salina ig.



**Figura 14-** Produção de anticorpos anti-Ova em camundongos imunizados e tolerizados em um tempo inicial após a indução de gastrite. Animais receberam, 24 horas após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), (A) uma gavagem com salina (salina ig) ou 20 mg de Ova em 0,2 ml de salina (Ova gavagem), (B) ingestão de uma solução de 5 mg/ml de Ova na água dos animais durante 5 dias (Ova ing vol) ou somente água. Todos os animais foram imunizados 7 dias depois com 10  $\mu$ g de Ova + 3 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10  $\mu$ g de Ova em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Os soros coletados 7 dias após a última imunização foram dosados por ELISA para medir a produção de anticorpos anti-Ova. Os resultados representam a média  $\pm$  EP da densidade óptica do soro (diluição 1:400 -A e 1:10000 -B) de cada 5 camundongos por grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t Student bicaudal)

*II-1.1. A entrada da Ova no contexto inflamatório é um fator importante para as alterações na indução de tolerância oral.*

Nesse experimento os animais receberam uma gavagem com 20 mg de Ova em um tempo tardio (30 dias) após a indução de gastrite, quando o processo inflamatório na mucosa gástrica já estava resolvido. Observamos na figura 15 que os animais com gastrite que receberam o antígeno por via oral ficaram tolerantes demonstrado pela supressão da produção de anticorpos específicos quando comparado com os animais imunes.



**Figura 15-** Produção de anticorpos anti-Ova em camundongos imunizados e tolerizados em um tempo tardio após a indução de gastrite. Animais receberam, 30 dias após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), uma gavagem com salina (salina ig) ou 20 mg de Ova em 0,2 ml de salina (Ova ig), 7 dias antes da imunização primária com 10 µg de Ova + 3 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10 µg de Ova em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Os soros coletados 7 dias após a última imunização foram dosados por ELISA para medir a produção de anticorpos anti-Ova. Os resultados representam a média ± EP da densidade óptica do soro (diluição 1:3200) de cada 5 camundongos por grupo. \*p<0.05 (Teste t *Student* bicaudal)

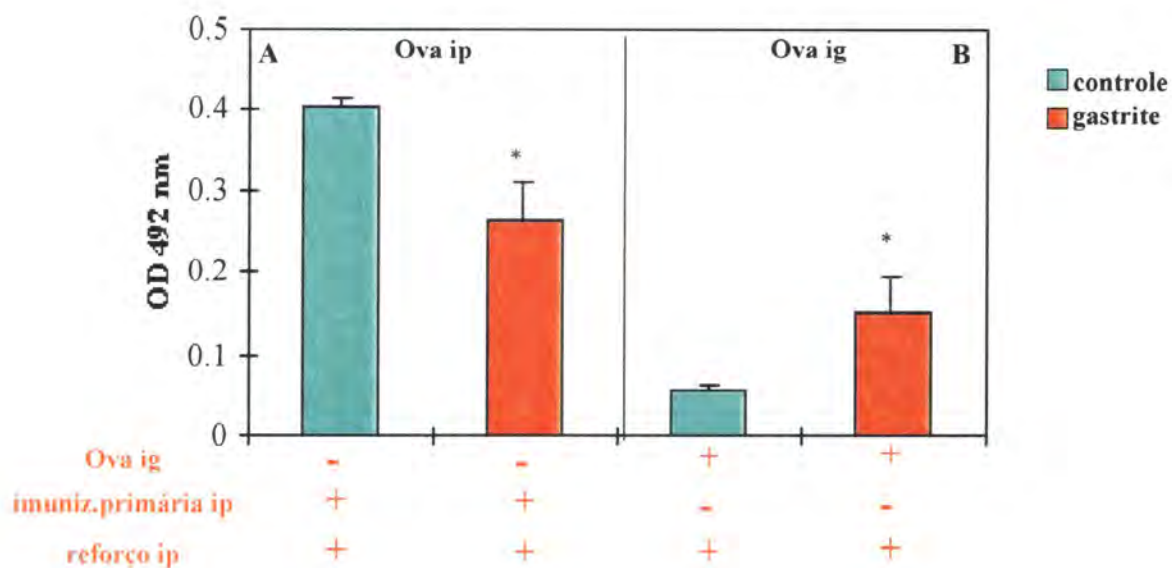
## *II.2. Os animais com gastrite são sensibilizados após a exposição à Ova pela via oral.*

Para testar a capacidade imunogênica do tratamento oral com antígeno nos animais com gastrite, todos os animais receberam 24 horas após o tratamento com etanol ou salina, uma gavagem com 20 mg de Ova e um reforço intraperitoneal com o antígeno solúvel 14 dias depois. Uma semana depois, os animais foram sangrados e o título de anticorpos específicos determinado por ELISA. Como controle, animais de ambos os grupos foram convencionalmente imunizados.

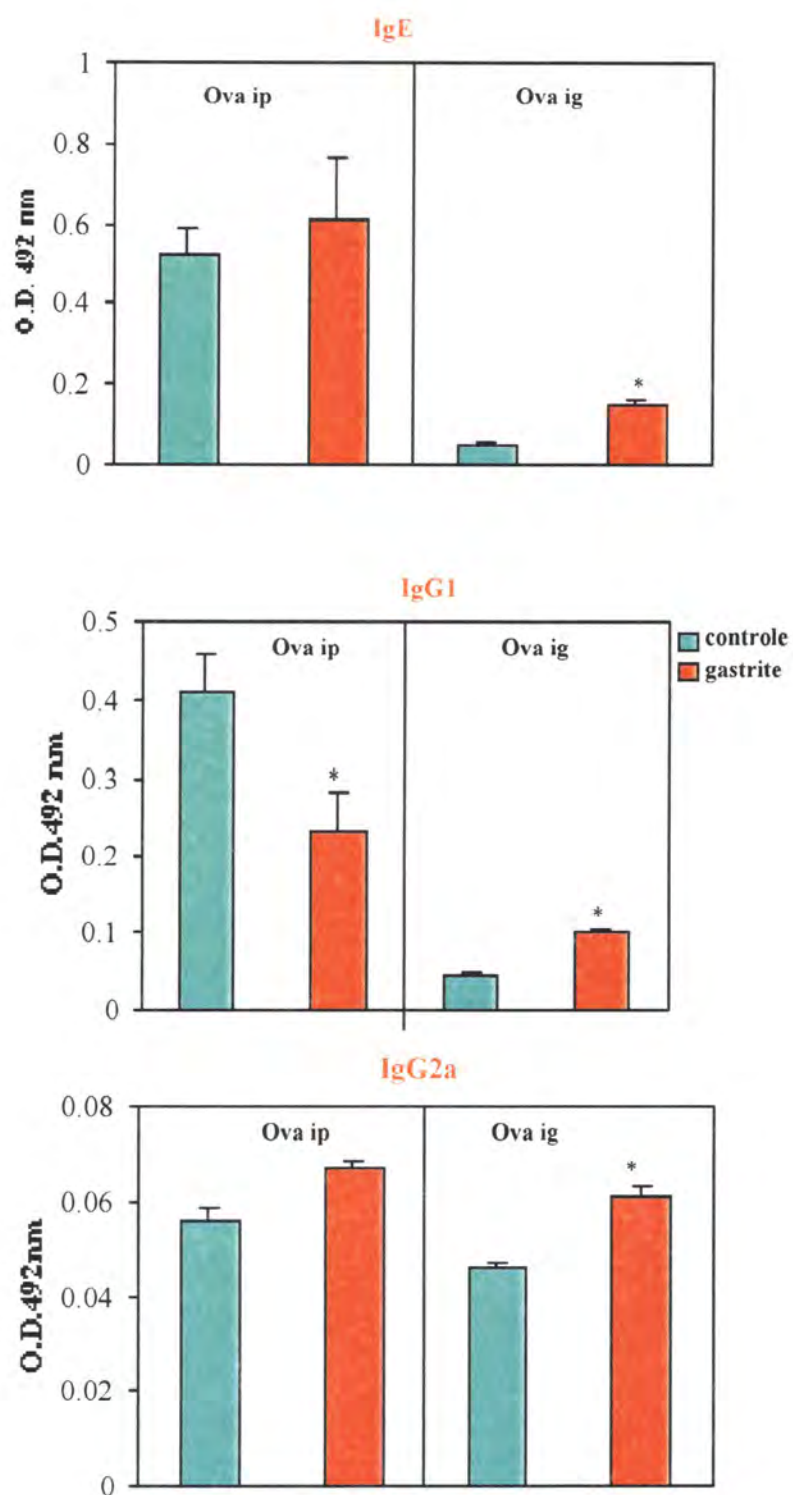
A Figura 16B mostra que animais com gastrite são sensibilizados ao entrar em contato com a Ova por via oral, como demonstrado pelo aumento significativo do nível de anticorpos específicos após o reforço intraperitoneal, quando comparado com os animais controle. Interessantemente, esse nível é apenas ligeiramente inferior àquele observado no controle imunizado com Ova e adjuvante (Figura 16A). Nos animais controle, ao contrário, a diferença do nível de anticorpos específicos entre os grupos imunizado e tratado com Ova oral é de 8 vezes. Outra observação interessante se refere à sensibilidade dos animais com gastrite à imunização intraperitoneal com Ova e adjuvante. Podemos observar que o nível de anticorpos específicos pós imunização nesses animais é significativamente menor que nos animais controle imunizados sugerindo que o tratamento com álcool facilita a sensibilização oral mas dificulta a reatividade imunológica induzida por via parenteral para a Ova.

Como o contato oral com a Ova nos animais tratados com etanol resulta não em supressão mas em sensibilização imunológica, o próximo passo foi analisar os isotipos específicos produzidos por essa sensibilização. A figura 17 mostra inicialmente que o comprometimento na indução de uma reatividade imunológica pela imunização parenteral com Ova e adjuvante afeta principalmente o isotipo IgG1, mas não tem nenhum efeito na produção de IgE e IgG2a anti-Ova sugerindo um defeito seletivo nos isotipos induzidos pela imunização utilizando alumínio como adjuvante. Com relação aos isotipos induzidos pela sensibilização mediante a administração oral de Ova, ocorre um aumento significativo no nível de anticorpos IgG, IgE e IgG2a específicos embora a diferença nos níveis de IgG1 e IgG2a serem mais marcante que a encontrada para IgE nesses animais.





**Figura 16-** Produção de anticorpos anti-Ova após exposição oral com Ova. Animais receberam, 24 horas após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), (A, Ova ig) uma gavagem com 20 mg de Ova em 0,2 ml de salina, 14 dias antes da imunização com 10 µg de Ova em 0,2 ml de salina por via peritoneal. (B, Ova ip) Os animais receberam imunização primária com 10 µg de Ova + 3 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 0,2 ml de salina por via peritoneal e após 14 dias foram desafiados com 10 µg de Ova em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Os soros coletados 7 dias após a última imunização foram dosados por ELISA para medir a produção de anticorpos anti-Ova. Os resultados representam a média ± EP da densidade óptica do soro (diluição de 1:3200) de 5 camundongos por grupo. \*p<0,05 (Teste t *Student* bicaudal)

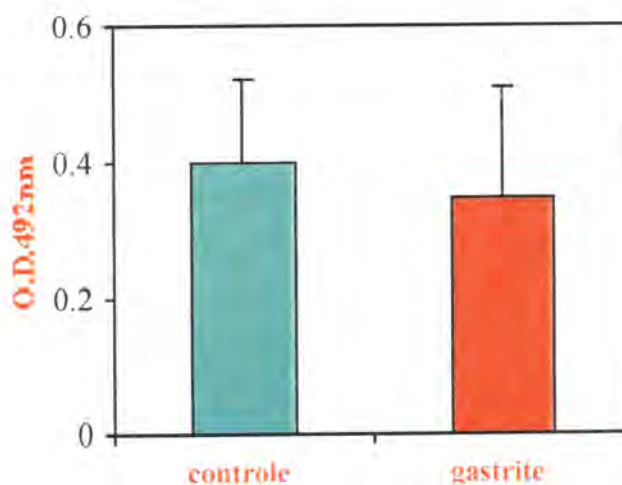


**Figura 17-** Produção de isotipos específicos após exposição oral com Ova. Os soros dos animais coletados no experimento descrito na figura 16 foram analisados para a produção de IgE (soro total), IgG1 e IgG2a (soro 1:3200) por ELISA. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

II-3. A capacidade de desenvolver uma resposta imune contra Ova não está alterada em um tempo inicial após a indução de gastrite.

Verificamos que o tratamento com álcool interfere na imunização sistêmica dos animais (Figura 16). No protocolo de imunização utilizado anteriormente os animais entraram em contato sistêmico como a Ova 8 dias após o último tratamento com etanol. O próximo passo foi analisar se essa interferência seria mais marcante logo após o tratamento com etanol, no tempo crítico de inflamação. Para isto, os animais foram imunizados com Ova em alumínio 24 horas após a última administração de etanol ou salina e posteriormente desafiados com o antígeno solúvel ip. O soro dos animais foi coletado 7 dias após o desafio e o nível de anticorpos específicos no soro medida por ELISA.

A figura 18 mostra que a reatividade imunológica anti-Ova não é diferente entre os grupos de animais controle e com gastrite logo após o tratamento com etanol indicando que as consequências do processo inflamatório na imunidade sistêmica são mais tardias.

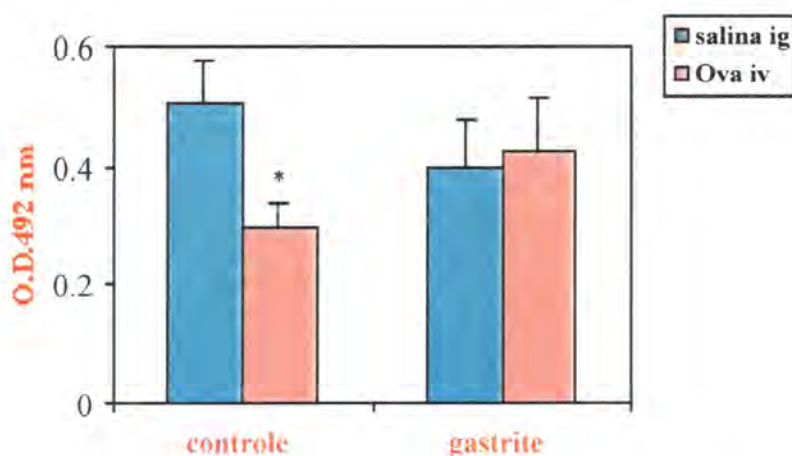


**Figura 18-** Anticorpos anti-Ova em camundongos imunizados. Animais receberam, 24 horas após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), uma imunização primária com 10 µg de Ova + 3 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 0,2 ml de salina por via peritoneal e após 14 dias foram desafiados com 10 µg de Ova em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Os soros coletados 7 dias após a última imunização foram dosados por ELISA para medir a produção de anticorpos anti-Ova. Os resultados representam a média ± EP da densidade óptica do soro (diluição 1:400) de 5 camundongos por grupo.

*II-4. A indução de tolerância por via endovenosa também está comprometida nos animais com gastrite.*

Como observamos várias alterações sistêmicas nos animais com gastrite inclusive a interferência na indução de tolerância oral, resolvemos analisar se esses efeitos inflamatórios seriam capazes de interferir na indução de tolerância pela administração sistêmica do antígeno. Para isto, os animais receberam, 24 horas após a última administração de etanol ou salina, uma injeção no plexo ocular de 1µg de Ova em 50 µl de salina sendo posteriormente desafiados com o antígeno por via intraperitoneal. O soro foi coletado para a medida, por ELISA, da produção de anticorpos específicos.

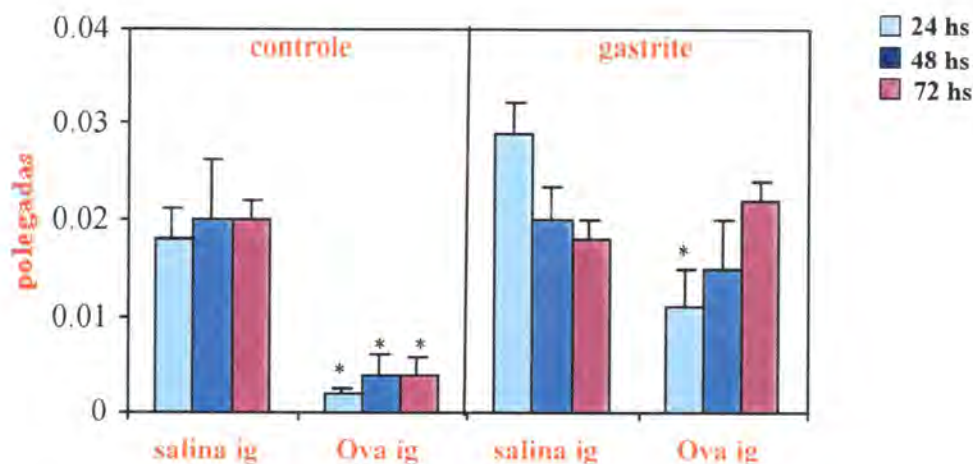
Podemos observar, na figura 19, que animais controle apresentaram uma ligeira mas significativa diminuição na produção de anticorpos específicos induzida pela administração endovenosa de Ova, o que caracteriza o fenômeno de tolerância. Entretanto, nos animais com gastrite, não há diferença no nível de anticorpos específicos entre os grupos tratados ou não com a Ova iv. Esse dado nos sugere que o tratamento com etanol e a gastrite têm efeitos nos mecanismos regulatórios responsáveis pela tolerância sistêmica e que seu efeito sobre a tolerância oral não se restringe a um efeito da inflamação local do estômago.



**Figura 19-** Anticorpos anti-Ova em camundongos imunizados e tolerizados por via endovenosa. Animais receberam, 24 horas após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), uma administração, no plexo venoso ocular, de 1 µg de Ova em 50 µl de salina (Ova iv) ou somente salina (salina ig) 7 dias antes da imunização primária com 10 µg de Ova + 3 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Após 14 dias os animais foram desafiados com 10 µg de Ova em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Os soros coletados 7 dias após a última imunização foram dosados por ELISA para medir a produção de anticorpos anti-Ova (diluição do soro 1:10000). \*p<0.05 (Teste t *Student* bicaudal)

*II-5. Animais com gastrite apresentam uma deficiência na indução de tolerância oral para a reatividade celular in vivo e alterações na reação de hipersensibilidade retardada (DTH).*

A reatividade celular *in vivo* foi analisada através da indução da reação de DTH. A reação foi avaliada pelo aumento do inchaço da pata medido 24, 48 e 72 horas depois do desafio subcutâneo com Ova desnaturada em camundongos previamente imunizados por via subcutânea com Ova adsorvida em CFA. A tolerância é observada nos animais controle pre-tratados com Ova por via oral (quando comparados com o grupo somente imunizado) e está traduzida na supressão do processo inflamatório já nas primeiras 24 horas após a injeção do antígeno na pata e mantida até 72 horas depois (Figura 20). Ao contrário, nos animais com gastrite, ocorre uma exacerbação do processo inflamatório no grupo imunizado, o que explica a diferença momentânea no tamanho do inchaço no grupo tolerizado 24 horas após o desafio. Essa supressão é transitória já que 48 e 72 horas após o desafio não há mais diferença na reação entre os grupos.



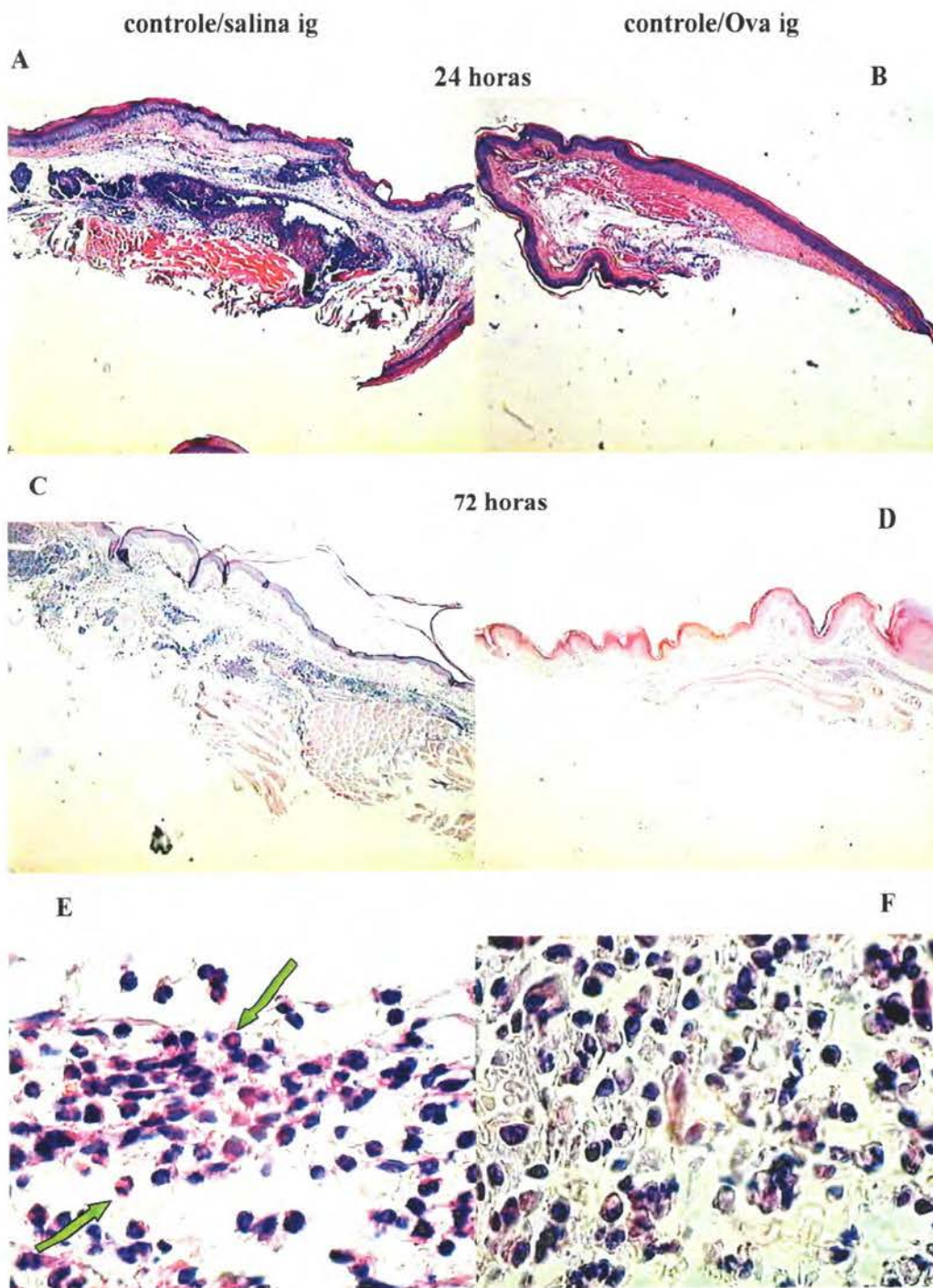
**Figura 20-** Espessura da pata em camundongos C57BL/6 controle e com gastrite após desafio local com Ova. Animais receberam, 24 horas após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), uma gavagem com 20 mg de Ova (Ova ig) ou somente salina (salina ig). Sete dias depois, todos os animais foram imunizados por via subcutânea, na base da cauda, com 40 µl de uma solução contendo 100 µg de Ova + CFA. Após 30 dias os animais recebem um desafio (sc) no coxim plantar esquerdo com 30 µl de Ova desnaturada ou somente 30 µl de salina no coxim direito, e após 24, 48 e 72 horas foi medido o tamanho do inchaço. Os resultados expressam a média ± EP da diferença entre a medida da pata esquerda e a direita em 5 animais de cada grupo. \*p<0.05 (Teste t *Student* bicaudal)

Essa diferença na cinética da reação de DTH nos levou a investigar as características do processo inflamatório induzido pela imunização na pata nesses animais. Realizamos, então, uma análise histológica do coxim plantar que foi retirado 24 e 72 horas após o desafio, fixado e posteriormente corado com hematoxilina-eosina. A análise histológica (Figura 21) mostra que nenhuma reação inflamatória é evidenciada na pata de animais controle tolerizados (Ova ig) 24 horas após o desafio (Figura 21B) e que as mesmas características morfológicas são mantidas no tempo ótimo da reação de DTH, ou seja, 72 horas após o desafio (Figura 21D). Em contraste, nos animais controle imunizados (salina ig), 24 horas depois do desafio (Figura 21A), aparece uma intensa reação celular com um infiltrado constituído por células mono e polimorfonucleares tais como neutrófilos, linfócitos e alguns eosinófilos (detalhe, Figura 21E). A única mudança na reação celular observada 72 horas após o desafio (Figura 20C) é o nítido predomínio de células mononucleares no infiltrado inflamatório (detalhe, Figura 21F).

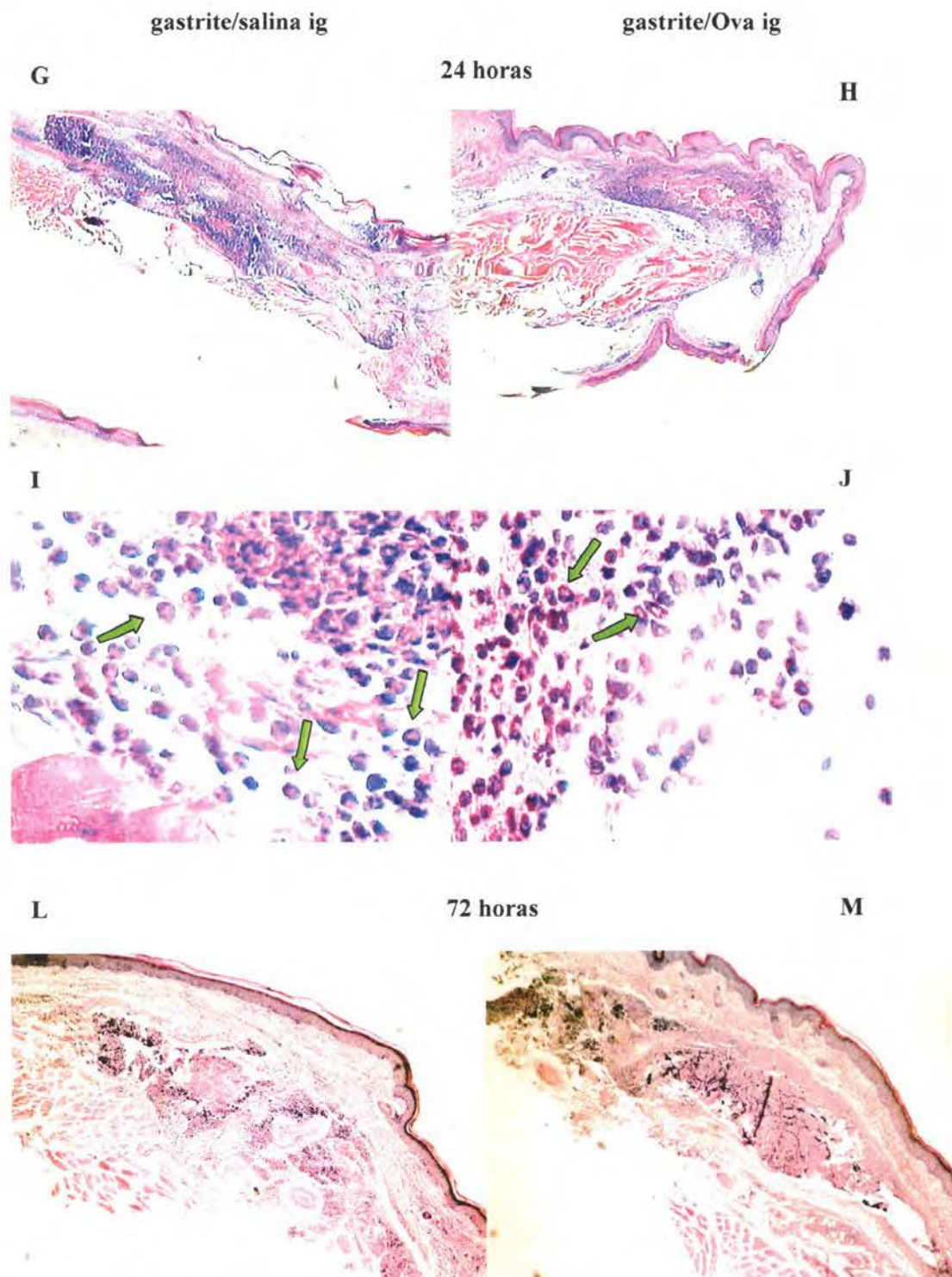
Ao contrário, nos animais com gastrite, a supressão da reação inflamatória é observada somente 24 horas após o desafio com Ova e ela se deve provavelmente a uma exacerbação no inchaço na pata do grupo imunizado (salina ig, Figura 20). Interessantemente, a análise histológica nos revelou que a reação inflamatória nesse tempo é constituída por um intenso infiltrado inflamatório e edema (Figura 21G). A figura 21I mostra os detalhes do infiltrado inflamatório e nela notamos, dentre outros tipos celulares, uma presença significativa de eosinófilos (ver setas). Setenta e duas horas após o desafio, a diminuição do inchaço observado nesse grupo (Figura 20), se deve provavelmente à resolução do edema, uma vez que a intensidade do infiltrado inflamatório está mantida (Figura 21L). Nos animais tolerizados (Ova ig), 24 horas após o desafio, o infiltrado celular é tão intenso quanto no grupo imunizado (Figura 21H), mas o edema é discreto. Em detalhe, podemos observar também a presença de uma quantidade significativa de eosinófilos entre as células inflamatórias locais (Figura 21J). A intensidade da reação celular se manteve até 72 horas após o desafio (Figura 21M). Assim, a supressão transitória observada entre os grupos tolerizados e imunizados, 24 horas após o desafio com Ova, se deve a diferenças em eventos iniciais do processo inflamatório tal como a intensidade do edema e não a mecanismos de inibição do recrutamento de células inflamatórias para o local.

Além da diferença na intensidade da reação, as características histológicas da reação de DTH são completamente diferentes entre os animais controles e os animais com gastrite. Nos últimos, observamos um marcante infiltrado eosinofílico que está ausente no controle. Nossos resultados sugerem que o tratamento com etanol resulta em uma alteração no padrão da reação de DTH, normalmente caracterizada por um processo inflamatório tipicamente Th1, iniciada pelo antígeno e CFA, para uma reação com predominância de eosinófilos semelhante àquela observada na fase tardia de um processo alérgico.

Em posse desses resultados, passamos para a próxima etapa do nosso trabalho, que foi a de investigar um mecanismo explicativo para a refratariedade à indução de tolerância oral nos animais com gastrite.







**Figura 20-** Análise histológica da pata após desafio local com Ova. Visualização morfológica do coxim plantar retirado de camundongos controle (A-F) e com gastrite (G-M), 24 ou 72 horas após a injeção com Ova na pata. Aumento de 40x: A,B,C,D,G,H,L,M. Aumento de 1000x: E- detalhe de A (controle/salina ig -24 hs- setas indicam polimorfonucleares), F- detalhe de C (controle/salina ig -72 hs); I- detalhe de G (gastrite/salina ig -24hs); J- detalhe de H (gastrite/Ova ig - 24hs). Em I e J setas indicam eosinófilos.

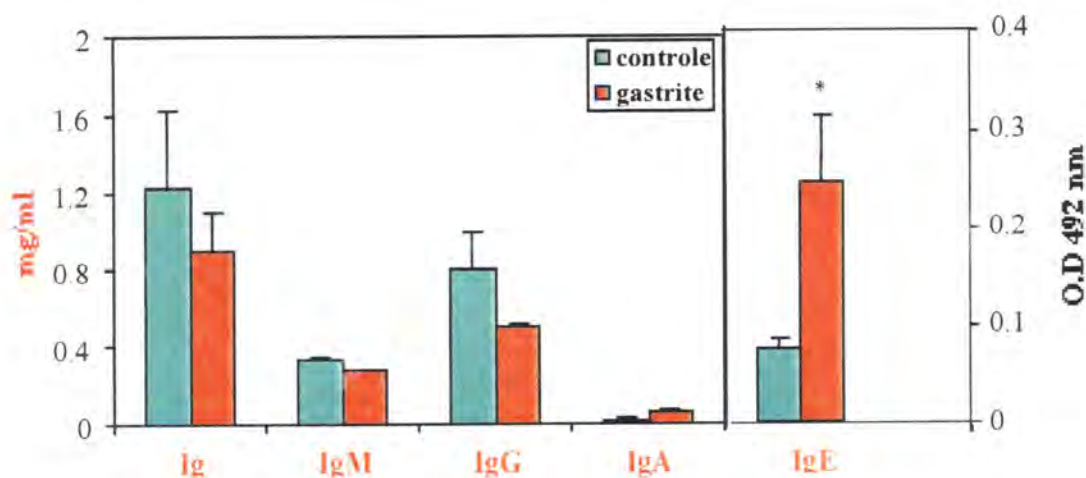
**III- Hipóteses explicativas para a diminuição da susceptibilidade à  
indução de tolerância oral nos animais com gastrite**

### III-1. Animais tornam-se atópicos após a indução de gastrite.

#### III.1.1. Animais com gastrite apresentaram um aumento nos níveis séricos de IgE total.

Como IgE é a imunoglobulina envolvida nos processos alérgicos, nós analisamos a produção, por ELISA, deste e de outros isotipos no soro de animais controle e com gastrite, 24 horas após a última administração de salina ou etanol, respectivamente.

Os animais com gastrite apresentam um significativo aumento nos níveis séricos de IgE total quando comparados com animais controle (Figura 22B). Nenhuma alteração significativa na concentração de imunoglobulinas totais (Ig) ou de qualquer outro isotipo analisado (IgG, IgM, IgA) é observada entre os grupos (Figura 22A).

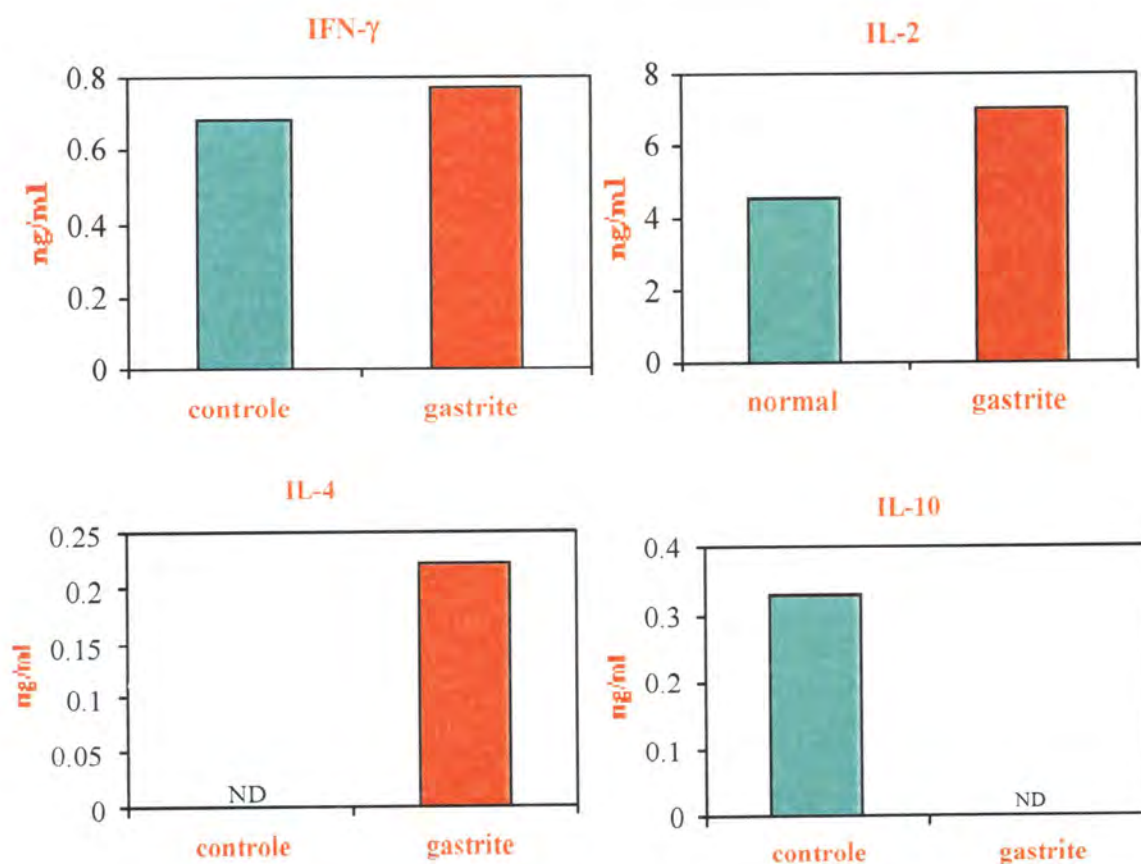


**Figura 22-** Concentração de imunoglobulinas séricas. O soro de camundongos controle e com gastrite foi coletado 24 horas após a última administração de salina ou etanol, e analisado por ELISA para a dosagem de imunoglobulinas totais (Ig) e dos subtipos IgM, IgG, IgA e IgE. Os resultados expressam a média  $\pm$  EP da concentração de Ig, IgM, IgG e IgA e do título de IgE de 5 camundongos por grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

### *III.1.2. Células do baço de animais com gastrite produzem IL-4 mas não IL-10.*

O baço é um dos principais sítios produtores de imunoglobulinas do corpo e um órgão importante na imunidade sistêmica. Como observamos uma alteração nos níveis séricos de IgE nos animais com gastrite e como as citocinas estão envolvidas no processo de troca de isotipos dos linfócitos B, analisamos o perfil de citocinas produzidos por células esplênicas. O baço foi retirado de animais controle e com gastrite 24 horas após o último tratamento com salina ou etanol, respectivamente. As células esplênicas foram cultivadas na presença de concanavalina A e o sobrenadante de cultura coletado para a medida, por ELISA, da presença de citocinas (IL-4, IL-10, IL-2 e IFN- $\gamma$ ).

A Figura 23 mostra que não há nenhuma diferença entre os grupos com relação à produção de IFN- $\gamma$ , mas parece ocorrer um aumento nos níveis de IL-2 em cultura de células do baço de animais com gastrite. Como utilizamos células cultivadas em pool por grupo, não podemos dizer se esse aumento é significativo. Entretanto, ocorre uma nítida diferença entre os grupos com relação à produção de IL-4 e IL-10. A presença de IL-4 somente é detectável, nas nossas condições experimentais, nas culturas de células do baço de animais com gastrite. Interessantemente, já havíamos observado também um aumento local de IL-4 no estômago de desses animais (ver Figura 10). Diferentemente dos animais controle, a produção de IL-10 por células do baço está completamente abolida nos animais com gastrite.



**Figura 23-** Análise da produção de citocinas por células do baço. Células isoladas do baço de camundongos controle e com gastrite, 24 horas após a última administração de salina ou etanol, foram colocadas em cultura e estimuladas com ConA. Os sobrenadantes das culturas foram dosados por ELISA para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-10. Os resultados expressam a concentração das citocinas de cada grupo de 5 camundongos.

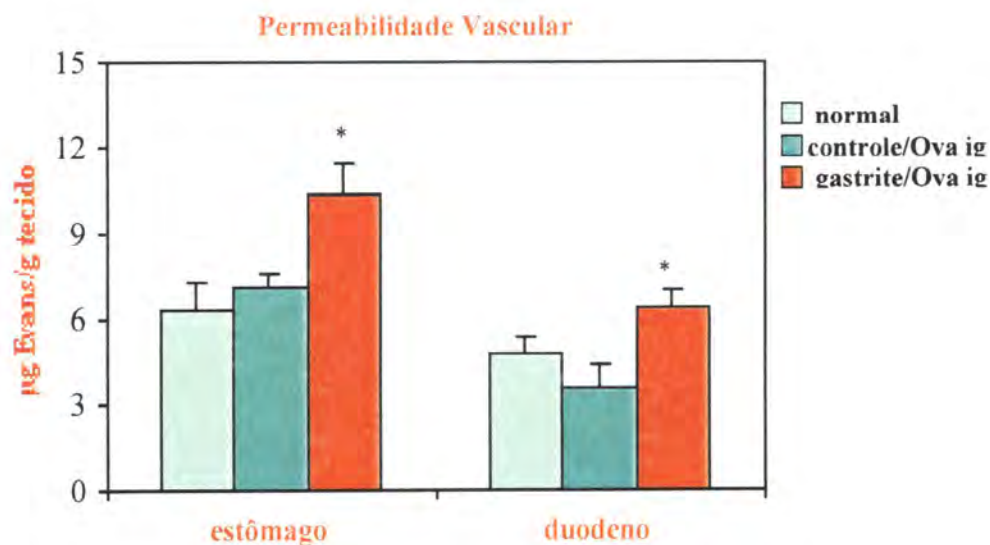
*III-2. Ova administrada por via oral se torna um potente alérgeno nos animais com gastrite.*

Realizamos, em seguida, alguns testes (descritos nos sub-ítems 2.1 e 2.2) para comprovar nossa hipótese de que os animais com gastrite estão sendo sensibilizados para uma resposta alérgica ao entrar em contato com a Ova por via oral.

*III-2.1. Aumento da permeabilidade vascular após o desafio oral com Ova no estômago de animais com gastrite previamente sensibilizados.*

Alterações na permeabilidade vascular são eventos iniciais no processo alérgico induzidas pela liberação de mediadores produzidos por mastócitos. Para essa análise, os animais controle e com gastrite receberam uma gavagem com 20 mg de Ova 24 horas após o último tratamento com salina ou etanol. Duas semanas depois, os animais receberam outra gavagem com 80mg de Ova e, após 20 minutos, uma injeção no plexo venoso ocular de um corante azul que cora proteínas plasmáticas (azul de Evans, 50mg/kg). Animais normais, que não receberam Ova em nenhum momento, serviram como controle do extravasamento basal nos tecidos. Estômago e duodeno foram retirados para a medida de alterações vasculares através da determinação, por absorvância, da concentração do corante extravasado para esses tecidos.

Observamos na Figura 24 que há um aumento significativo da quantidade de corante extravasada para o estômago e duodeno de animais com gastrite comparado com animais controle. Estes, por sua vez, apresentaram uma concentração de azul de Evans semelhante à obtida nos animais normais nos órgãos analisados.



**Figura 24-** Quantidade de azul de Evans extravasado no estômago e duodeno. Camundongos controle e com gastrite receberam, 24 horas após a última administração de salina ou etanol, uma gavagem com 20 mg de Ova diluída em 0,2 ml de salina. Após 14 dias foi administrado uma nova dose de Ova por gavagem (80 mg/ml) no grupo controle (Ova ig) e com gastrite (gastrite/Ova ig), uma hora antes desses animais juntamente com animais normais, receberem uma injeção no plexo venoso ocular com azul de Evans (50 mg/kg). Após 20 minutos os animais foram sacrificados e os órgãos retirados para dosagem por ELISA, da quantidade de corante detectada no tecido. Os resultados representam a média  $\pm$  EP de 3 camundongos por grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

*III-2.2. Animais com gastrite sensibilizados com Ova por via oral, desenvolvem aversão à ingestão de uma solução contendo o antígeno.*

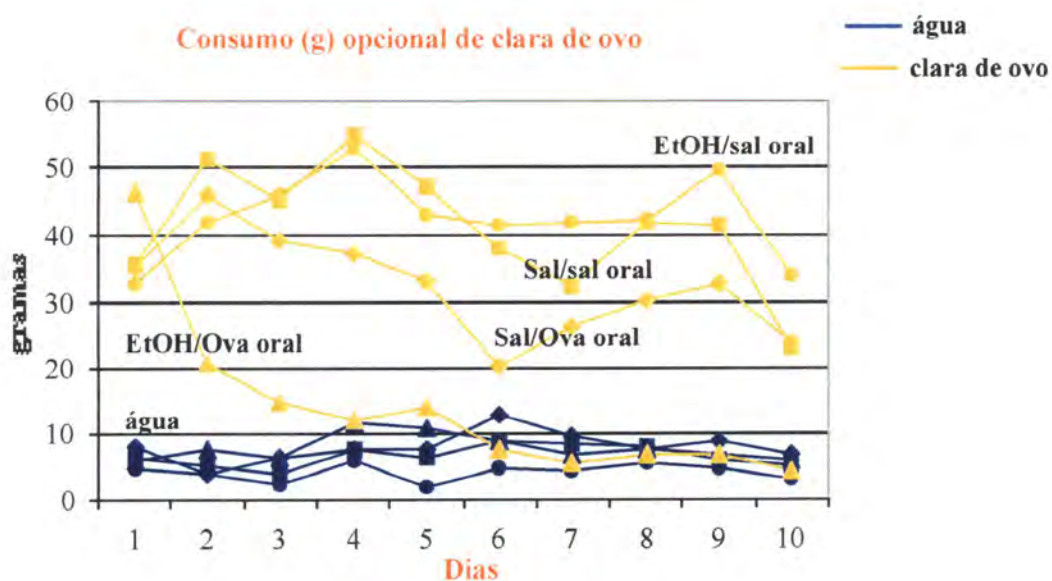
Já foi demonstrado que a rejeição de sabores (aversão) é um teste elucidativo de um evento alérgico e que essa rejeição está diretamente ligada à produção de anticorpos IgE específicos no soro.

Nesse experimento, animais receberam 24 horas após o último tratamento com salina (SAL) ou etanol (EtOH), uma gavagem de salina (originando os grupos: SAL/sal oral e EtOH/sal oral) ou 20 mg de Ova (grupos SAL/Ova oral e EtOH/Ova oral). Todos os animais foram expostos, 14 dias depois, a mamadeiras contendo soluções de água ou de clara de ovo (diluída 1:5) adocicada durante 10 dias. As soluções foram diariamente trocadas, as mamadeiras pesadas e o consumo diário analisado pela diferença do peso inicial e final das mamadeiras.

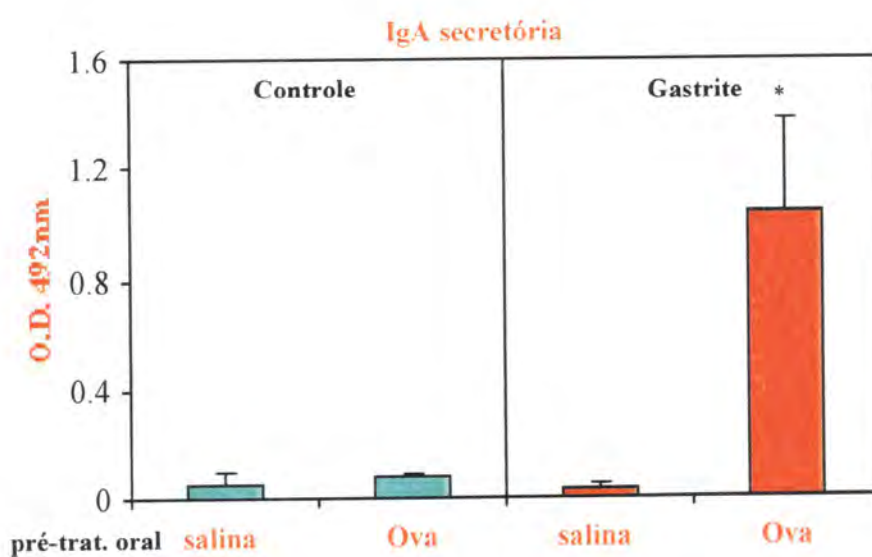
Notamos uma nítida rejeição ao consumo de clara de ovo a partir do segundo dia no grupo de animais com gastrite que foram previamente sensibilizados com Ova por via oral (EtOH/Ova oral) (Figura 25). Esses animais não aumentam o consumo de água mas diminuem significativamente o consumo de clara de ovo quando comparados com todos os demais grupos. Os animais com gastrite que não foram previamente expostos à Ova (EtOH/sal oral) mantêm um consumo elevado de clara de ovo durante todos os dias analisados. Os animais controle que receberam uma gavagem prévia com Ova (SAL/Ova oral) apresentaram uma oscilação no consumo de clara de ovo mas mantendo níveis ainda mais altos quando comparados com níveis apresentados pelo mesmo grupo nos animais com gastrite.

Interessantemente, observamos uma correlação da aversão com a produção de imunoglobulina local. Ocorre, nos animais apresentando aversão, um aumento de IgA secretória específica medida no lavado do intestino delgado coletado após 10 dias de consumo opcional (Figura 26).





**Figura 25-** Cinética do consumo de clara de ovo. Camundongos controle e com gastrite receberam, 24 horas após a administração de salina (SAL) ou etanol (EtOH), uma gavagem com 20 mg de Ova (Ova oral) ou salina (sal oral). Após 14 dias, foi oferecido aos animais água e uma solução de clara de ovo adocicada com sacarina. A quantidade de líquido ingerida em cada grupo de 5 camundongos foi determinada a cada 24 horas de exposição e expressa em gramas.

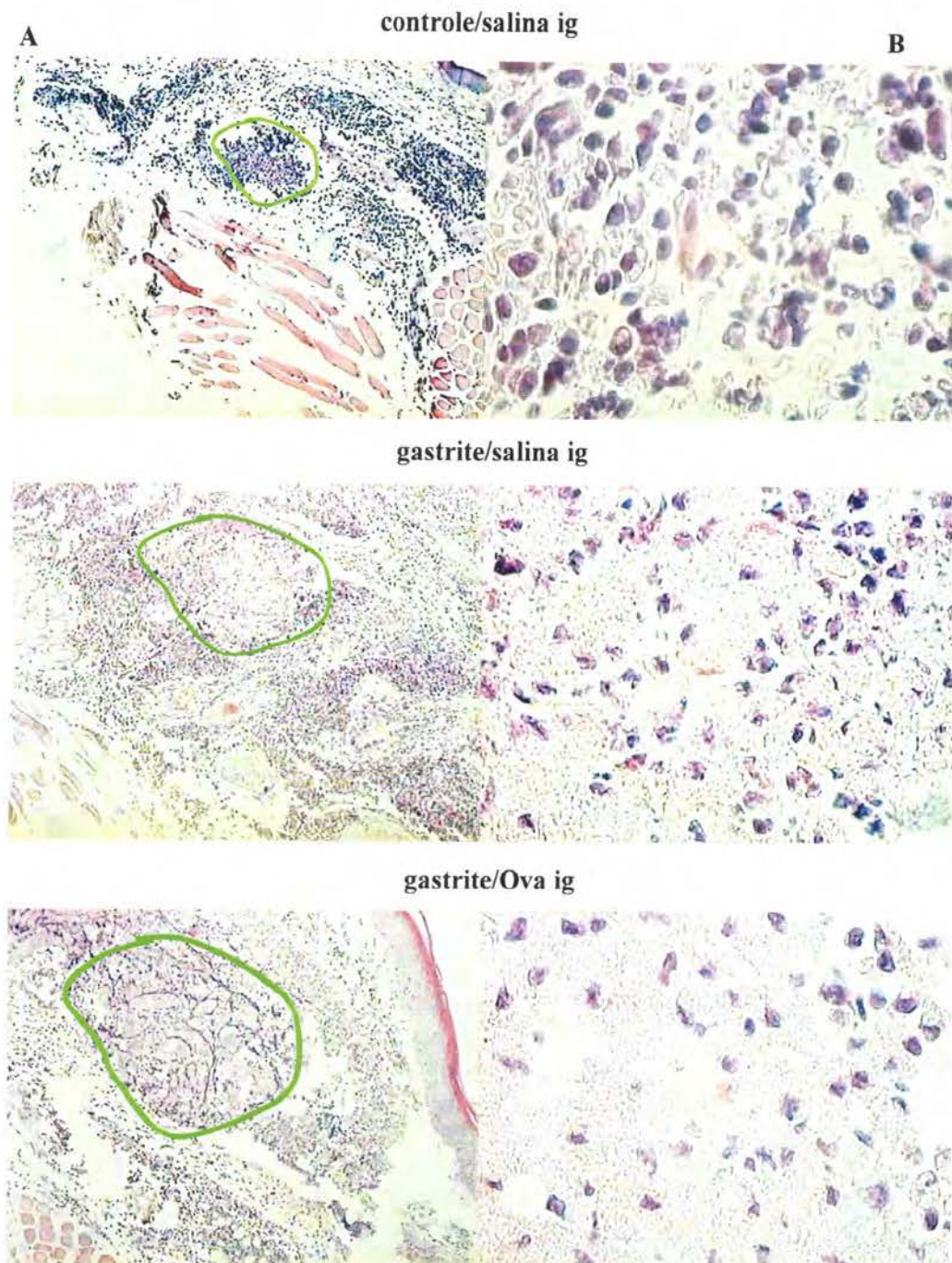


**Figura 26-** Título de IgA anti-Ova após consumo de clara de ovo. O muco do intestino de camundongos controle e com gastrite foi coletado no 10º dia de consumo de clara de ovo e analisado para a produção de IgA secretória anti-Ova por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$  EP da integral das densidades ópticas da curva de 8 diluições começando com muco total (fator 0,5; n= 5 camundongos). \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

### *III-3. A atividade dos macrófagos está alterada nos animais tratados com etanol.*

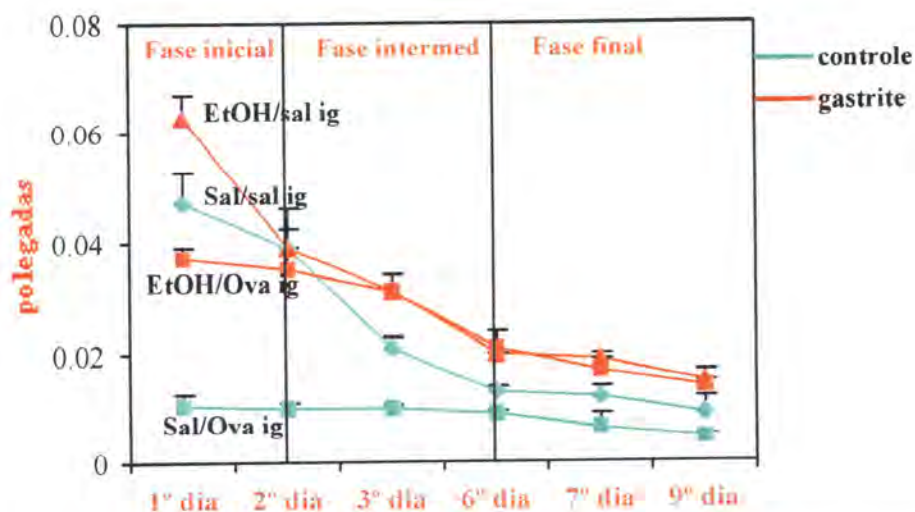
*III-3.1. Ocorre um atraso no clareamento da Ova da pata de animais com gastrite durante a reação de DTH.*

Nosso interesse em estudar atividades dos macrófagos se deve a uma observação importante no experimento de DTH quando analisávamos as características inflamatórias desencadeadas 72 horas após o desafio com Ova na pata (ver Figura 20). Nos animais com gastrite de ambos os grupos (salina ig e Ova ig), observamos a presença de um material proteico, róseo, rodeado por células inflamatórias (visto em detalhe na Figura 27, delimitado pela linha verde), sugestivo de que a proteína injetada não fora clareada pelos macrófagos locais. Nos animais controle, traços desse mesmo material pode ser observado somente no grupo imunizado mas quase completamente degradado.



**Figura 27-** Análise histológica da pata de camundongos controle e com gastrite 72 horas após o desafio local com Ova. **A**-visualização morfológica (100x) do coxim plantar demonstrando presença de material protéico (delimitado pela linha verde), visto em detalhe com aumento de 1000x (**B**).

Investigamos, em seguida, possíveis diferenças na resolução do processo inflamatório entre os grupos, medindo o tamanho do inchaço até um tempo mais prolongado (9 dias) após o desafio com Ova. A figura 28 mostra uma cinética da reação de DTH, onde observamos que o inchaço da pata diminui em todos os grupos, mas não na mesma velocidade. A cinética da reação de DTH nos permitiu dividir o gráfico em fases, sendo a inicial (entre o 1º e 2º dias), caracterizada principalmente por um intenso inchaço no primeiro dia após o desafio. No segundo dia, ocorre uma diminuição do inchaço apenas nos grupos imunizados, sendo que essa redução é brusca nos animais com gastrite e gradual nos animais controle. Na fase intermediária (entre o 2º e 6º dias), ocorre uma inversão do comportamento do inchaço entre os grupos imunizados demonstrado na fase inicial, sendo a redução mais drástica observada nos animais controle no terceiro dia. Os grupos imunizados e tolerizados de animais com gastrite apresentam o mesmo tamanho do inchaço no 3º dia, ainda significativamente maior que os animais controles imunizados. Já a fase tardia (entre o 6º e 9º dias) é caracterizada por uma resolução do processo inflamatório em todos os grupos.



**Figura 28-** Cinética da espessura da pata de camundongos controle e com gastrite após desafio local com Ova. Animais receberam, 24 horas após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), uma gavagem com 20 mg de Ova (Ova ig) ou somente salina (salina ig). Sete dias depois, todos os animais foram imunizados por via subcutânea, na base da cauda, com 40 µl de uma solução contendo 100 µg de Ova + CFA. Após 30 dias os animais recebem um desafio (sc) no coxim plantar esquerdo com 30 µl de Ova desnaturada ou somente 30 µl de salina no coxim direito, e o tamanho do inchaço medido até 9 dias. Os resultados expressam a média ± EP da diferença entre a medida da pata esquerda e a direita (por dia) em 5 animais de cada grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

A diferença no tamanho do inchaço, principalmente na fase intermediária, sugere uma deficiência no clareamento do antígeno na pata dos animais com gastrite. Essa hipótese também é suportada pela análise histológica mostrando a permanência de Ova no local. Como macrófagos são as principais células envolvidas no clareamento de antígenos nesse tipo de processo inflamatório, nosso próximo objetivo foi investigar um possível efeito do processo inflamatório sobre atividades de macrófagos.

### *III-3.2. O tempo de fagocitose está drasticamente alterado nos animais com gastrite.*

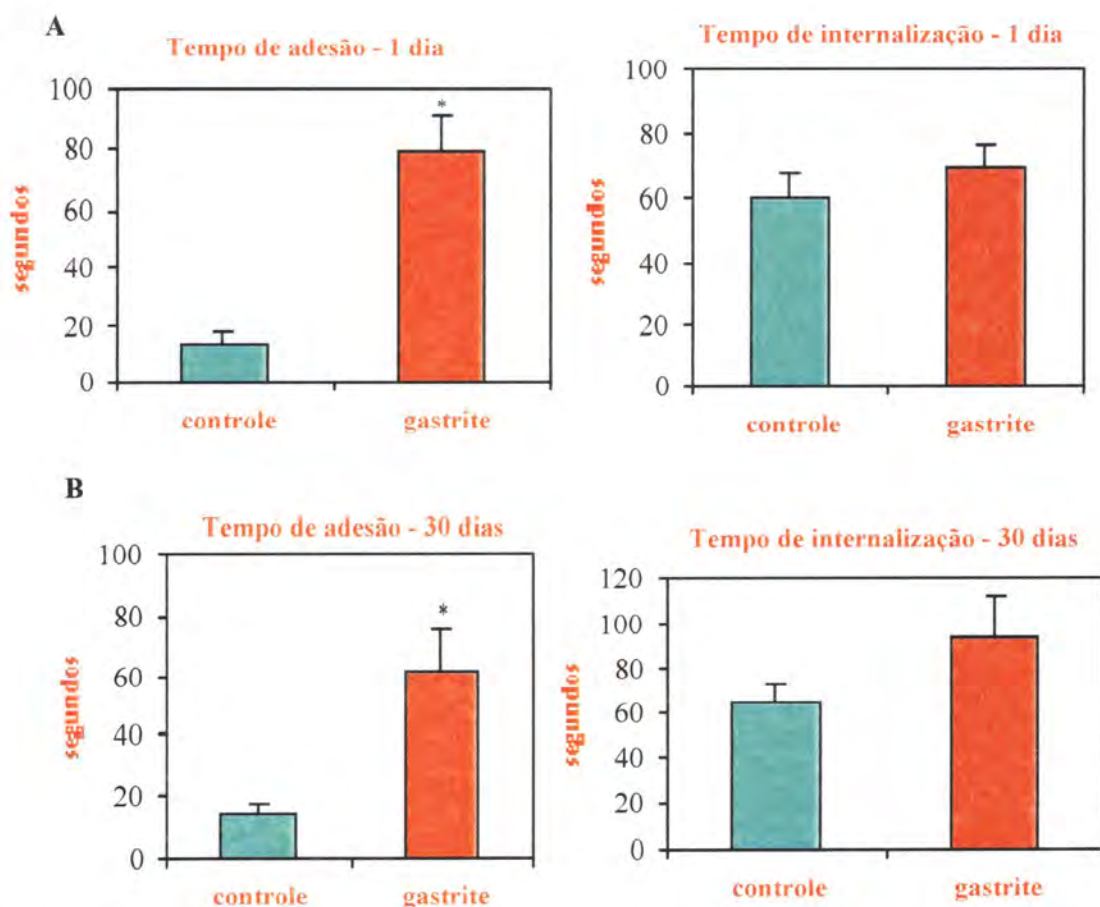
A fagocitose foi analisada por seu papel importante em eventos gerais da atividade de macrófagos, como o clareamento de partículas. Além disto, eventos fisiológicos como a tolerância envolvem atividades de endocitose e processamento de antígenos realizados por células apresentadoras profissionais como os macrófagos.

Escolhemos coletar os macrófagos em dois tempos após o último tratamento com etanol: a) um tempo inicial (1 dia), por ser um momento crucial do processo inflamatório e o também o período em que realizamos o tratamento oral com Ova para indução de tolerância; b) um tempo tardio (30 dias) que nos permitira verificar um efeito prolongado do processo inflamatório sobre atividades dos macrófagos. A escolha desse tempo de 30 dias não foi aleatória; ela se baseou no resultado do clareamento da Ova nos animais com gastrite durante a reação de DTH. Essa reação foi induzida mais de 30 dias após a indução de gastrite.

Para avaliarmos o tempo de fagocitose, os macrófagos foram coletados do peritônio 1 ou 30 dias após a administração de etanol ou salina, aderidos em lamínulas e colocados em contato com zimosan não opsonizado (utilizado como estímulo fagocítico), pela utilização de uma pinça óptica. Um sistema de geração de imagens acoplado a um microscópio óptico, permite acompanhar e filmar o processo de fagocitose. A fita produzida foi analisada posteriormente e os tempos do processo de fagocitose foram expressos graficamente. O tempo de fagocitose foi subdividido em tempo de adesão da partícula na superfície do macrófago (após a retirada da pinça), e em tempo de internalização, que se refere ao intervalo entre o englobamento da partícula de zimosan até a sua localização no citoplasma do macrófago.

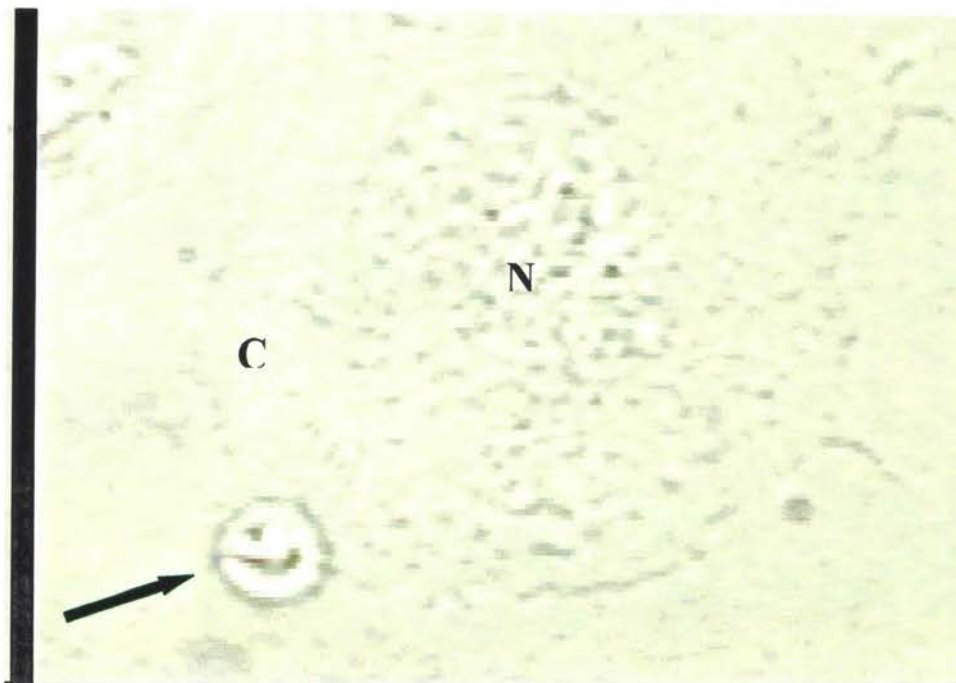
A Figura 29A mostra que macrófagos coletados um dia após o tratamento com etanol apresentam um aumento marcante (aproximadamente de 4 vezes) no tempo de adesão do zimosan quando comparado com animais controle. Em alguns macrófagos, esse tempo chega a 7 e 14 minutos (resultados não incluídos na média do grupo para não aumentar o desvio padrão). Não observamos nenhuma alteração no tempo de internalização do zimosan entre os grupos. O tempo de adesão se mantém aumentado nos macrófagos de animais com gastrite coletados um mês após o tratamento com etanol quando comparado com macrófagos de animais controle (Figura 29B). Entretanto, essa alteração é menos drástica que aquela observada na figura 29A. A Figura 30 é demonstrativa da imagem obtida pela filmagem.

Esses resultados mostraram que os macrófagos dos animais com gastrite apresentam uma alteração prolongada em uma etapa inicial do processo de fagocitose.



**Figura 29-** Análise da fagocitose de macrófagos através do tempo de adesão e de internalização do zimosan. Células peritoneais enriquecidas de macrófagos foram coletadas de camundongos controle e com gastrite, um **(A)** ou trinta dias **(B)** após a última administração de salina ou etanol. Um *pool* de macrófagos de cada grupo foi aderido em laminulas, a fagocitose filmada e analisado os tempos de adesão e internalização de uma partícula de zimosan. Os resultados expressam a média  $\pm$  EP dos tempos obtidos para 5 macrófagos de cada grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)



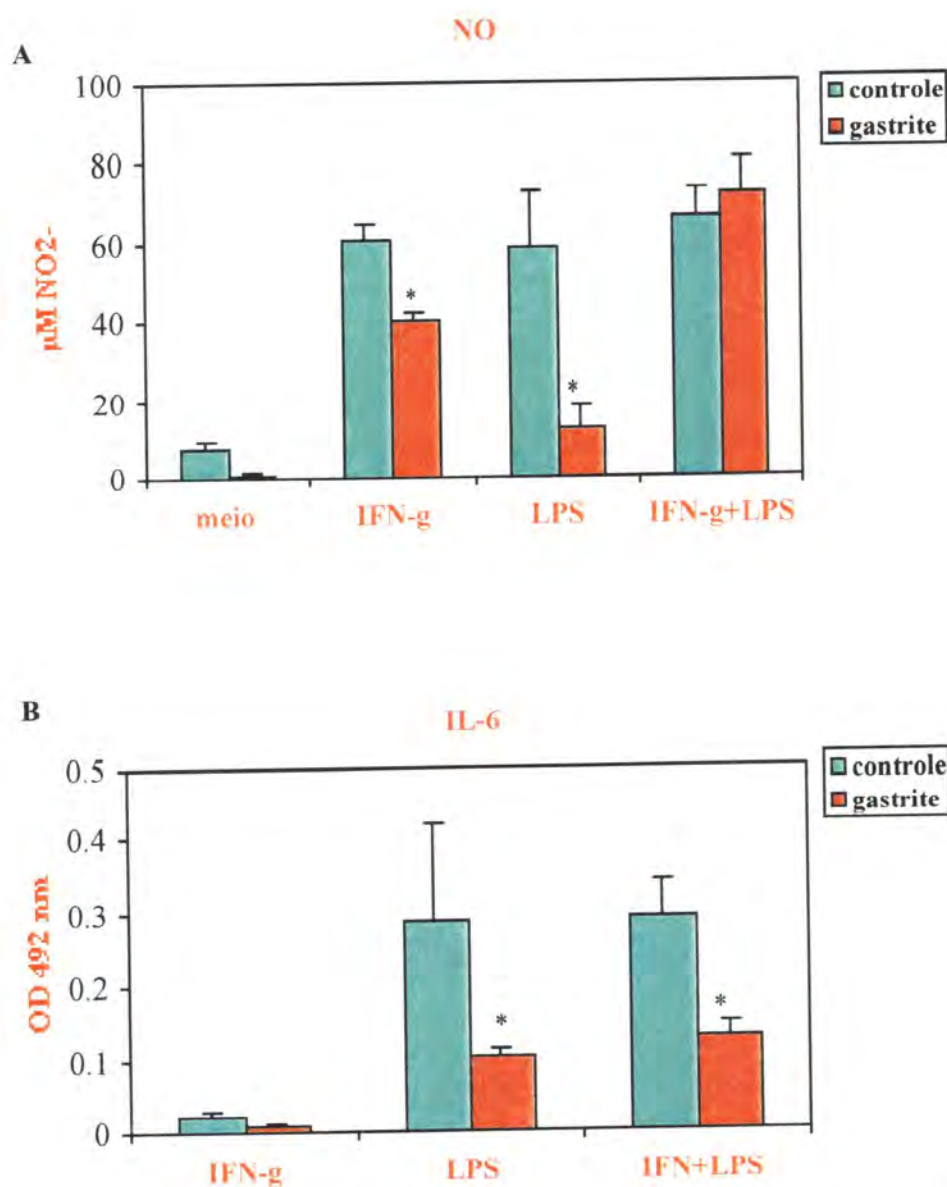


**Figura 30-** Foto da imagem obtida através da filmagem de macrófagos. A seta aponta uma partícula de zimosan aderida na membrana do macrófago. O núcleo (N) e o citoplasma (C) da célula estão indicados.

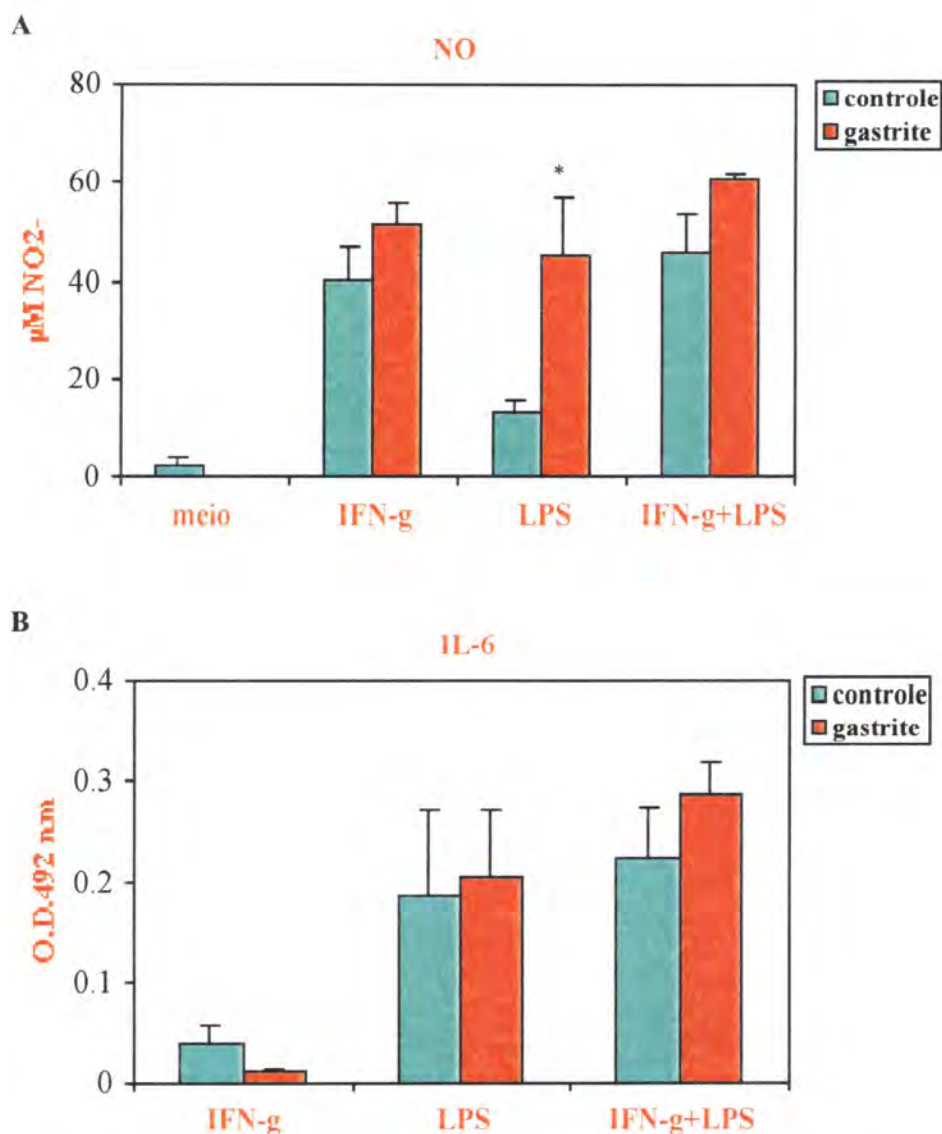
*III-3.3. Atividades efetoras de macrófagos, como produção de NO e IL-6, estão diminuídas 1 dia após a indução de gastrite mas essas atividades estão recuperadas 30 dias depois.*

Estudamos a atividade efetora de macrófagos pela produção de IL-6 e NO, importantes mediadores de processos inflamatórios. Macrófagos foram coletados da mesma maneira descrita no ítem anterior, colocados em cultura e estimulados com agentes inflamatórios, como IFN- $\gamma$  e LPS, e o sobrenadante de cultura foi coletado 72 horas depois para a medida da concentração de IL-6 por ELISA e da produção de NO pela medida da produção de nitrito ( $\text{NO}^2^-$ ) através da reação de Griess. A Figura 31 mostra que há uma nítida diminuição na produção de NO (A) e IL-6 (B), independente do estímulo, por macrófagos de animais com gastrite, coletados 1 dia após o último tratamento com etanol. Em relação à produção de NO, a redução mais drástica foi observada após o estímulo com LPS.

Na figura 32(B) observamos que não há diferença entre os grupos em relação à produção de IL-6 (independente do estímulo) por macrófagos de animais com gastrite, coletados 30 dias após o último tratamento com etanol. Um aumento na concentração de NO (figura 32A) foi detectado no sobrenadante de cultura de macrófagos de animais tratados com gastrite, quando comparado com animais controle, após estímulo com LPS.



**Figura 31-** Produção de NO e IL-6 por macrófagos peritoneais em um tempo inicial após a indução de gastrite. Células peritoneais enriquecidas de macrófagos foram coletadas de camundongos controle e com gastrite, um dia após a última administração de salina ou etanol. As células foram incubadas durante 3 horas, para aderirem os macrófagos, e após esse tempo estimuladas com IFN- $\gamma$ , LPS, IFN- $\gamma$ +LPS ou somente meio. Após 72 horas foi coletado o sobrenadante de cultura para dosar a produção de NO (**A**) pela reação de Griess e IL-6 (**B**) por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  EP da concentração de nitrito (**A**) e dos níveis de IL-6 (**B**), já descontados o valor do meio, para 5 camundongos de cada grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)



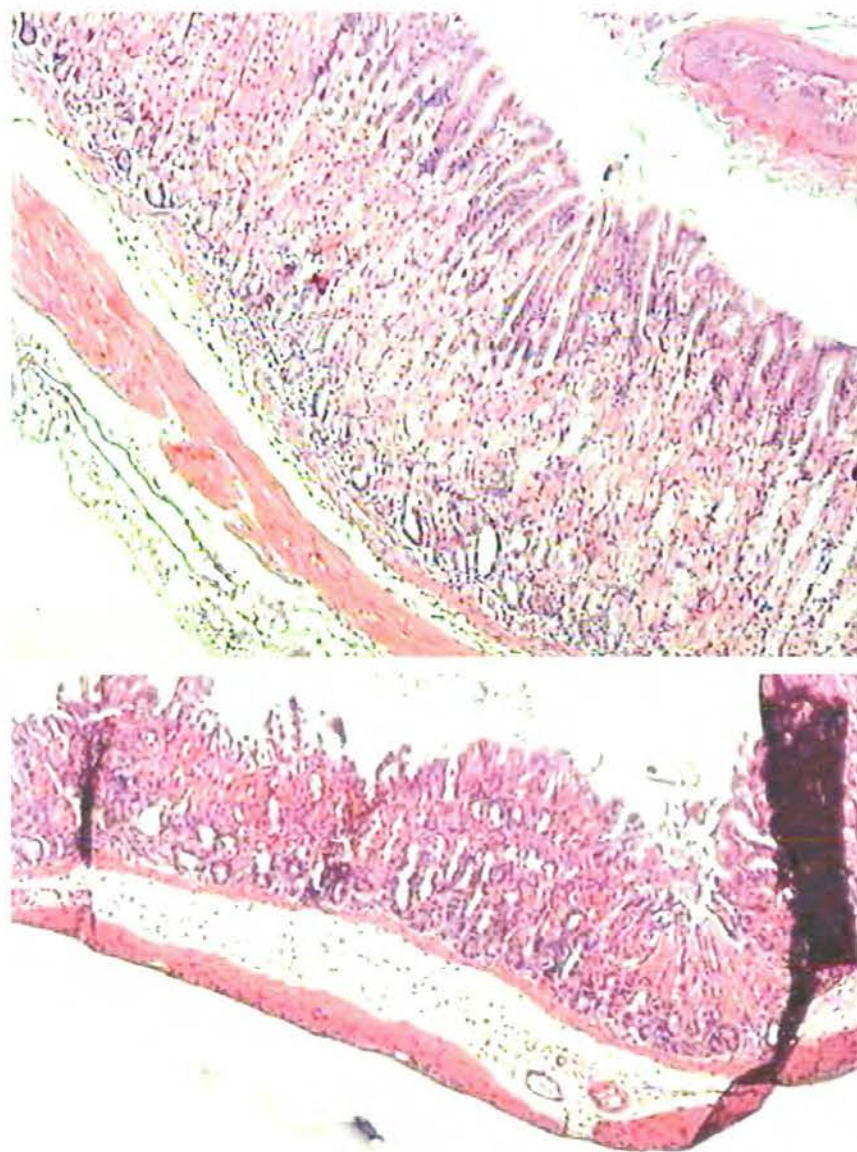
**Figura 32-** Produção de NO e IL-6 por macrófagos peritoneais em um tempo tardio após a indução de gastrite. Células peritoneais enriquecidas de macrófagos foram coletadas de camundongos controle e com gastrite, trinta dias após a última administração de salina ou etanol. As células foram incubadas durante 3 horas, para aderirem os macrófagos, e após esse tempo estimuladas com IFN- $\gamma$ , LPS, IFN- $\gamma$ +LPS ou somente meio. Após 72 horas foi coletado o sobrenadante de cultura para dosar a produção de NO (**A**) pela reação de Griess e IL-6 (**B**) por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  EP da concentração de nitrito (**A**) e dos níveis de IL-6 (**B**), já descontados o valor do meio, para 5 camundongos de cada grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

**IV- Demonstração da abrangência dos efeitos inflamatórios da gastrite  
sobre a tolerância oral**

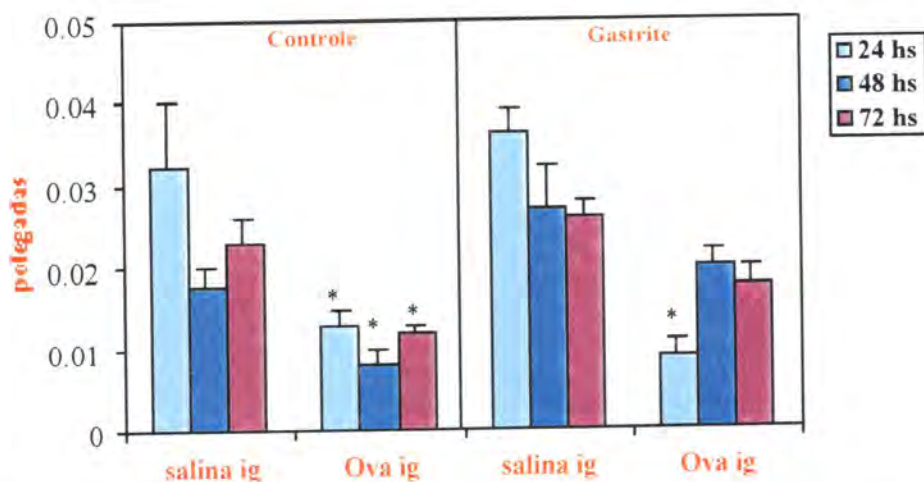
*IV-1. Alterações inflamatórias após a indução de gastrite são suficientes para tornar refratários animais geneticamente selecionados para alta susceptibilidade à indução de tolerância oral para Ova.*

Nesse experimento, animais altamente susceptíveis à indução de tolerância oral para Ova (ST), selecionados geneticamente pelo método bidirecional artificial (desenvolvidos pelo prof. Antônio Carlos da Silva, UERJ), foram analisados para a capacidade de desenvolverem tolerância após a indução de gastrite. A tolerância foi analisada pela reatividade celular *in vivo* (Figura 34) utilizando a reação de DTH como parâmetro inflamatório. Escolhemos esse parâmetro por ser um dos mais sensíveis à indução de tolerância oral.

Inicialmente analisamos se o método utilizado para induzir gastrite em camundongos C57BL/6 seria aplicável aos camundongos ST. A figura 33 mostra que um processo inflamatório semelhante ao dos animais C57BL/6 foi desencadeado na mucosa gástrica dos animais ST após o tratamento com etanol. Diante desse resultado, os animais foram submetidos ao protocolo para indução de DTH para análise da tolerância oral. Semelhante ao que observamos nos camundongos C57BL/6 (Figura 20), a figura 34 mostra que, nos animais ST com gastrite, ocorre uma supressão da reatividade celular no grupo tolerizado (Ova ig) quando comparado com o controle ímune (salina ig). Entretanto, essa diferença não foi mantida 48 e 72 horas após o desafio



**Figura 33-** Análise histológica do estômago de camundongos ST. Visualização (100x) da mucosa gástrica de camundongos controle (foto de cima) e gastrite (foto de baixo) 24 horas após a última administração de salina ou etanol.



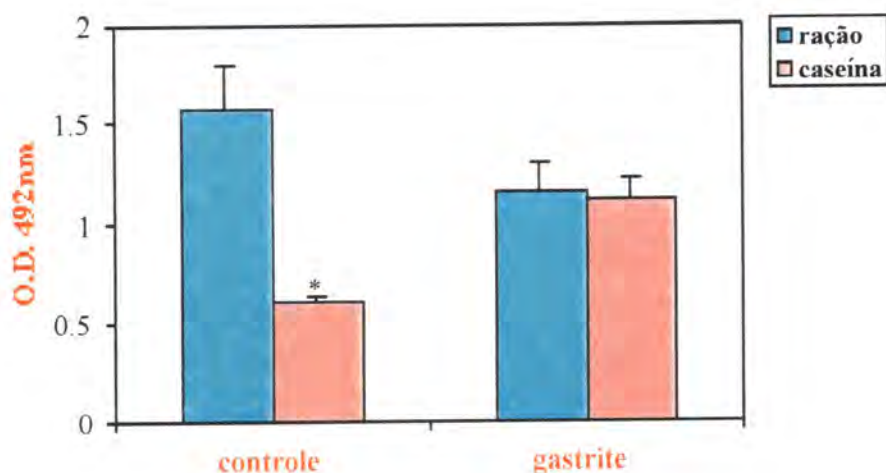
**Figura 34-** Espessura da pata em camundongos TS controle e com gastrite após desafio local com Ova. Animais receberam, 24 horas após a última administração de salina (controle) ou etanol (gastrite), uma gavagem com 20 mg de Ova (Ova ig) ou somente salina (salina ig). Sete dias depois, todos os animais foram imunizados por via subcutânea, na base da cauda, com 40  $\mu$ l de uma solução contendo 100  $\mu$ g de Ova + CFA. Após 30 dias os animais recebem um desafio (sc) no coxim plantar esquerdo com 30  $\mu$ l de Ova desnaturada ou somente 30  $\mu$ l de salina no coxim direito, e após 24, 48 e 72 horas foi medido o tamanho do inchaço. Os resultados expressam a média  $\pm$  EP da diferença entre a medida da pata esquerda e a direita em 5 animais de cada grupo. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)



*IV-2. As alterações inflamatórias desencadeadas nos animais com gastrite foram capazes de quebrar a tolerância oral já estabelecida para proteínas da dieta.*

Demonstramos que o processo inflamatório gerado após a indução de gastrite interfere na indução de tolerância oral para uma nova proteína (ausente da dieta). Nosso próximo passo foi investigar se a tolerância oral já estabelecida, como por exemplo, para uma proteína da dieta dos animais estaria também afetada. Para isto, camundongos C57BL/6 foram alimentados desde o desmame (3-4 semanas) até o final dos experimentos com uma dieta contendo 15% de caseína como única fonte proteica. Na idade de 8 semanas, os animais alimentados com a dieta experimental (caseína) ou com ração comercial (ração) foram tratados com etanol ou salina e desafiados 7 dias depois com caseína por via sistêmica. Em seguida, o soro foi coletado e a produção de anticorpos específicos anti-caseína foi medida por ELISA. Animais alimentados com ração constituíram o grupo controle imune e os animais alimentados com a dieta de caseína, o grupo controle tolerante.

A figura 35 mostra que, nos animais com gastrite, a tolerância já estabelecida para uma proteína da dieta foi abolida. Analisando os animais alimentados com dieta de caseína com gastrite, observamos que há um aumento no nível de anticorpos específicos quando comparados com os animais controle. Interessantemente, ocorre também uma redução da reatividade imune sistêmica contra a caseína nesses animais.



**Figura 35-** Anticorpos anti-caseína em camundongos imunizados e tolerizados. Camundongos C57BL/6 alimentados desde o desmame (4 semanas) com uma dieta composta de caseína ou ração comercial, receberam, na idade de 8 semanas, quatro administrações de etanol 50% para indução de gastrite ou somente salina (controle). Todos os animais foram imunizados com 100  $\mu\text{g}$  de caseína + 3 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 100  $\mu\text{g}$  de caseína em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Os soros coletados 7 dias após a última imunização foram dosados por ELISA para medir a produção de anticorpos anti-caseína. Os resultados representam a média  $\pm$  EP da integral das densidades ópticas da curva de 8 diluições, começando com 1:100 (fator 0,5 ; n= 5 camundongos) \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)

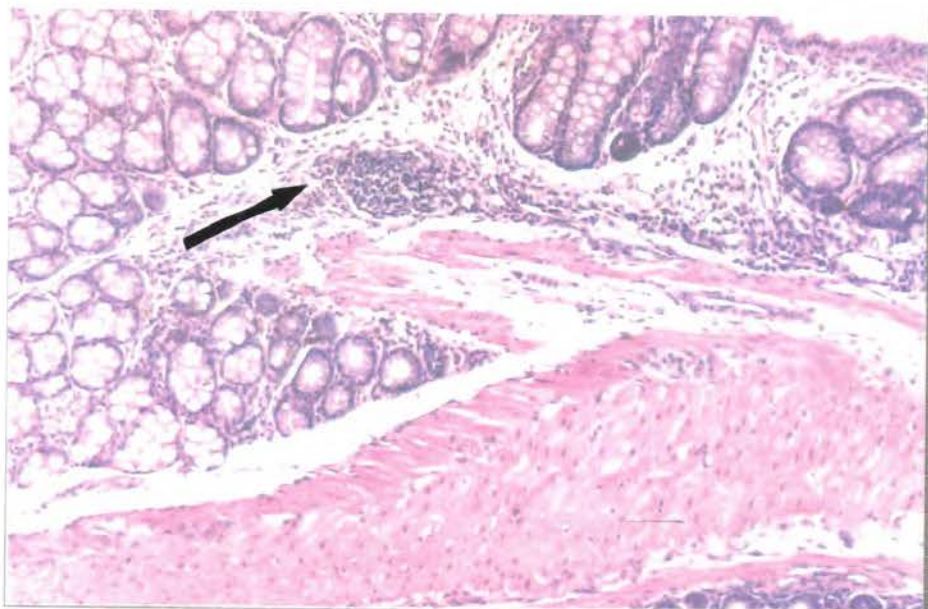
A indução de um processo inflamatório no estômago interfere de forma abrangente na tolerância oral. Nosso próximo objetivo foi analisar se alterações inflamatórias no intestino grosso, um local onde está localizado a maior parte da microbiota, também poderiam interferir no processo de indução de tolerância oral para Ova.

**Parte V- Efeito de processos inflamatórios no intestino grosso sobre a  
indução de tolerância oral.**

*V-1. Colite é induzida após o tratamento intrarectal com etanol.*

Para induzir colite, camundongos BALB/c receberam duas administrações intrarectais de 0.2 ml de etanol 50% ou salina (controle), sendo o intervalo entre as administrações de 5 dias. Três dias após, os animais foram sacrificados e foram retirados o intestino grosso, o intestino delgado e o estômago para análise histológica.

Os animais tratados com etanol desenvolveram uma reação inflamatória em regiões distais do cólon (Figura 36). Nesses animais, o infiltrado inflamatório constituído de células mononucleares e alguns polimorfonucleares altera a integridade da mucosa colônica e forma agregados de células (seta). Alguns pontos erosivos discretos foram observados na região (não mostrados na foto). Nenhuma alteração histológica foi observada no estômago ou no intestino delgado desses animais (dados não mostrados).

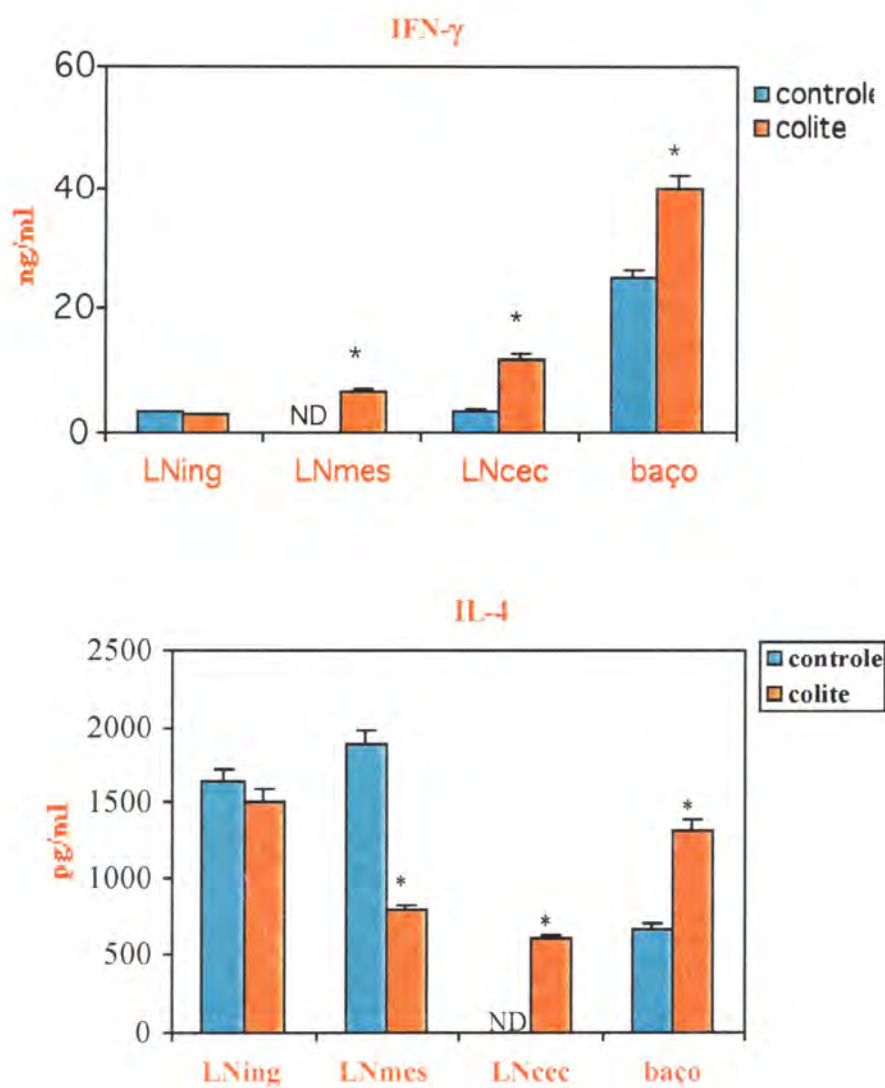


**Figura 36-** Análise histológica do intestino grosso. Visualização da mucosa colônica de camundongos BALB/c tratados por via intrarectal com salina (**foto de cima**, aumento 40x) ou etanol (**foto de baixo**, aumento 100x). Seta aponta agregado de células.

*V-2. Alterações no perfil de citocinas nos linfonodos de drenagem do intestino delgado e grosso e no baço após a indução de colite.*

Analisamos, em seguida, a produção de citocinas por células do baço, de linfonodos de drenagem do intestino (mesentérico e cecal), e de drenagem sistêmica (inguinal). Esses órgãos foram retirados 3 dias após o desafio intrarectal com salina ou etanol, as células foram colocadas em cultura e o sobrenadante de cultura foi coletado para medida de citocinas por ELISA.

Observamos na figura 37 que, com relação à produção de citocinas nos linfonodos, o tratamento intra-retal com etanol tem repercussão não somente no intestino grosso mas também no intestino delgado, demonstrado pelo aumento na produção de IFN- $\gamma$  nos linfonodos cecal e mesentérico. Também pôde ser observada uma repercussão sistêmica do tratamento com etanol refletida no aumento da produção de IFN- $\gamma$  por células do baço. A produção de IL-4 está aumentada no linfonodo cecal e baço, mas reduzida no linfonodo mesentérico.



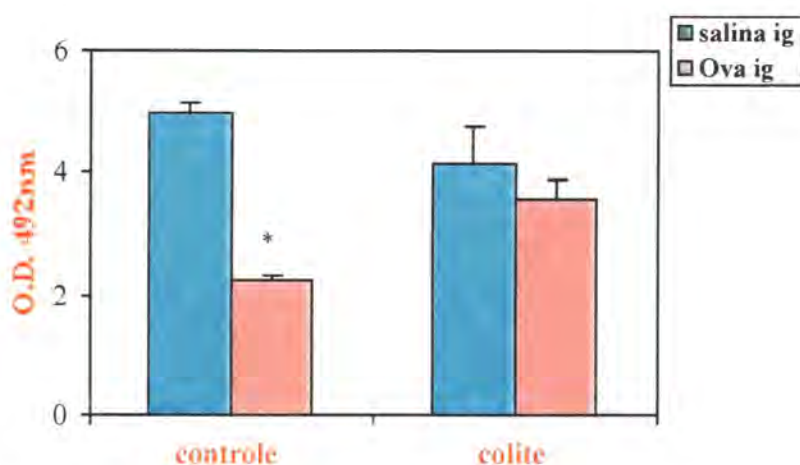
**Figura 37-** Análise da produção de citocinas em diferentes órgãos. Células isoladas de linfonodos inguinal (LNing), mesentérico (LNmes), cecal (LNcec) e do baço de camundongos controle e com colite, 3 dias após a última administração intrarretal de salina ou etanol, foram colocadas em cultura e estimuladas com ConA. Os sobrenadantes das culturas foram dosados por ELISA para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4. Os resultados expressam a concentração das citocinas de cada grupo de 5 camundongos. \* $p < 0.05$  (Teste t *Student* bicaudal)



V-3. Animais com colite se tornam refratários à indução de tolerância oral para Ova.

Animais normais e com colite receberam, 3 dias após o desafio intrarretal, uma gavagem com 20 mg de Ova (Ova ig) ou salina (salina ig). Posteriormente, os animais foram desafiados por via sistêmica com Ova e sangrados para análise dos níveis de anticorpos específicos por ELISA.

Na figura 38 podemos observar que animais controle que receberam a Ova por via oral (Ova ig) tornaram-se tolerantes à imunização parenteral com Ova quando comparados com o grupo controle (salina ig). Observamos uma supressão na produção de anticorpos específicos nos animais controle. Entretanto, nos animais com colite, não há uma diferença no título de anticorpos entre os grupos (salina ig e Ova ig).



**Figura 38-** Produção de anticorpos anti-Ova em camundongos imunizados e tolerizados após a indução de colite. Animais receberam, 3 dias após a última administração intrarretal de salina (controle) ou etanol (colite), uma gavagem com salina (salina ig) ou 20 mg de Ova em 0,2 ml de salina (Ova ig), 7 dias antes da imunização primária com 10 µg de Ova + 3 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10 µg de Ova em 0,2 ml de salina por via peritoneal. Os soros coletados 7 dias após a última imunização foram dosados por ELISA para medir a produção de anticorpos anti-Ova. Os resultados representam a média ± EP da integral das densidades ópticas da curva de 8 diluições começando com 1:100 ( fator 0,5 ; n= 5 camundongos) \*p<0.05 (Teste t *Student* bicaudal)

---

**DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

A mucosa do trato gastrointestinal apesar de contígua, desde a boca até o reto, apresenta-se funcionalmente distinta em diferentes órgãos do sistema digestivo. No estômago, as células epiteliais têm uma função de barreira, impedindo a entrada de microorganismos para o tecido gástrico, sendo auxiliadas pela grande quantidade de material mucoso aderido à sua superfície. Há uma grande diversidade morfológica entre elas, mas todas apresentam características de células secretoras. As principais substâncias produzidas nesse local, como proteases e HCl, estão envolvidas no processo de digestão alimentar. A *lamina propria* (LP) do estômago é escassa e formada basicamente por células típicas de tecido, tais como fibroblastos, fibrócitos, macrófagos residentes e mastócitos, e por alguns linfócitos (Robins, et al., 1994). Ao contrário, a LP do intestino é fisiologicamente povoada por células do sistema imune, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos T, B e plasmócitos. Essas células fazem parte do tecido linfóide associado ao intestino, denominado GALT. Além disso, as células epiteliais do intestino apresentam características absorptivas seletivas, permitindo a entrada de proteínas, no intestino delgado, de água e alguns íons, no intestino grosso, e impedindo a entrada de patógenos (Stevens and Lowe, 1995) (Robins, et al., 1994).

Diariamente uma grande quantidade de proteínas da dieta e produtos derivados da microbiota indígena entram em contato com o tecido linfóide das mucosas (Gordon, 1961, Husby, et al., 1985). Entretanto, essa ativação constante do sistema imune da mucosa intestinal não resulta em inflamação mas em assimilação dos antígenos que entram no organismo pela via oral, um evento conhecido como tolerância oral (Faria and Weiner, 1999). A indução e manutenção dessa homeostase imunológica no intestino depende de vários eventos regulatórios iniciados na superfície das mucosas; portanto, sua integridade é um fator fundamental nesse processo. Há uma vasta literatura demonstrando que várias patologias intestinais em humanos, classificadas como doenças inflamatórias do intestino (IBD), que acometem uma representativa parcela da população em muitos países, são resultado de uma perturbação em mecanismos regulatórios na mucosa intestinal (Strober, et al., 2002).

Nosso trabalho demonstrou que, apesar de não ser um local de absorção proteica e nem apresentar um rico tecido linfóide associado, a integridade das mucosas do estômago e do intestino grosso são também fundamentais para a indução de tolerância

oral. Alterações inflamatórias resultantes do tratamento com álcool, independente do local onde elas sejam desencadeadas, interferem em eventos fisiológicos locais e sistêmicos, levando a uma reatividade imunológica exarcebada contra antígenos que seriam normalmente tolerados.

Realizamos um estudo sistematizado sobre o papel de alterações inflamatórias desencadeadas pela administração de álcool na indução de tolerância oral.

### **Os efeitos do álcool e da gastrite na indução de tolerância oral**

A integridade da mucosa gástrica é mantida devido a um balanço entre fatores agressivos, de origem endógena (HCl, pepsina) ou exógena (drogas anti-inflamatórias não esteróides, álcool), e mecanismos regulatórios (Abdel-Salam, et al., 2001). A gastrite é uma patologia mundialmente comum, que apresenta um amplo espectro histopatológico, definida como uma alteração inflamatória na mucosa gástrica resultante da perda desse equilíbrio (Dixon, et al., 1996). Experimentalmente, pode-se induzir gastrite pela administração de drogas anti-inflamatórias, substâncias ácidas como ácido acético, agentes lesivos como o álcool ou agentes infecciosos como o *Helicobacter pylori*. Também pode-se induzir gastrite autoimune através da deleção de emigrantes tímicos CD4CD25+ (Sakaguchi, et al., 1995). Escolhemos o álcool como agente lesivo pelo fato de ser uma substância amplamente consumida pela população e por seus conhecidos efeitos sobre o sistema imune (Rimland, 1984) (Sibley, et al., 2001).

Numa primeira etapa, estabelecemos um modelo rápido e facilmente reprodutível de gastrite induzido pela administração de etanol 50%, caracterizado por várias alterações inflamatórias locais e sistêmicas. Aproximadamente 80% dos animais com gastrite sobreviviam durante a realização de experimentos prolongados. Apesar de não analisarmos endotoxemia, é possível que a translocação de bactérias presentes no estômago, como *Helicobacter muridarum*, facilitada pelas alterações na barreira epitelial, tenham um papel importante na potencialização do quadro inflamatório local e sistêmico. Algumas características nos permitiram classificar o processo inflamatório como agudo, devido à presença de neutrófilos, edema e a completa resolução do processo inflamatório no estômago uma semana depois da indução de gastrite (dados não mostrados). Os animais apresentaram anemia, demonstrada por uma redução no número de eritrócitos no sangue, que se iniciou uma semana após o último tratamento com etanol. Esse estado anêmico pode ser resultante da diminuição da produção do

fator intrínseco produzido pelas células parietais devido à atrofia da mucosa gástrica. Sabe-se que esse fator é importante para a absorção da vitamina B12 no íleo que, por sua vez, está envolvida na formação de hemácias na medula óssea (Robins, et al., 1994). Os animais tratados com etanol apresentaram alterações morfológicas restritas ao estômago, preservando a integridade da mucosa intestinal, demonstrado pela análise histológica e pela contagem de IELs e células totais da *lamina própria*. Utilizamos a contagem de células da LP e IELs por ser um parâmetro muito mais sensível para a avaliação de possíveis eventos inflamatórios no intestino. Como o intestino delgado é um órgão onde mecanismos imuno-regulatórios potentes estão em constante operação, em vários modelos de enterite, a única alteração inflamatória mensurável é um aumento no número dessas células (Mowat, et al., 1982).

É provável que o estômago seja um local primário de absorção de álcool e a perda da integridade da mucosa gástrica após o primeiro contato com essa substância, tenha facilitado uma entrada ainda maior de álcool nas administrações posteriores. Sabe-se que o etanol não é somente oxidado no fígado, mas também no trato gastrointestinal pela ADH (álcool desidrogenase) encontrada na célula epitelial. Seitz e colaboradores mostraram que o metabolismo do álcool no estômago é extremamente importante na gravidade da injúria na mucosa gástrica. Além disso, o metabolismo do etanol pela ADH gástrica influencia a concentração de etanol na circulação sistêmica (Seitz, et al., 1994). O fato de não observarmos alterações inflamatórias no fígado nem no intestino e a baixa concentração de etanol no sangue em tempos imediatamente posteriores à administração, sugerem que o etanol tenha sido metabolizado principalmente no estômago. O impacto de uma concentração elevada de etanol sobre a mucosa gástrica induziu uma série de alterações locais e sistêmicas. Em nosso modelo, não podemos discriminar entre alterações resultantes do efeito do álcool em si das alterações resultantes do processo inflamatório iniciado por ele. Portanto, nossa discussão considera os efeitos de ambos os processos como inseparáveis. Entretanto, baseado em dados da literatura, em alguns experimentos foi possível fazer uma distinção entre esses dois processos.

O primeiro trabalho relacionado com tolerância oral é datado de 1829 (Dakin, 1829), mas somente a partir da década de 80, a tolerância oral tornou-se especialmente atrativa como tema de pesquisa na Imunologia por ser comprovado seu efeito inibitório nas respostas inflamatórias contra antígenos de importância imunopatológica (Nagler-Anderson, et al., 1986) (Thompson and Staines, 1986, Thompson and Staines, 1990)

(Higgins and Weiner, 1988) e por sua aplicabilidade clínica no tratamento de várias doenças (Weiner, 1997). Experimentalmente, a tolerância oral pode ser avaliada através de atividades imunológicas *in vivo*, como produção de anticorpos, reações de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH), testes de clareamento do antígeno e *in vitro* pela análise da proliferação celular, das células formadoras de placa (PFC), e da produção de citocinas em sobrenadantes de cultura (Faria and Weiner, 1999). Entretanto, esses parâmetros imunológicos são diferencialmente afetados pela administração oral do antígeno. A reação de DTH é mais facilmente suprimida do que a formação de anticorpos em camundongos (Kay and Ferguson, 1989) (Ke and Kapp, 1996) (Mowat, 1986), cobaias (Heppel and Kilshaw, 1982) e humanos (Husby, et al., 1994). Por outro lado, a tolerância oral para DTH é mais facilmente quebrada pelo tratamento com ciclofosfamida (Mowat, et al., 1982) ou estradiol (Mowat and Parrot, 1983) e mais difícil de ser induzida em animais privados de proteína do que a tolerância para a resposta humoral (Lamont, et al., 1987). Após o estabelecimento de um quadro de gastrite, independente do parâmetro analisado, resposta humoral ou reatividade celular, camundongos C57BL/6 tornaram-se refratários à indução de tolerância oral à ovalbumina (Ova).

A frequência e a forma de administração oral de antígeno é um fator crucial para a indução de tolerância oral em camundongos e as administrações múltiplas são mais eficientes que uma única gavagem (Saklayen, et al., 1984) (Faria, et al., 1998). Diferentes protocolos de tratamento oral têm efeitos marcantes na indução de tolerância como consequência do tipo de ativação induzido no GALT. A administração contínua do antígeno na água dos animais têm produzido efeitos mais profundos na tolerância, capaz de suprimir respostas Th1 ou Th2, enquanto uma única gavagem suprime somente respostas Th1 (Melamed, et al., 1996) (Faria, et al., 2003). Aparentemente esse efeito da administração contínua do antígeno pela ingestão voluntária se deve a um aumento na secreção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- $\beta$  (Faria et al, 2003). Em nossos resultados, quando analisamos produção de anticorpos específicos nos animais controle que receberam o antígeno através de ingestão voluntária, não observamos uma supressão mais acentuada do aquela observada com o protocolo de gavagem. Provavelmente, os animais controle já eram muito susceptíveis à indução de tolerância oral e o regime de gavagem foi suficiente para induzi-la. Com relação aos animais com gastrite, é importante notar que nem a utilização da ingestão voluntária foi capaz de induzir tolerância oral nesses animais. Esses resultados foram indicativos de

que a administração de álcool é acompanhada de importantes alterações no microambiente das mucosas de modo que, independente da forma de entrada e da frequência do contato dos antígenos com o GALT, não é possível estabelecer uma ativação de mecanismos regulatórios nos animais com gastrite.

Antígenos presentes no lúmen intestinal podem penetrar no organismo através de duas vias. Através das placas de Peyer, onde são captados pelas células M, que constituem um tipo diferenciado de enterócito, especializado no transporte de ampla variedade de substâncias e microorganismos (Owen, 1977) (Gebert, et al., 1994). Outra via de entrada é através das células epiteliais das vilosidades intestinais, capazes de endocitar proteínas intactas e peptídeos pelas vias trans- e para-celular (Steinman, et al., 1983). Tem sido descrito 3 principais consequências imunológicas da administração oral de antígenos: imunização oral através da indução de (1) uma resposta imune local (não inflamatória) resultando na produção de IgA secretória, ou de (2) uma resposta inflamatória sistêmica com produção de anticorpos específicos que é um evento raro, ou o que normalmente acontece, (3) uma supressão da reatividade imunológica aos antígenos absorvidos (Faria and Weiner, 1999). Demonstramos que os animais com gastrite não apenas apresentam um defeito na indução de tolerância oral, mas também que eles são sensibilizados pelo contato oral com Ova. Essa sensibilização se traduz em um aumento do título de anticorpos específicos no soro, nos animais com gastrite e tratados com Ova por via oral, após um reforço por via intraperitoneal.

A interferência na indução de tolerância nesses animais, analisada pela resposta humoral, pode ser agravada por uma aparente diminuição na reatividade imunológica sistêmica observada algumas vezes no grupo imunizado. Nesses experimentos, os animais entram em contato com o antígeno 7 dias após a indução de gastrite. Entretanto, num ponto crítico de inflamação (24 horas após o último tratamento com EtOH), comprovamos que a imunização por via sistêmica não interfere na capacidade dos animais desenvolverem uma resposta imune. Portanto, isto nos sugere que as perturbações desencadeadas pela gastrite em um tempo crítico de inflamação na mucosa gástrica interferem primariamente em eventos que resultam em atividades regulatórias.

A penetração de antígenos na circulação ocorre fisiologicamente após a absorção intestinal, por uma via direta nos vasos sanguíneos ou indireta após drenagem linfática (Abtahian, et al., 2003). A grande quantidade de Ova na circulação sanguínea dos animais com gastrite pode ser um reflexo direto das alterações lesivas na mucosa gástrica, principalmente pelos focos erosivos e hemorrágicos demonstrados na análise

histológica. A entrada de uma quantidade de antígeno pelo estômago, um local teoricamente não tolerogênico, em um contexto inflamatório, certamente é um ponto importante na refratariedade à indução de tolerância oral nesses animais. Observamos que quando realizamos o tratamento tolerogênico 30 dias após a indução de gastrite, os animais são capazes de desenvolver tolerância oral para Ova. Entretanto, nossos resultados nos levam a acreditar que este não é o único ponto relevante. As perturbações locais e sistêmicas resultantes das alterações inflamatórias na mucosa gástrica parecem interferir com atividades regulatórias sistêmicas. Isto pode ser comprovado pelo fato de que esses animais se tornam refratários à indução de tolerância independente da via de entrada do antígeno (oral ou endovenosa).

A supressão de reatividade celular *in vivo* (reação de DTH) foi somente observada nas primeiras 24 horas após o desafio com o antígeno na pata dos animais com gastrite. Apesar do nítido inchaço na pata do grupo tolerizado (Ova ig), uma exarcebação da resposta inflamatória nos animais do grupo imune (salina ig) foi crucial para estabelecer a diferença de reatividade entre eles. Entretanto, a análise histológica demonstrou que, nesse tempo, a diferença no inchaço da pata se deveu a mudanças em eventos iniciais do processo inflamatório, como edema, e não à intensidade do infiltrado inflamatório propriamente dito. Confirmando essa observação, nenhuma supressão foi observada 48 ou 72 horas depois do desafio. Ao contrário, nesses tempos, observamos redução do edema mas uma manutenção do recrutamento de células inflamatórias. Há trabalhos demonstrando que o etanol prejudica a indução de reações de DTH em camundongos C57BL/6 (Waltenbaugh and Peterson, 1997), quando este é administrado no estágio inicial de indução da reação (antes ou durante a imunização). Nossos resultados demonstraram que alterações inflamatórias decorrentes da gastrite apresentam um efeito prolongado (30 dias) sobre o estabelecimento dos eventos inflamatórios da reação de DTH.

Em nosso modelo, a alteração de atividades funcionais e imunológicas pelo processo inflamatório, aponta várias alternativas explicativas para a refratariedade à indução de tolerância nos animais com gastrite.

Atualmente há um esforço concentrado de pesquisadores da área em delinear os eventos imuno-regulatórios iniciados na superfície das mucosas, principalmente na mucosa intestinal, envolvidos no fenômeno da tolerância oral. O microambiente intestinal é caracterizado por uma série de mecanismos que mantêm a homeostase imunológica. Dentre eles, podemos citar os níveis elevados de citocinas anti-



inflamatórias como TFG- $\beta$  e IL-10 (Daynes, et al., 1990); (Xu-Amano, et al., 1992), a produção de prostaglandinas (PGE2) por células da LP que tem vários efeitos imunomodulatórios (Kalinski, et al., 1997) (Snyder, et al., 1982) (van der Pouw Kraan, et al., 1995)), a presença de células cronicamente ativadas expressando marcadores que são descritos em células com atividade regulatória (Asseman, et al., 1999) (Powrie, et al., 1994) (Powrie, et al., 1996). Inflamações intestinais são induzidas quando há perturbações em alguns desses mecanismos, como demonstrado nos modelos experimentais de IBD em animais geneticamente deficientes para IL-10 (Kuhn, et al., 1993), IL-2 (McDonald, et al., 1997) ou TCR (Mombaerts, et al., 1993). Está bem descrito que processos inflamatórios no intestino com consequentes alterações de permeabilidade intestinal e mudança no balanço de citocinas na mucosa intestinal, interferem na indução de tolerância oral (Duchmann, et al., 1996) (Mowat and Parrot, 1983).

Não existem, no entanto, trabalhos analisando sistematicamente a importância da imuno-regulação na mucosa gástrica sobre a indução de tolerância oral. A literatura em geral aponta um papel mais funcional do estômago na indução de tolerância oral, principalmente pelo processo de degradação enzimática. Gabriel Michael e seu grupo produziram vários trabalhos mostrando que alterações nas propriedades estruturais das proteínas utilizadas como antígenos, como cationização ou desnaturação (Jain and Michael, 1995) (Michael, 1991), inibe a indução de tolerância oral. Hanson e colaboradores (Hanson, 1980) demonstraram que a interferência nos processos de digestão do antígeno pela administração *in vivo* de aprotinina, um inibidor de proteases, impede a indução de tolerância oral para Ova. Mais recentemente, Stransky e colaboradores (Stransky, et al., 1998) mostraram que a eliminação do processo de digestão gástrica pela administração de antígeno no íleo de camundongos, também resulta em uma diminuição no grau de supressão observado após o desafio parenteral com o antígeno. A administração de Ova encapsulada em polímeros ácido-resistentes induz uma forte resposta humoral em camundongos B6D2F1 (Jain, et al., 1996). Por outro lado, Whitacre e colaboradores (Whitacre, et al., 1991) observaram que a administração de inibidor de protease juntamente com MBP não interfere na indução de tolerância para esse antígeno. Essas observações controversas podem estar diretamente relacionadas ao grau de degradação do antígeno envolvido. Se por um lado alguma degradação do antígeno é necessária, por outro, a degradação enzimática excessiva também interfere na indução de tolerância, possivelmente por destruir epitopos

relevantes na ativação de linfócitos T (Peng, et al., 1995) (Peng, et al., 1998) (Peng, et al., 1998). Animais com gastrite, quando comparado com controles, apresentaram uma menor velocidade na reação proteolítica da pepsina sobre a Ova, medida no lavado do estômago. Essa alteração na degradação enzimática da proteína que estamos usando como tolerôgeno, pode ter um papel importante nas alterações observadas.

Nossos resultados demonstram que, além de um papel unicamente funcional do estômago, seu papel na manutenção da homeostase imunológica na mucosa gástrica é fundamental para o estabelecimento de tolerância oral. Curiosamente a produção de IL-10, uma importante citocina envolvida em processos regulatórios (Daynes, et al., 1990) (Xu-Amano, et al., 1992), não está alterada no estômago nem no intestino delgado dos animais com gastrite. Entretanto, mostramos que o processo inflamatório induzido pela gastrite tem um impacto sobre o balanço da produção de IL-4 em diferentes porções do trato gastrointestinal. Apesar de nenhuma alteração morfológica ser detectável no intestino delgado dos animais com gastrite, observamos um aumento de IL-4 no jejuno proximal e diminuição no jejuno distal. No estômago, tanto IL-4 quanto IFN- $\gamma$  estão aumentadas, refletindo o misto infiltrado inflamatório evidenciado pela análise histológica. O perfil de citocinas produzidas no estômago durante processos inflamatórios varia de acordo com o tipo de inflamação desencadeada (Ren, et al., 2001). Há relatos de um aumento de IFN- $\gamma$  (Hauer, et al., 1997, Karttunen, et al., 1995), ou mesmo de um padrão misto com citocinas do tipo 1 e do tipo 2 (Ishihara, et al., 1996, Katakai, et al., 1998).

As quimiocinas são proteínas importantes no processo de migração de leucócitos tanto em situações inflamatórias quanto fisiológicas (Kellermann and McEvoy, 2001). Analisamos o perfil de produção local de quimiocinas não somente para avaliar os tipos celulares que estariam sendo recrutados para o foco inflamatório, mas também para estudar seu papel na indução de tolerância oral. Há trabalhos demonstrando um envolvimento de MCP-1 e MIP-2 na tolerância oral. MIP-2 parece ser importante para o recrutamento seletivo de células regulatórias durante a indução de tolerância oral (Faunce, et al., 2001) e a injeção de anticorpos anti-MCP-1 impede a indução de tolerância para EAE (encefalomielite autoimune experimental) induzida pelo tratamento oral com PLP (Proteolipid protein) (Karpus and Lukacs, 1996). A tendência a um aumento na produção de MCP-1 no estômago de animais com gastrite pode estar relacionado com o aumento local de IL-4. Nasu e colaboradores demonstraram que adição de IL-4 *in vitro* amplifica a produção de IL-6 e MCP-1 por células do estroma

endometrial de humanos (Nasu, et al., 2001). Também na gastrite induzida pela infecção com *H. pylori* foi demonstrado um aumento na produção de RNA mensageiro para MCP-1 no estômago de humanos (Isomoto, et al., 2000). No nosso modelo experimental, MIP-2 apresenta-se nitidamente reduzida no estômago, mas nenhuma alteração foi detectada no duodeno dos animais com gastrite (dados não mostrados). Apesar de não conclusivas, as alterações na produção de quimiocinas no estômago de animais com gastrite podem refletir não somente um aumento do recrutamento celular, mas também um fator importante na interferência da indução de tolerância oral.

Uma atividade imunológica típica do tecido linfóide associado às mucosas é a produção de IgA secretória. Essa imunoglobulina está envolvida em mecanismos locais de proteção por impedir a aderência de vários microorganismos na superfície das mucosas, neutralizar enzimas e toxinas, diminuir a penetração de antígenos e interagir com fatores anti-microbianos inatos como a lactoferrina, as peroxidases e a lisozima. A IgA secretória é produzida por plasmócitos na *lamina propria* e transportada via células epiteliais para o muco através da interação com receptor de imunoglobulina polimérica (pIgR). O componente secretório, que constitui uma parte do receptor de IgA da célula endotelial que fica ligado à imunoglobulina após ela ser secretada, é importante para tornar a IgA mais mucofílica e resistente à degradação enzimática (Kilian and Russell, 1999). A diminuição na concentração dessa imunoglobulina nos animais com gastrite pode ser uma consequência da diminuição de muco no estômago, como demonstrado pela análise histológica. Ou pode refletir simplesmente a dificuldade de detecção do conteúdo precipitado do estômago devido à possíveis alterações no pH local. Alternativamente, essa redução pode ocorrer devido a uma maior degradação enzimática. Há também trabalhos demonstrando que o etanol diminui a transcitose da IgA devido à alterações no citoesqueleto e na integridade física da célula epitelial (Diebel, et al., 2002) (Diebel, et al., 2002). Entretanto, não podemos deixar de especular que essa diminuição na concentração de IgA secretória pode ser um reflexo de alterações em eventos envolvidos na produção dessa imunoglobulina na mucosa gástrica inflamada. Tais alterações poderiam comprometer desde a migração de células comprometidas com a síntese de IgA ou mesmo a troca de isotipos no ambiente alterado da mucosa.

Vários autores têm estudado os efeitos imunológicos do álcool, principalmente após um consumo prolongado (Watson, et al., 1994) (Chen, et al., 1993) (Lopez, et al., 1994) (Gallucci and Meadows, 1995) (Bermudez, 1994). No nosso modelo

experimental, animais submetidos à administração de etanol por um curto período de tempo (4 dias) apresentam mudanças sistêmicas na produção de IL-4 e IL-10 por células do baço. Quando cultivadas *in vitro* com um ativador policlonal de linfócitos T, células do baço de animais com gastrite produziram maiores níveis de IL-4 quando comparadas com células de animais controle, onde essa citocina não foi detectada. Esse resultado foi surpreendente uma vez que camundongos C57BL/6 representam uma raça sabidamente propensa à produção de um perfil Th1 de citocinas após estimulação inespecífica (Virelizier, 1982). Em nosso estudo, células do baço de animais com gastrite não produziram IL-10 quando estimuladas *in vitro*. IL-10 é uma importante citocina envolvida em mecanismos regulatórios no intestino e sua deficiência genética tem sido associada com a quebra de tolerância oral para a microbiota intestinal e o consequente desenvolvimento de IBD (Kuhn, et al., 1993). IL-10 também tem sido associada à indução de tolerância oral (Rizzo, et al., 1999) e nasal e seus efeitos supressivos sobre a inflamação alérgica no pulmão estão comprovados (Akbari, et al., 2001). Está bem estabelecido que a ingestão de álcool está associada com um aumento de citocinas do tipo Th2, principalmente IL-4. Trabalhos recentes têm relatado que o nível de glutathiona (GSH) nas células apresentadoras de antígenos (APCs) é um fator importante na prevalência de um perfil Th1 versus Th2 nas respostas imunes e que o etanol é um potente inibidor da síntese de glutathiona (Peterson, et al., 1998). A inibição da síntese de glutathiona afeta a habilidade de APCs do baço em produzir IL-12 (Sarnstrand, et al., 1999), comprometendo a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T e permitindo o desenvolvimento de células produzindo IL-4. Apesar de não observarmos uma redução na produção de IFN- $\gamma$  por células do baço, em nosso modelo, é possível que esse seja um mecanismo importante no aumento de IL-4 local e sistêmica nos animais com gastrite. IL-4 é uma citocina crucial envolvida na troca de isotipo para IgE e IgG1 em camundongos e para IgE e IgG4 em humanos (Fallon, et al., 2002) (Tangye, et al., 2002). Como esperado, nossos resultados mostram que o aumento da produção de IL-4 por células do baço está associado com um aumento significativo nos níveis séricos de IgE total nos animais com gastrite. A análise de imunoglobulinas totais e de outros isotipos de imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) séricas nesses animais não mostra alteração sugerindo que o processo de troca de isotipo para IgG1 não está afetado e que o aumento nos níveis de IgE não é suficiente para mudar a produção total de imunoglobulinas por estes animais. Entretanto IgE é um potente mediador de reações inflamatórias alérgicas e um aumento na concentração total dessa imunoglobulina no

soro dos animais sugere um componente alérgico relacionado à gastrite. Estudos recentes em populações humanas têm reforçado a noção de que níveis moderados de consumo de álcool estão associados com um aumento nos níveis séricos de IgE e que isto pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de doenças alérgicas (Vidal, et al., 2002) (Dominguez-Santalla, et al., 2001) (Vally and Thompson, 2003) (Gonzalez-Quintela, et al., 1999). No nosso modelo, o aumento da IgE sérica após o estabelecimento de gastrite pode estar relacionado não somente a um efeito do álcool mas também às próprias alterações inflamatórias no microambiente do estômago. Berczi e colaboradores (Berczi, et al., 2000) demonstraram um aumento de células positivas pra IgE no estômago de pacientes com gastrite associada a *H. pylori*. Outros trabalhos em humanos têm demonstrado que a gastrite aguda e erosiva aumenta o número de células positivas para IgE e antígenos alimentares podem provocar resposta mediada por IgE na mucosa gástrica (Walker-Smith, et al., 1984).

A intolerância alimentar é um termo genericamente utilizado para descrever uma ampla variedade de respostas contra alimentos incluindo reações alérgicas, reações adversas resultante de deficiências enzimáticas, efeitos farmacológicos, dentre outros. Reações alérgicas não mediadas por IgE são observadas na doença celíaca, uma doença crônica em que há uma lesão na mucosa intestinal devido a uma intensa reatividade imunológica contra o glúten, prejudicando a absorção de nutrientes (Robins, et al., 1994). Entretanto, a maioria dos casos de alergia alimentar é dependente da geração de respostas mediadas por IgE (Buttriss, 2002). Algumas características de proteínas contidas nos alimentos, como a resistência à digestão e a glicosilação, são particularmente importantes no desencadeamento de uma ativação imunológica que induza a produção exarcebada de IgE (Astwood, et al., 1996). Assim, o desenvolvimento de alergias é influenciado principalmente por fatores genéticos e ambientais, dentre eles, hábitos alimentares, idade, alergenidade de componentes da dieta, dentre outros (Marsh, et al., 1981).

As reações alérgicas mediadas por IgE são divididas em duas fases: sensibilização, caracterizada pela ligação de IgEs de determinada especificidade em receptores de alta afinidade (FcεRI) expressos constitutivamente na superfície de basófilos e mastócitos e em eosinófilos ativados. Em humanos, o período da vida mais susceptível para a sensibilização alérgica é durante a infância por ser uma época de introdução de novos alimentos e de imaturidade do sistema imune (Buttriss, 2002). A outra fase, efetora, que pode ocorrer tanto na infância quanto na vida adulta, é

desencadeada segundos após o entrelaçamento dos receptores FcεRI, induzido pela ligação do alérgeno em duas moléculas de IgE na superfície de mastócitos encontrados em vários tecidos. Uma vez ativados, os mastócitos desencadeiam reações inflamatórias pela secreção de mediadores químicos (histamina, prostaglandina) armazenados em grânulos pré-formados, além da secreção de leucotrienos, quimiocinas e citocinas. Mastócitos podem também ser ativados por outras vias, independentemente de IgE e antígenos (Stassen, et al., 2002). Como por exemplo, já foi demonstrado que MCP-1 se liga a receptores CCR2 na superfície de mastócitos causando a sua degranulação (Campbell, et al., 1999). Nesse contexto, a tendência a um aumento dessa quimiocina no estômago dos animais com gastrite pode ter implicações alérgicas importantes no nosso modelo. As alterações resultantes dessa ativação alérgica são imediatas e caracterizadas por modificações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular, induzidas principalmente pela histamina. Há também uma grande destruição tecidual devida à ação de metaloproteinases que degradam a matriz e são ativadas por enzimas produzidas por mastócitos. Essa reação alérgica imediata é seguida por uma inflamação mediada por células, conhecida como fase tardia da reação alérgica. A reação inflamatória nessa fase, que leva em torno de 8-12 horas para se desenvolver, envolve o recrutamento de células efetoras, principalmente linfócitos T CD4+ com um perfil Th2 e eosinófilos, que contribuem significativamente para a imunopatologia da resposta alérgica (Janeway, et al., 2002). No nosso modelo, o tipo celular predominante no infiltrado da pata dos animais com gastrite é o eosinófilo, indicando que uma fase tardia de um processo inflamatório alérgico, ao invés de uma reação mediada por linfócitos T CD4+ do tipo Th1 caracteristicamente presentes na reação de DTH, foi desencadeada após o desafio com o antígeno na pata.

Utilizamos alguns métodos para comprovar nossa hipótese de que os animais com gastrite apresentam uma reatividade imunológica alérgica frente ao contato com a Ova. Reações adversas a alimentos podem afetar qualquer parte do trato gastrointestinal bem como suas funções normais (Buttriss, 2002). Hogan e colaboradores demonstraram uma gastromegalia associada à disfunção na motilidade do estômago como consequência da inflamação eosinofílica em seu modelo alérgico de gastrite (Hogan, et al., 2001). Em casos de reações adversas a alimentos, a dilatação do estômago pelo acúmulo de gases é um evento normalmente associado ao comprometimento da digestão por danos na integridade da mucosa. (Buttriss, 2002). Em nosso modelo, juntamente com a gastromegalia, observamos um significativo acúmulo de gases no

estômago embora poucos eosinófilos puderam ser identificados no infiltrado inflamatório da mucosa gástrica após o tratamento com etanol. No entanto, uma significativa eosinofilia tecidual poderia ocorrer se analisássemos o infiltrado inflamatório local após o desafio oral com o antígeno (Ova). Provavelmente, eventos alérgicos desencadeados após o contato com a Ova induziram alterações vasculares e, posteriormente, uma maior migração de eosinófilos para a mucosa. De fato, um aumento de permeabilidade vascular no estômago e intestino de animais com gastrite pode ser observado após o desafio oral com Ova em animais previamente sensibilizados.

Outra maneira de comprovar a natureza alérgica da gastrite induzida por álcool foi a análise do desenvolvimento do fenômeno da aversão à ingestão do antígeno (Ova). A aversão a sabores está relacionada a diversos fatores. A teoria geral da aversão condicionada ao sabor propõe que seu mecanismo dependa de uma correlação entre sensações gustatórias e consequências gastrointestinais (Garcia, et al., 1985). Cara e colaboradores demonstraram uma participação imunológica na mudança da sensibilidade do paladar, uma vez que animais imunes para Ova não ingerem uma solução contendo clara de ovo após a imunização secundária (Cara, et al., 1994) (Cara, et al., 1997). Na mesma linha, Andrade (Andrade, 1999) mostrou evidências de que essa aversão ocorre devido a um desconforto gastrointestinal mediado por eventos iniciais da reação alérgica. No nosso modelo, os animais com gastrite que entraram em contato prévio com a Ova por via oral também desenvolvem aversão a uma exposição posterior opcional ao antígeno, como demonstrado pela sua rejeição ao consumo de uma solução adocicada de clara de ovo. Os animais com gastrite que não foram previamente sensibilizados não apresentam aversão, provavelmente porque o consumo do antígeno durante 10 dias não é suficiente para sensibilizar os animais. Esse resultado evidencia a importância da Ova administrada por via oral em um contexto inflamatório para o desencadeamento de respostas alérgicas nos animais com gastrite. Ainda é bastante elusiva a correlação entre alergia alimentar e alterações na produção de IgA secretória específica ao alérgeno na superfície da mucosa do trato gastrointestinal. Normalmente, não se detecta um aumento de IgA secretória reativa contra proteínas da dieta. Um dos motivos responsáveis por essa ausência de uma reatividade específica da IgA do intestino aos componentes da dieta é o fato de que 70% dos linfoblastos IgA+ na *lamina propria* da mucosa intestinal são do subtipo B1 (expressando CD5). Essas células se originam do peritônio e se diferenciam em plasmócitos secretores de IgA na mucosa

intestinal pela ação de TGF- $\beta$ , IL-5 e IL-6 locais (Fagarasan, et al., 2001). A troca de isotipos por essas células não parece envolver a ativação de linfócitos T CD4+ específicos nem a apresentação convencional de antígenos (Macpherson, et al., 2000). Entretanto um trabalho recente demonstrou uma correlação entre alergia e a produção de IgA secretória, demonstrando uma redução nos níveis fecais de IgA específica em animais tratados por via oral com IL-12 para impedir o estabelecimento de uma resposta alérgica contra amendoim (Lee, et al., 2001). Essa correlação também foi observada em nosso modelo, onde o aumento de IgA secretória anti-Ova no lavado intestinal de animais se associa à aversão ao consumo de clara de ovo. Reforçando nossos resultados, um estudo recente encontrou números acima dos normais de células produtoras de IgA anti-Ova no intestino grosso de camundongos com alergia induzida pela administração oral de Ova em animais sensibilizados (Kweon, et al., 2000). Embora a IgA seja considerada uma imunoglobulina com atividades protetoras durante infecções bacterianas e virais, um papel protetor para a IgA secretória específica ao antígeno não tem sido estabelecido em indivíduos alérgicos. Ao contrário, IgAs secretórias específicas para alguns alérgenos parecem ativar eosinófilos e exacerbar a fase tardia das respostas asmáticas (Peebles, et al., 1998) (Nahm, et al., 1998). Esses achados sugerem que anticorpos IgA específicos para o antígeno podem desempenhar atividades patogênicas, mais do que protetoras, em reações alérgicas.

Descrevemos anteriormente vários indícios de que os animais com gastrite apresentam uma maior susceptibilidade a desenvolver respostas imunes mediadas por IgE. Em conjunto, nossos resultados demonstram que reações alérgicas são desencadeadas nos animais com gastrite, durante o contato sistêmico e intestinal com o antígeno administrado por via intraperitoneal (grupo imunizado) e oral (grupo tolerizado), respectivamente. Entretanto, a fase de sensibilização entre esses dois grupos ocorre em locais e tempos diferentes após a indução de gastrite. Nos animais com gastrite, os baixos níveis de anticorpos IgE específicos para Ova detectados na circulação dos animais em que a reação alérgica é iniciada pelo contato oral com a Ova (grupo tolerizado), comparado com o grupo imunizado, podem ser devidos ao clareamento desse anticorpo da circulação pela sua ligação à superfície de mastócitos. É relatado na literatura que a presença da IgE ligada a mastócitos pode amplificar reações alérgicas por impedir a apoptose de mastócitos, aumentar a produção de citocinas com funções autócrinas e aumentar a expressão de receptores de alta afinidade para IgE (Fc $\epsilon$ RI) (Kawakami and Galli, 2002). Uma outra explicação para os níveis baixos de



IgE nesses animais é o tempo de coleta do soro nesse protocolo que pode ter sido insuficiente para permitir a formação de anticorpos IgE específicos.

Apesar do quadro alérgico, induzido pela administração de Ova oral nos animais com gastrite, complicações generalizadas induzidas pela reexposição sistêmica ao antígeno não foram observadas. O antígeno na circulação induz ativação de mastócitos associados a vasos sanguíneos em vários locais do corpo. A ativação disseminada de mastócitos, conhecida como anafilaxia sistêmica, apresenta uma ampla variedade de efeitos potencialmente fatais: o amplo aumento da permeabilidade vascular leva à perda catastrófica da pressão sanguínea, à constrição das vias aéreas, causando dificuldade respiratória e edema da epiglote que pode levar ao sufocamento. Essa síndrome potencialmente fatal é chamada de choque anafilático. Alguns alimentos, como amendoim e castanha, podem causar anafilaxia sistêmica em indivíduos susceptíveis (Buttriss, 2002). Apesar de não analisarmos a histologia após o desafio sistêmico com o antígeno nos animais sensibilizados através da administração de Ova oral, acreditamos que, em nosso modelo, os efeitos são limitados ao intestino e estão associados ao aumento local de IgA secretória.

Existem várias células capazes de apresentar antígenos no tecido linfóide associado ao intestino, incluindo macrófagos e células dendríticas nas placlas de Peyer e *lamina propria*, linfócitos B e células epiteliais (Ogra, et al., 1999). A fagocitose é um processo fisiológico ativo, filogeneticamente conservado, realizado por células pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos, e envolvido em eventos gerais da atividade celular. Dentre esses eventos, podemos citar a eliminação de patógenos, o clareamento de células apoptóticas e necróticas e a indução de tolerância pela captação e apresentação de antígenos por determinadas (Greenberg and Grinstein, 2002). O processamento e apresentação de antígenos no microambiente intestinal é um fator importante na indução de tolerância oral e as APCs locais possuem características estruturais únicas das encontradas em outras partes do sistema imune (Faria and Weiner, 1999). Em nosso modelo, além de um quadro alérgico, eventos relacionados com a atividade de macrófagos podem estar envolvidos na refratariedade à indução de tolerância oral nos animais com gastrite. Essa hipótese surgiu a partir da observação da permanência, demonstrada pela análise histológica, do antígeno não degradado na pata dos animais com gastrite e desafiados para a indução da reação de DTH. Messner e colaboradores (Messner, et al., 1994) observaram uma alteração prolongada no clareamento mediado por complemento em camundongos tratados com etanol por via

intraperitoneal. No tipo de processo inflamatório desencadeado na pata após a injeção de Ova, macrófagos são as principais células envolvidas no clareamento do antígeno. Esse resultado indica um efeito prolongado e sistêmico da administração do álcool. Há vários trabalhos demonstrando os efeitos do álcool sobre o sistema imune inato tais como, inibição da atividade fagocítica de células da micróglia (Aroor and Baker, 1998), de células de Kupffer (Shiratori, et al., 1989) e de macrófagos (Castro, et al., 1993). A inibição da produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 também já foi relatada após o tratamento agudo com álcool (Gallucci and Meadows, 1995) (Szabo, et al., 1995). Diante dos nossos dados relativos à deficiência no clareamento da Ova nos animais com gastrite e do fato dos macrófagos do trato gastrointestinal terem um papel importantes como APCs na indução de tolerância oral, resolvemos verificar o impacto do álcool e das alterações inflamatórias resultantes sobre a atividade dessas células.

Os macrófagos estão envolvidos em processos importantes na homeostase do organismo. Essas células participam da remodelagem tecidual durante a embriogênese, do reparo, da remoção de células senescentes ou danificadas após injúria ou infecção e da eliminação de células apoptóticas. São também importantes na eliminação de bactérias e na morte de células tumorais. Além disso, o processamento e apresentação de antígenos realizado por macrófagos e outros tipos celulares representa uma importante conexão entre o sistema imune inato e o adaptativo (Klimp, et al., 2002). Sob a influência de diversos estímulos, macrófagos podem ser ativados apresentando mudanças morfológicas, funcionais e metabólicas em relação ao seu estado residente. Após a ativação, dentre várias alterações, essas células aumentam seu tamanho e sua capacidade de aderência, de migração, fagocitose e de destruição de microorganismos (Stumbles, et al., 1999). Há um aumento da capacidade de produção e secreção de vários mediadores e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 ou anti-inflamatórias como TGF- $\beta$  (Freire-de-Lima, et al., 2000), dependendo do contexto em que os macrófagos são ativados. O óxido nítrico (NO) é também um potente mediador da atividade de macrófagos. Quando produzido constitutivamente, participa da manutenção do tônus muscular no endotélio; após ativação, ele induz a formação de radicais altamente tóxicos que são responsáveis pela morte de vários parasitas (Klimp, et al., 2002). Para a realização dos nossos experimentos, utilizamos macrófagos do peritônio dos camudongos tratados ou não com etanol. Para aumentar o número de macrófagos na cavidade peritoneal, induzimos o seu recrutamento pela injeção de

tioglicolato no local. Apesar dos animais com gastrite apresentarem leucopenia sendo a população de monócitos a mais afetada, não observamos uma alteração no recrutamento desse tipo celular para o peritônio após a injeção de tioglicolato. Para análise da sua atividade *in vitro*, alguns mediadores, como LPS e IFN- $\gamma$ , foram utilizados como ativadores. Os macrófagos podem ser ativados pelo LPS, um componente da membrana de bactérias gram-negativas, que se liga à vários receptores na superfície celular, sendo mais descrito, a sinalização mediada pela ligação concomitante no CD14 e receptores do tipo Toll-4 (TLR-4) (Dobrovolskaia and Vogel, 2002). O IFN- $\gamma$  tem sido também extensivamente descrito como um ativador das funções inflamatórias de macrófagos (Drapier, et al., 1988) (Drapier and Wietzerbin, 1991). Observamos, no nosso modelo, que macrófagos coletados do peritônio um dia após a última administração de etanol apresentam uma atividade efetora reduzida, quando analisada pela produção de NO após estímulo *in vitro* com IFN- $\gamma$  e LPS. A redução observada na produção de IL-6 por macrófagos de animais com gastrite após sua estimulação *in vitro* com LPS ou IFN- $\gamma$  + LPS está de acordo com dados já descritos na literatura. Alguns autores demonstraram que o tratamento agudo com álcool tem um efeito imunossupressor sobre a população de monócitos e macrófagos impedindo a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 (Gallucci and Meadows, 1995) (Szabo, et al., 1995). Entretanto, essas alterações da atividade efetora dos macrófagos não são observadas a longo prazo (30 dias após a indução de gastrite). Pelo contrário, observamos, nesse tempo, uma potencialização na produção de NO após estímulo com LPS. Esses resultados indicam que a alteração no clareamento do antígeno na pata provavelmente não ocorreu devido à refratariedade dos macrófagos à ativação frente a um determinado estímulo.

A atividade fagocítica foi analisada pela medida do tempo que os macrófagos levaram para fagocitar uma partícula de zimosan aderida a sua superfície. O tempo total de fagocitose é definido pelo tempo de adesão, caracterizado como o tempo desde que o zimosan fica ligado à superfície do macrófago até que se inicia o englobamento; o tempo de internalização, definido como o tempo entre as alterações iniciais na membrana até a localização da partícula de zimosan no citoplasma da célula. Observamos uma drástica redução no tempo total de fagocitose realizada por macrófagos coletados de animais com gastrite, tanto um quanto trinta dias após o tratamento com etanol. Essa alteração na fagocitose se deve a um aumento marcante no tempo de adesão do zimosan até o início do processo de englobamento da partícula.

Zimosan é um componente isolado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* composto principalmente de manana e  $\beta$ -glicano. A fagocitose por macrófagos de partículas de zimosan não opsonizadas pode ser mediada via CR3 (Ross, et al., 1985) (Le Cabec, et al., 2000) ou via receptor de manose (Speert and Silverstein, 1985). Acreditamos que esse atraso no tempo de adesão seja um reflexo das alterações inflamatórias induzidas pela gastrite, ou por uma diminuição do número de receptores na superfície dos macrófagos envolvidos nesse processo, ou por alterações intracelulares que desencadeiam a ativação da fagocitose pela ligação do zimosan nos receptores. Kusner e colaboradores (Kusner, et al., 1996) demonstraram que a fosfolipase D é ativada em macrófagos durante a fagocitose de zimosan opsonizado e que o tratamento com etanol impede o processo por alterar mecanismos intracelulares como a geração de ácido fosfatídico. A fagocitose requer processos celulares coordenados envolvendo alterações no citoesqueleto e tráfico de vesículas (Greenberg and Grinstein, 2002). Vários trabalhos têm demonstrado que a incubação de células com EtOH (2.5 a 5%), induz uma desestabilização na organização de proteínas do citoesqueleto (Banan, et al., 1998) (Diebel, et al., 2002, Diebel, et al., 2002). Experimentos futuros já estão programados para esclarecer a ação do álcool nos macrófagos em nosso modelo.

Uma vez que observamos alterações tão gerais na atividade de macrófagos dos animais com gastrite, não podemos deixar de especular que, sendo essas células importantes APCs, é possível que o processamento de antígenos esteja também comprometido e, com ele, várias atividades importantes na indução de tolerância oral. Lopez e colaboradores (Lopez, et al., 1997) demonstraram que a administração de etanol em camundongos C57BL/6 induz várias alterações nas placas de Peyer, um sítio sabidamente importante para apresentação de antígenos e indução de reatividade imunológica na mucosa. Além disso, Mikszta e colaboradores (Mikszta, et al., 1995) mostraram que o consumo excessivo de álcool prejudica funções imunológicas dependentes de células T e que essa inibição é mediada, dentre outros fatores, por uma inibição do processamento e apresentação de antígenos.

Nossos resultados, em conjunto, demonstraram que alterações na mucosa gástrica interferem na indução de tolerância oral para Ova em camundongos C57BL/6. Sabemos que a tolerância oral a um antígeno pode ser induzida em todas as raças isogênicas de camundongos mas a susceptibilidade entre as raças varia de acordo com variações genéticas ligadas ou não aos genes do MHC (Vaz, et al., 1987). Recentemente, o grupo do Prof. Antônio Carlos da Silva, da Universidade Estadual do

Rio de Janeiro (da Silva, et al., 1998) (da Silva, et al., 2001) desenvolveu duas raças de camundongos não isogênicos selecionados para a susceptibilidade (ST) e para resistência (RT) à indução de tolerância oral à ovalbumina (Ova). Testando esses animais, observamos que a indução de gastrite altera o comportamento dos animais ST frente ao tratamento oral com a Ova, tornando-os refratários à indução de tolerância oral analisada pela reatividade celular *in vivo*. Esse é um forte indício de que a ação do etanol ou dos mecanismos inflamatórios por ele desencadeados ocorre em elementos centrais na indução de imuno-regulação.

Resolvemos analisar se as alterações na mucosa gástrica induzidas após o tratamento com etanol, teriam algum efeito sobre a tolerância oral já estabelecida, por exemplo, contra uma proteína presente na dieta normal. Para um melhor monitoramento experimental, os camundongos foram alimentados após o desmame (4 semanas de idade) com uma dieta contendo 15% de caseína. Na idade de 8 semanas, os animais foram tratados com álcool e posteriormente realizamos os desafios sistêmicos com a caseína adsorvida em adjuvante. Observamos que após o tratamento com etanol, os animais tornam-se refratários à indução de tolerância oral para caseína quando analisamos a resposta humoral. O etanol apresenta vários efeitos no timo (associados ao aumento de glicocorticóides), como redução da população emigrante de linfócitos T CD4+ e CD8+ maduros (Ellis, 1966) (Saad and Jerrells, 1991). Essas alterações podem se refletir em alterações nas populações dessas células na periferia, inclusive na sub-população de células T CD4+CD25+. Sakaguchi e Sakaguchi (Sakaguchi, et al., 1995) demonstraram a indução de gastrite autoimune pela depleção de células T CD4+CD25+ emigrantes tímicas. Tem se atribuído a essa população celular vários efeitos supressores sistêmicos e também nas mucosas que seriam importantes na indução da tolerância oral (Tsuji, et al., 2003) (Chen and Wahl, 2003) e da tolerância natural contra autocomponentes (Scheinecker, et al., 2002) (Goldschneider and Cone, 2003). É possível que os efeitos desencadeados pelo processo inflamatório induzido pela gastrite interfira com eventos imuno-regulatórios gerais, como a tolerância oral induzida localmente após estimulação por antígenos da dieta e da microbiota, e a tolerância sistêmica a autocomponentes estabelecida durante a embriogênese. Na própria gastrite induzida por *H. pylori* há indícios de um comprometimento autoimune envolvido na geração da inflamação gástrica (Faller, et al., 2002) (Faller and Kirchner, 2001). Como mecanismos importantes na manutenção da imuno-regulação parecem estar comprometidos no nosso modelo, um dos desenvolvimentos do nosso trabalho será exatamente investigar o

possível envolvimento de uma reatividade autoimune inflamatória na gastrite induzida por álcool.

### **Os efeitos do álcool e da colite experimental na indução de tolerância oral**

O melhor modelo de colite induzida por um agente agressor de mucosa é a colite induzida pela administração de TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico) que atua haptinizando proteínas plasmáticas através de ligações covalentes. O processo inflamatório é semelhante ao induzido durante uma reação de DTH, mediado por células T reativas a auto antígenos modificados pela ligação do hapteno (TNP) (Strober, et al., 2002). O modelo de colite pela administração de TNBS só pode ser induzido em algumas raças de camundongos, sugerindo um componente genético importante no desencadeamento do processo inflamatório (Bouma, et al., 2002). Nesse modelo, o etanol é utilizado como um veículo para facilitar a entrada do TNBS na mucosa colônica. Nós desenvolvemos um novo modelo experimental de colite induzida por duas administrações intrarretais de etanol 50% em camundongos BALB/c. Optamos, inicialmente, por trabalhar com essa raça de camundongos com o objetivo de comparar os dois modelos. Após esse tratamento, os animais desenvolvem uma intensa reação inflamatória na mucosa e submucosa do cólon, com um intenso infiltrado de células mono e polimorfonucleares, alguns focos erosivos e perda da integridade da mucosa.

Embora alguns autores descrevam a colite induzida por TNBS como uma reação típica de DTH com predominância na produção de IFN- $\gamma$  (Mombaerts, et al., 1993), outros têm demonstrado que, em camundongos BALB/c, a produção inicial de IFN- $\gamma$  é seguida por uma secreção predominante local de IL-4 (Strober, et al., 2002). A prevalência de um tipo de resposta (Th1 ou Th2) tem um considerável impacto sobre a natureza da inflamação na colite. A produção de IFN- $\gamma$  é associada com infiltrado celular transmural e, em alguns casos, com a formação de granuloma (Kosiewicz, et al., 2001). Por outro lado, a produção de IL-4 e IL-5 está associada com a presença de infiltrados celulares mais superficiais, com grande destruição da barreira epitelial e com um infiltrado constituído principalmente de células polimorfonucleares. Esse tipo de inflamação é observado em alguns modelos experimentais tais como em camundongos TCR $\alpha^{-/-}$  e no modelo experimental de colite induzida por oxazalona (Strober, et al.,

2002). Na colite ulcerativa humana, ambos os componentes parecem estar presentes, sendo que esta doença é caracterizada por uma reação inflamatória mista (Fuss, et al., 1996). Nosso modelo parece estar mais relacionado a esse tipo de doença inflamatória como mostrado pelo infiltrado celular e pela produção de citocinas.

Observamos um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 por células do linfonodo cecal e do baço dos animais com colite após estímulo policlonal *in vitro*. Interessantemente, células do linfonodo mesentérico desses animais produziram níveis maiores de IFN- $\gamma$  e menores de IL-4 quando comparadas com as células dos animais controle. Os linfonodos mesentéricos drenam o intestino delgado. Essa região do intestino é onde ocorre a absorção de proteínas da dieta e onde está localizada a maior parte do GALT. O microambiente linfóide intestinal é constituído de uma intensa intercomunicação entre mediadores e células que são constantemente ativadas para um padrão imunológico regulatório provavelmente responsável pela indução de tolerância oral. Vários mecanismos são responsáveis pela predominância dessa atividade regulatória no tecido linfóide associado ao intestino, dentre eles, a produção local de citocinas (Faria and Weiner, 1999). Normalmente, células isoladas das placas de Peyer e linfonodos mesentéricos produzem altos níveis de IL-10 e IL-4 quando estimuladas em cultura por ativadores policlonais, enquanto que células esplênicas produzem principalmente IFN- $\gamma$  (Iwasaki and Kelsall, 1999). TGF- $\beta$  e IL-10 são citocinas abundantemente presentes no microambiente intestinal e estão claramente envolvidas na supressão de reações inflamatórias no intestino (Powrie, et al., 1996) e na indução de tolerância oral (Rizzo, et al., 1999). No nosso modelo, a diferença na produção de IL-4/IFN- $\gamma$  pelas células do linfonodo mesentérico após a indução de colite sugere que o etanol e o quadro inflamatório gerado por ele interferem no balanço de citocinas da mucosa intestinal como um todo. Isso indica que mecanismos regulatórios que mantêm a tolerância oral podem estar alterados.

O próximo passo foi, então, estudar o desenvolvimento de tolerância oral nesses animais. Animais com colite submetidos ao tratamento tolerogênico, apresentaram uma refratariedade à indução de tolerância oral à Ova. Isso indica claramente que mecanismos imuno-regulatórios no intestino estão afetados pela indução de colite. É sabido que o etanol atua não somente como um agente irritante sobre a barreira da mucosa, mas também que ele interfere na apresentação de antígenos (Mikszta, et al., 1995) e na produção de citocinas (Girouard, et al., 1998). Ambos os tipos de ações

podem interferir com a tolerância oral para antígenos da microbiota e ativar reações inflamatórias contra bactérias normalmente inócuas. Embora trabalhos defendendo a supressão ativa como mecanismo importante na indução de tolerância oral concordem que a predominância de um perfil Th2 no microambiente intestinal é crucial para o estabelecimento do fenômeno, a super-produção de IL-4 pode ativar eventos inflamatórios do tipo Th2 (Asseman, et al., 1999). Parece ser esse o caso no nosso modelo já que a produção de IL-4 está aumentada nos sobrenadantes de cultura das células isoladas do linfonodo cecal e do baço. Por outro lado, o etanol pode ativar outros efeitos inflamatórios e irritantes que estimulem a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos sistêmicos e locais. Essa citocina também está aumentada nos sobrenadantes de cultura de todos os órgãos que analisamos. A interferência com a tolerância oral para componentes da microbiota é certamente o principal mecanismo inflamatório que pode ativar a produção de IFN- $\gamma$ . Tem sido demonstrado que a tolerância oral para a microbiota normal é quebrada na doença de Crohn (Landers, et al., 2002) e em camundongos com colite experimental (Duchmann, et al., 1996). Além disto, em vários modelos de colite experimental, a doença não se desenvolve ou é reduzida em animais isentos de germes e em animais tratados com antibióticos, sugerindo que reação imunológica contra bactérias entéricas tem um impacto importante sobre a expressão da doença (Elson, et al., 1995). Nossos dados sugerem, assim, que uma reação inflamatória contra a microbiota intestinal pode estar envolvida no desenvolvimento de colite nesses animais.



---

**CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

Nesse estudo, desenvolvemos dois modelos de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal pela administração tópica e aguda de álcool: gastrite e colite. Esses modelos experimentais são inéditos e facilmente reprodutíveis. Embora induzidos em camundongos de raças diferentes, C57BL/6 e BALB/c respectivamente, as patologias inflamatórias induzidas nesses animais apresentam várias características em comum:

- em ambos os modelos, observamos um infiltrado inflamatório local (estômago ou cólon) composto de células polimorfo e mononucleares;
- um padrão local misto de citocinas, traduzido pela produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  é característica dos dois modelos;
- a diminuição na produção de IL-4 no intestino delgado, nos animais com gastrite ou com colite, sugere que, embora não ocorra inflamação nesse local, o balanço de citocinas está perturbado em toda a mucosa intestinal;

Interessantemente, em ambos os modelos, ocorre uma perda da susceptibilidade à indução de tolerância oral.

O modelo de gastrite foi estudado com mais detalhes e várias alterações locais importantes foram detectadas. Os animais com gastrite apresentam:

- aumento do tamanho do estômago provavelmente devido a distensão;
- diminuição na velocidade da atividade proteolítica no estômago;
- diminuição na produção de muco e do número de células caliciformes;
- aumento na absorção de proteínas;
- aumento de MCP-1 e diminuição de MIP-2 no estômago;
- redução na produção de IgA secretória no estômago;

Embora o álcool seja rapidamente metabolizado, algumas alterações funcionais sistêmicas também são observadas:

- ocorre anemia e leucopenia após a administração oral de álcool mas apenas a leucopenia persiste 30 dias após o tratamento;

- ocorrem alterações na aparência dos animais (pelos arrepiados e oleosos) mas não no peso corporal;

Nossa hipótese principal para explicar a perda da susceptibilidade à indução de tolerância oral nesses animais é que a administração aguda de álcool induz perturbações em mecanismos locais e sistêmicos responsáveis pela imuno-regulação e pela tolerância oral. Algumas evidências demonstradas nesse estudo sugerem isto:

- indução de tolerância por via endovenosa também está comprometida nesses animais;
- a produção, por células do baço, de IL-10, uma citocina com atividades regulatórias importantes, está totalmente eliminada nesses animais;
- camundongos geneticamente selecionados para uma susceptibilidade aumentada a indução de tolerância oral perdem essa susceptibilidade quando tratados com etanol por via oral;
- a tolerância oral já estabelecida a uma proteína da dieta (caseína) também está comprometida após o tratamento oral com álcool e o estabelecimento da gastrite.

Além disto, várias repercussões imunológicas sistêmicas nos animais com gastrite sugerem que o tratamento com álcool e a gastrite induzem um fenômeno alérgico:

- ocorre um aumento na produção de IL-4 por células do baço e nos níveis séricos totais de IgE logo após a administração de álcool;
- ocorre um desvio no padrão da reação de DTH nos animais com gastrite que apresentam um infiltrado inflamatório eosinófilico característico da fase tardia da reação de hipersensibilidade imediata quando desafiados com antígeno por via subcutânea;
- a administração oral de ovalbumina nos animais com gastrite induz uma sensibilização dos animais traduzida num aumento nos níveis de IgG1 e IgE após imunização parenteral;
- a administração oral de Ova dos animais com gastrite e previamente sensibilizados com Ova induz um aumento da permeabilidade vascular local;
- esses animais desenvolvem aversão à ingestão voluntária de solução adocicada contendo Ova.

Um dos mecanismos pelos quais o álcool pode alterar o padrão inflamatório sistêmico (como na reação de DTH), a indução de tolerância oral e induzir fenômenos inflamatórios de natureza alérgica pode ser a alteração nas células apresentadoras de antígenos nesses animais. Tais alterações podem interferir diretamente na ativação de linfócitos T CD4+ e na sua atividade efetora. De fato, a administração de álcool altera o clareamento da Ova injetada por via subcutânea e esse defeito parece devido a alterações no tempo e na eficiência da fagocitose pelos macrófagos dos animais com gastrite. O efeito persiste até 30 dias após a última administração de álcool. Por outro lado, a atividade efetora dos macrófagos, indicada pela produção de IL-6 e NO, também está alterada mas apenas no período imediatamente posterior ao tratamento oral com álcool.

Os modelos de patologias inflamatórias induzidas por álcool apresentados nesse estudo são facilmente reprodutíveis e, por seus efeitos imunológicos importantes, podem ser instrumentos preciosos no estudo dos mecanismos de imuno-regulação da mucosa do trato gastrointestinal assim como nas consequências patológicas da ingestão aguda de álcool.

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdel-Salam, O.M., Czimmer, J., Debreceni, A. et al. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **J Physiol Paris**, v.95. p.105-27., 2001.

Abtahian, F., Guerriero, A., Sebzda, E. et al. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. **Science**, v.299. p.247-51., 2003.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nat Immunol**, v.2. p.725-31., 2001.

Andrade, M. Participação da reação de hipersensibilidade imediata no desencadeamento da aversão à ingestão de clara de ovo em camundongos imunizados com ovalbumina. **Departamento de Bioquímica e Imunologia**, p.96, 1999.

Aroor, A.R., Baker, R.C. Ethanol inhibition of phagocytosis and superoxide anion production by microglia. **Alcohol**, v.15. p.277-80., 1998.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W. et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J Exp Med**, v.190. p.995-1004., 1999.

Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L. Stability of food allergens to digestion in vitro. **Nat Biotechnol**, v.14. p.1269-73., 1996.

Banan, A., Smith, G.S., Rieckenberg, C.L. et al. Protection against ethanol injury by prostaglandin in a human intestinal cell line: role of microtubules. **Am J Physiol**, v.274. p.G111-21., 1998.

Benner, R., Rijnbeek, A.M., Bernabe, R.R. et al. Frequencies of background immunoglobulin-secreting cells in mice as a function of organ, age and immune status. **Immunobiol.**, v.158. p.225-238, 1981.

Berczi, L., Sebestyen, A., Fekete, B. et al. IgE-containing cells in gastric mucosa with and without *Helicobacter pylori* infection. **Pathol Res Pract**, v.196. p.831-4., 2000.

Bermudez, L.E. Effect of ethanol on the interaction between the macrophage and *Mycobacterium avium*. **Alcohol**, v.11. p.69-73., 1994.

Blumberg, R.S., Saubermann, L.J. Strober, W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. **Curr Opin Immunol**, v.11. p.648-56., 1999.

Boguniewicz, M., Sunshine, G.H. Borel, Y. Role of the thymus in natural tolerance to an autologous protein antigen. **J Exp Med**, v.169. p.285-90., 1989.

Bos, N.A., Meeuwse, C.G., Hooijkaas, H. et al. Early development of Ig-secreting cells in young of germ-free BALB/c mice fed a chemically defined ultrafiltered diet. **Cell Immunol**, v.105. p.235-45, 1987.

Bouma, G., Kaushiva, A. Strober, W. Experimental murine colitis is regulated by two genetic loci, including one on chromosome 11 that regulates IL-12 responses. **Gastroenterology**, v.123. p.554-65., 2002.

Brandtzaeg, P. History of oral tolerance and mucosal immunology. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.778. p.1-26, 1996.

Brandtzaeg, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutr.Rev.**, v.56. p.S5-18, 1998.

Brandtzaeg, P., Halstensen, T.S. Kett, K. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterology**, v.97. p.1562-1584, 1989.

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. p.295-300, 1986.

Buttriss, J. Adverse reactions to food: the report of a British nutrition foundation task force. 2002.

Campana, D., Janossy, G., Coustan-Smith, E. et al. The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in man. **J Immunol**, v.142. p.57-66., 1989.

Campbell, E.M., Charo, I.F., Kunkel, S.L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2<sup>-/-</sup> mice: the role of mast cells. **J Immunol**, v.163. p.2160-7., 1999.

Cara, D.C., Conde, A.A., Vaz, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Braz J Med Biol Res**, v.27. p.1331-41, 1994.

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

Castro, A., Lefkowitz, D.L., Lefkowitz, S.S. The effects of alcohol on murine macrophage function. **Life Sci**, v.52. p.1585-93., 1993.

Chen, G.J., Huang, D.S., Watzl, B. et al. Ethanol modulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by murine splenocytes and macrophages. **Life Sci**, v.52. p.1319-26., 1993.

Chen, W., Wahl, S.M. TGF-beta: the missing link in CD4(+)CD25(+) regulatory T cell-mediated immunosuppression. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.14. p.85-9., 2003.

Chen, Y., Inobe, J., Marks, R. et al. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. **Nature**, v.376. p.177-180, 1995.



Colotta, F., Sironi, M., Borre, A. et al. Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells. **Cytokine**, v.4. p.24-8., 1992.

Coutinho, A., Salaun, J., Corbel, C. et al. The role of thymic epithelium in the establishment of transplantation tolerance. **Immunol Rev**, v.133. p.225-40., 1993.

da Silva, A.C., de Souza, K.W., Machado, R.C. et al. Genetics of immunological tolerance: I. Bidirectional selective breeding of mice for oral tolerance. **Res Immunol**, v.149. p.151-61., 1998.

da Silva, M.F., da Costa, S.C., Ribeiro, R.C. et al. Independent genetic control of B- and T-cell tolerance in strains of mouse selected for extreme phenotypes of oral tolerance. **Scand J Immunol**, v.53. p.148-54., 2001.

Dakin, R. Remarks on a cutaneous affection produced by certain poisonous vegetables. **Am.J.Med.Sci.**, v.4. p.98-114, 1829.

Daynes, R.A., Araneo, B.A., Dowell, T.D. et al. regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. **Journal of Experimental Medicine**, v.171. p.979-983, 1990.

Diebel, L.N., Liberati, D.M., Dulchavsky, S.A. et al. Ethanol impairs intestinal barrier defense by modulation of immunoglobulin A transport. **Surgery**, v.132. p.573-8, 2002.

Diebel, L.N., Liberati, D.M., Saini, M.S. et al. Actin mediates secretory immunoglobulin A transport: effect of ethanol. **Am Surg**, v.68. p.769-74, 2002.

Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H. et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. **Am J Surg Pathol**, v.20. p.1161-81., 1996.

Dobrovolskaia, M.A.Vogel, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes Infect**, v.4. p.903-14., 2002.

Dominguez-Santalla, M.J., Vidal, C., Vinuela, J. et al. Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. **Alcohol Clin Exp Res**, v.25. p.1198-205., 2001.

Drapier, J.C.Wietzerbin, J. IFN-gamma reduces specific binding of tumor necrosis factor on murine macrophages. **J Immunol**, v.146. p.1198-203., 1991.

Drapier, J.C., Wietzerbin, J.Hibbs, J.B., Jr. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur J Immunol**, v.18. p.1587-92., 1988.

Duchmann, R., Schimitt, E., Knolle, P. et al. Tolerance towards resident flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. **Eur. J. Immunol.**, v.26. p.934-938, 1996.

Eck, M., Schmausser, B., Scheller, K. et al. CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in Helicobacter pylori gastritis. **Clin Exp Immunol**, v.122. p.192-9., 2000.

Ellis, F.W. Effect of ethanol on plasma corticosterone levels. **J Pharmacol Exp Ther**, v.153. p.121-7., 1966.

Elson, C.O., Ealding, W.Lefkowitz, J. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. **J.Immunol.Meth.**, v.67. p.101-108, 1984.

Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.109. p.1344-67., 1995.

Fagarasan, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M. et al. In situ class switching and differentiation of IgA-producing cells in the lamina propria. **Nature**, v.413. p.639-643, 2001.

Faller, G., Keller, K.M., Claeys, D. et al. Prevalence and specificity of antigastric autoantibodies in adolescents infected with *Helicobacter pylori*. **J Pediatr**, v.140. p.68-74., 2002.

Faller, G.Kirchner, T. [*Helicobacter pylori* and antigastric autoimmunity]. **Pathologie**, v.22. p.25-30., 2001.

Fallon, P.G., Jolin, H.E., Smith, P. et al. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. **Immunity**, v.17. p.7-17., 2002.

Faria, A.M., Maron, R., Ficker, S.M. et al. Oral tolerance induce by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor- $\beta$ /interleukin-10 and suppression of experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Autoimmunity**, v.in press. 2003.

Faria, A.M.Weiner, H.L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Adv Immunol**, v.73. p.153-264., 1999.

Faria, A.M.C., Ficker, S.M., Rodrigues, V.S. et al. Multiple feeding is more efficient for oral tolerance induction and result in a different pattern of isotype suppression. **Brazilian Jorunal**, 1998.

Faunce, D.E., Sonoda, K.H.Stein-Streilein, J. MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. **J Immunol**, v.166. p.313-21., 2001.

Ferraris, R.P.Diamond, J. Crypt-villus site of glucose transporter induction by dietary carbohydrate in mouse intestine. **Am J Physiol**, v.262. p.G1069-73., 1992.

Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B. et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v.403. p.199-203., 2000.

Fukuda, Y., Bamba, H., Okui, M. et al. Helicobacter pylori infection increases mucosal permeability of the stomach and intestine. **Digestion**, v.63 Suppl 1. p.93-6., 2001.

Fuss, I.J., Neurath, M., Boirivant, M. et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. **J Immunol**, v.157. p.1261-70., 1996.

Gallucci, R.M.Meadows, G.G. Ethanol consumption reduces the cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. **Alcohol Clin Exp Res**, v.19. p.402-9., 1995.

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

Gautam, S.C., Chikkala, N.F.Battisto, J.R. Oral administration of the contact sensitizer trinitrochlorobenzene: initial sensitization and subsequent appearance of a suppressor population. **Cellular Immunology**, v.125. p.437-448, 1990.

Gebert, A., Rothkotter, H.J.Pabst, R. Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. **Cell Tissue Res**, v.276. p.213-21., 1994.

Girouard, L., Mandrekar, P., Catalano, D. et al. Regulation of monocyte interleukin-12 production by acute alcohol: a role for inhibition by interleukin-10. **Alcohol Clin Exp Res**, v.22. p.211-6., 1998.

Goldschneider, I.Cone, R.E. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. **Trends Immunol**, v.24. p.77-81., 2003.

Gonzalez-Quintela, A., Vidal, C., Lojo, S. et al. Serum cytokines and increased total serum IgE in alcoholics. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.83. p.61-7., 1999.

Gordon, H. Effet of normal microbial flora on intestinal surface area. **Am. Journal of Physiology**, v.201. p.175-178, 1961.

Greenberg, S.Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. **Curr Opin Immunol**, v.14. p.136-45., 2002.

Hauer, A.C., Finn, T.M., MacDonald, T.T. et al. Analysis of TH1 and TH2 cytokine production in low grade B cell gastric MALT-type lymphomas stimulated in vitro with *Helicobacter pylori*. **J Clin Pathol**, v.50. p.957-9., 1997.

Hayashi, Y., Kobayashi, M., Kuwata, H. et al. Interferon-gamma and interleukin 4 inhibit interleukin 1beta-induced delayed prostaglandin E(2)generation through suppression of cyclooxygenase-2 expression in human fibroblasts. **Cytokine**, v.12. p.603-12., 2000.

Heppel, J.M.L.Kilshaw, J.P. Immune responses of guinea pigs to dietary protein. I.Induction of tolerance by feeding with ovalbumin. **Internat.Arch. Allergy Appl.Immunol.**, v.68. p.54-59, 1982.

Hermiston, M.L.Gordon, J.I. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. **Science**, v.270. p.1203-7., 1995.

Higgins, P.J.Weiner, H.L. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **J.Immunol.**, v.140. p.440-445, 1988.

Hogan, S.P., Mishra, A., Brandt, E.B. et al. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. **Nat Immunol**, v.2. p.353-60., 2001.

Homey, B.Zlotnik, A. Chemokines in allergy. **Curr Opin Immunol**, v.11. p.626-34., 1999.

Husband, A., Beagley, K.McGhee, J. Mucosal cytokines. **Mucosal Immunology**, p.1628, 1999.

Husby, S., Jensenius, J.C.Svehag, S.E. Passage of undergraded dietary antigen into the blood of healthy adults. **Scand. J. Immunol.**, v.22. p.83-92, 1985.

Husby, S., Mestecky, J., Moldoveanu, Z. et al. Oral tolerance in humans. **J.Immunol.**, v.152. p.4663-4669, 1994.

Iellem, A., Mariani, M., Lang, R. et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **J Exp Med**, v.194. p.847-53., 2001.

Ishihara, S., Fukuda, R.Fukumoto, S. Cytokine gene expression in the gastric mucosa: its role in chronic gastritis. **J Gastroenterol**, v.31. p.485-90., 1996.

Isomoto, H., Mizuta, Y., Miyazaki, M. et al. Implication of NF-kappaB in Helicobacter pylori-associated gastritis. **Am J Gastroenterol**, v.95. p.2768-76., 2000.

Iwasaki, A.Kelsall, B.L. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. **J Exp Med**, v.190. p.229-39., 1999.

Jain, S.L., Barone, K.S., Flanagan, M.P. et al. Activation patterns of murine B cells after oral administration of an encapsulated soluble antigen. **Vaccine**, v.14. p.1291-7., 1996.

Jain, S.L.Michael, G. The influence of antigen digestion on orally induced immunity and tolerance. **Advances in Mucosal Immunology**, v.371B. p.1245-1250, 1995.

Jancar, S., Sirois, M.G., Carrier, J. et al. PAF induces rat plasma extravasation and releases eicosanoids during anaphylaxis. **Inflammation**, v.15. p.347-54., 1991.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M. et al. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença.* 2002.

Kalinski, P., Hilkens, C.M., Sijnders, A. et al. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E<sub>2</sub>, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. **J Immunol**, v.159. p.28-35., 1997.

Karpus, W.J., Kennedy, K.J., Kunkel, S.L. et al. Monocyte chemotactic protein 1 regulates oral tolerance induction by inhibition of T helper cell 1-related cytokines. **J Exp Med**, v.187. p.733-41., 1998.

Karpus, W.J., Lukacs, N.W. The role of chemokines in oral tolerance. Abrogation of nonresponsiveness by treatment with antimonocyte chemotactic protein-1. **Ann N Y Acad Sci**, v.778. p.133-44., 1996.

Karttunen, R., Karttunen, T., Ekre, H.P. et al. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. **Gut**, v.36. p.341-5., 1995.

Katakai, T., Mori, K.J., Masuda, T. et al. Differential localization of Th1 and Th2 cells in autoimmune gastritis. **Int Immunol**, v.10. p.1325-34., 1998.

Kawakami, T., Galli, S.J. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. **Nat Rev Immunol**, v.2. p.773-86., 2002.

Kay, R.A., Ferguson, A. The immunological consequences of feeding cholera toxin. I. Feeding cholera toxin suppresses the induction of systemic delayed-type hypersensitivity but not humoral immunity. **Immunol.**, v.66. p.410-415, 1989.

Ke, Y., Kapp, J.A. Oral antigen inhibits priming of CD8<sup>+</sup> CTL, CD4<sup>+</sup> T cells and antibody responses while activating CD8<sup>+</sup> suppressor T cells. **The Journal of Immunology**, v.156. p.3610-3618, 1996.

Kellermann, S.A., McEvoy, L.M. The Peyer's patch microenvironment suppresses T cell responses to chemokines and other stimuli. **J Immunol**, v.167. p.682-90., 2001.

Kilian, M., Russell, M.W. Microbial evasion of IgA functions. **Mucosal immunology**, p.1628, 1999.

Klimp, A.H., de Vries, E.G., Scherphof, G.L. et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.44. p.143-61., 2002.

Kosiewicz, M.M., Nast, C.C., Krishnan, A. et al. Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. **J Clin Invest**, v.107. p.695-702., 2001.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v.75. p.263-74., 1993.

Kusner, D.J., Hall, C.F., Schlesinger, L.S. Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis or opsonized zymosan by human macrophages. **J Exp Med**, v.184. p.585-95., 1996.

Kweon, M.N., Yamamoto, M., Kajiki, M. et al. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. **J Clin Invest**, v.106. p.199-206., 2000.

Lamont, A.G., Gordon, M., Ferguson, A. Oral tolerance in protein-deprived mice. I. Profound antibody tolerance but impaired DTH tolerance after antigen feeding. **Immunology**, v.61. p.333-337, 1987.

Landers, C.J., Cohavy, O., Misra, R. et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. **Gastroenterology**, v.123. p.689-99., 2002.

Le Cabec, V., Cols, C., Maridonneau-Parini, I. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and Mycobacterium kansasii by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. **Infect Immun**, v.68. p.4736-45., 2000.

Lee, S.Y., Huang, C.K., Zhang, T.F. et al. Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. **Clin Immunol**, v.101. p.220-8., 2001.



Letterio, J.J., Roberts, A.B. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annu Rev Immunol**, v.16. p.137-61., 1998.

Lohoff, M., Rollinghoff, M., Sommer, F. Helicobacter pylori gastritis: a Th1 mediated disease? **J Biotechnol**, v.83. p.33-6., 2000.

Lopez, M.C., Huang, D.S., Borgs, P. et al. Modification of lymphocyte subsets in the intestinal-associated immune system and thymus by chronic ethanol consumption. **Alcohol Clin Exp Res**, v.18. p.8-11., 1994.

Lopez, M.C., Watzl, B., Colombo, L.L. et al. Alterations in mouse Peyer's patch lymphocyte phenotype after ethanol consumption. **Alcohol**, v.14. p.107-10., 1997.

Lu, C.Y., Beller, D.I., Unanue, E.R. During ontogeny, Ia-bearing accessory cells are found early in the thymus but late in the spleen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.77. p.1597-601., 1980.

Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E. et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**, v.288. p.2222-6, 2000.

Malmstrom, V., Shipton, D., Singh, B. et al. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. **J Immunol**, v.166. p.6972-81., 2001.

Marsh, D.G., Meyers, D.A., Bias, W.B. The epidemiology and genetics of atopic allergy. **N Engl J Med**, v.305. p.1551-9., 1981.

McDermont, M., Bienenstock, J. Evidence for a common mucosal immunological system. **J Immunol**, v.122. p.1892-1898, 1979.

McDonald, S.A., Palmen, M.J., Van Rees, E.P. et al. Characterization of the mucosal cell-mediated immune response in IL-2 knockout mice before and after the onset of colitis. **Immunology**, v.91. p.73-80., 1997.

Melamed, D., Fishmann-Lobell, J., Uni, Z. et al. Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. **Int.Immunol.**, v.8. p.717-724, 1996.

Menezes, J.S., Mucida, D.S., Cara, D.C. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **International Immunology**, v.15. p.1-9, 2003.

Messner, R.P., Meryhew, N.L.DeMaster, E.G. Selective, prolonged alteration of complement-mediated immune clearance after acute exposure of mice to ethanol. **Clin Immunol Immunopathol**, v.70. p.73-80., 1994.

Mestecky, J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. **J.Clin.Immunol.**, v.7. p.265-276, 1987.

Michael, J.G. Cationization of protein antigens. VI. Effects of cationization on the immunoregulatory properties of a bovine serum albumin peptide, a.a. 506-589. **Cell Immunol**, v.138. p.121-9., 1991.

Mikszta, J.A., Waltenbaugh, C.Kim, B.S. Impaired antigen presentation by splenocytes of ethanol-consuming C57BL/6 mice. **Alcohol**, v.12. p.265-71., 1995.

Miller, M.J., Sadowska-Krowicka, H., Chotinaruemol, S. et al. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. **J Pharmacol Exp Ther**, v.264. p.11-6., 1993.

Mombaerts, P., Mizoguchi, E., Grusby, M.J. et al. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. **Cell**, v.75. p.274-82., 1993.

Moog, F. The lining of the small intestine. **Scientific American**, v.245. p.116-125, 1981.

Morteau, O. Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.48. p.473-80., 2000.

Mowat, A.M. Depletion of suppressor T cells by 2'-deoxyguanosine abrogates tolerance in mice fed ovalbumin and permits the induction of intestinal delayed-type-hypersensitivity. **Immunology**, v.58. p.179-184, 1986.

Mowat, A.M.Ferguson, A. Hipersensitivity in the small intestinal mucosa. **Clin. Exp. Immunol.**, v.43. p.574-582, 1981.

Mowat, A.M.Parrot, D.M.V. Immunological responses to fed protein antigens in mice. IV. Effects of stimulating the reticuloendothelial system on oral tolerance and intestinal immunity to ovalbumin. **Immunology**, v.50. p.547-554, 1983.

Mowat, A.M., Strobel, S., Drummond, H.E. et al. Immunological response to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. **Immunology**, v.45. p.105-113, 1982.

Mowat, A.M.Viney, J.L. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immuno. Rev.**, v.156. p.145-166, 1997.

Nagler-Anderson, C., Bober, L.A., Robinson, M.E. et al. Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. **Proc.Nat.Acad.Sci.USA**, v.83. p.7443-7446, 1986.

Nahm, D.H., Kim, H.Y.Park, H.S. Elevation of specific immunoglobulin A antibodies to both allergen and bacterial antigen in induced sputum from asthmatics. **Eur Respir J**, v.12. p.540-5., 1998.

Nasu, K., Sugano, T., Fujisawa, K. et al. Effects of interleukin-4 on the in-vitro production of cytokines by human endometrial stromal cells. **Mol Hum Reprod**, v.7. p.265-70., 2001.

Newberry, R.D., Stenson, W.F., Lorenz, R.G. Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. **Nat Med**, v.5. p.900-6., 1999.

Ogra, P., Mestecky, J., Lamm, M. et al. *Mucosal Immunology*. p.1628, 1999.

Owen, R.L. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. **Gastroenterology**, v.72. p.440-51., 1977.

Peebles, R.S., Jr., Liu, M.C., Adkinson, N.F., Jr. et al. Ragweed-specific antibodies in bronchoalveolar lavage fluids and serum before and after segmental lung challenge: IgE and IgA associated with eosinophil degranulation. **J Allergy Clin Immunol**, v.101. p.265-73., 1998.

Peng, H.J., Chang, Z.N., Han, S.H. et al. Chemical denaturation of ovalbumin abrogates the induction of oral tolerance of specific IgG antibody and DTH responses in mice. **Scand. J. Immunol.**, v.42. p.297-304, 1995.

Peng, H.J., Chang, Z.N., Lin, S.Y. et al. Chemical denaturation of ovalbumin abrogates the induction of oral tolerance of mouse reaginic antibody responses. **Scand J Immunol**, v.47. p.475-80, 1998.

Peng, H.J., Chang, Z.N., Tsai, L.C. et al. Heat denaturation of egg-white proteins abrogates the induction of oral tolerance of specific Th2 immune responses in mice. **Scand J Immunol**, v.48. p.491-6, 1998.

Pereira, P., Forni, L., Larsson, E.L. et al. Autonomous activation of B and T cells in antigen-free mice. **Eur J Immunol**, v.16. p.685-8, 1986.

Pesce, G., Pesce, F., Fiorino, N. et al. Intraepithelial gamma/delta-positive T lymphocytes and intestinal villous atrophy. **Int Arch Allergy Immunol**, v.110. p.233-7, 1996.

Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K. et al. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95. p.3071-6., 1998.

Powrie, F., Carlino, J., Leach, M.W. et al. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. **J Exp Med**, v.183. p.2669-74., 1996.

Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S. et al. Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. **J Exp Med**, v.179. p.589-600., 1994.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S. et al. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. **Int Immunol**, v.5. p.1461-71., 1993.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S. et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. **Immunity**, v.1. p.553-62., 1994.

Qin, S., Cobbold, S.P., Pope, H. et al. "Infectious" transplantation tolerance. **Science**, v.259. p.974-7., 1993.

Quiding-Jarbrink, M., Ahlstedt, I., Lindholm, C. et al. Homing commitment of lymphocytes activated in the human gastric and intestinal mucosa. **Gut**, v.49. p.519-25., 2001.

Read, S., Mauze, S., Asseman, C. et al. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. **Eur J Immunol**, v.28. p.3435-47., 1998.

Ren, Z., Pang, G., Clancy, R. et al. Shift of the gastric T-cell response in gastric carcinoma. **J Gastroenterol Hepatol**, v.16. p.142-8., 2001.

Rimland, D. Mechanisms of ethanol-induced defects of alveolar macrophage function. **Alcohol Clin Exp Res**, v.8. p.73-6., 1984.

Rizzo, L.V., Morawetz, R.A., Miller-Rivero, N.E. et al. IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. **The Journal of Immunology**, v.162. p.2613-2622, 1999.

Robins, S., Cotran, R.Kumar, V. Pathologic basis of disease. p.1400, 1994.

Ross, G.D., Cain, J.A.Lachmann, P.J. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. **J Immunol**, v.134. p.3307-15., 1985.

Rudolph, U., Finegold, M.J., Rich, S.S. et al. Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. **Nat Genet**, v.10. p.143-50., 1995.

Saad, A.J.Jerrells, T.R. Flow cytometric and immunohistochemical evaluation of ethanol-induced changes in splenic and thymic lymphoid cell populations. **Alcohol Clin Exp Res**, v.15. p.796-803., 1991.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. et al. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. **J Exp Med**, v.161. p.72-87., 1985.

Sakaguchi, S.Sakaguchi, N. Thymus and autoimmunity. Transplantation of the thymus from cyclosporin A-treated mice causes organ-specific autoimmune disease in athymic nude mice. **J Exp Med**, v.167. p.1479-85., 1988.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, v.155. p.1151-64., 1995.

Saklayen, M.G., Pesce, A.J., Pollak, V.E. et al. Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. **Internat.Arch. Allergy Appl.Immunol.**, v.73. p.5-9, 1984.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A.Mackay, C.R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunol Today**, v.19. p.568-74., 1998.

Saoudi, A., Seddon, B., Heath, V. et al. The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset. **Immunol Rev**, v.149. p.195-216., 1996.

Sarnstrand, B., Jansson, A.H., Matuseviciene, G. et al. N,N'-Diacetyl-L-cystine-the disulfide dimer of N-acetylcysteine-is a potent modulator of contact sensitivity/delayed type hypersensitivity reactions in rodents. **J Pharmacol Exp Ther**, v.288. p.1174-84., 1999.

Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E.M. et al. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. **J Exp Med**, v.196. p.1079-90., 2002.

Schwartz, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science**, v.248. p.1349-1352, 1990.

Seitz, H.K., Gartner, U., Egerer, G. et al. Ethanol metabolism in the gastrointestinal tract and its possible consequences. **Alcohol Alcohol Suppl**, v.2. p.157-62., 1994.

Shanahan, F. Intestinal lymphoepithelial communication. **Adv Exp Med Biol**, v.473. p.1-9, 1999.

Shiratori, Y., Jin'nai, H., Teraoka, H. et al. Phagocytic properties of hepatic endothelial cells and splenic macrophages compensating for a decreased phagocytic function of Kupffer cells in the chronically ethanol-fed rats. **Exp Cell Biol**, v.57. p.300-9., 1989.

Sibley, D.A., Osna, N., Kusynski, C. et al. Alcohol consumption is associated with alterations in macrophage responses to interferon-gamma and infection by *Salmonella typhimurium*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.32. p.73-83., 2001.

Simon, G.L.Gorbach, S.L. Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, v.86. p.174-93., 1984.

Simpson, S.J., de Jong, Y.P., Comiskey, M. et al. T cells in mouse models of gut inflammation. **Chem Immunol**, v.71. p.118-38., 1998.

Snyder, D.S., Beller, D.I.Unanue, E.R. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. **Nature**, v.299. p.163-5., 1982.

Sonoda, K.H., Exley, M., Snapper, S. et al. CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. **J Exp Med**, v.190. p.1215-26., 1999.

Speert, D.P.Silverstein, S.C. Phagocytosis of unopsonized zymosan by human monocyte-derived macrophages: maturation and inhibition by mannan. **J Leukoc Biol**, v.38. p.655-8., 1985.

Stassen, M., Hultner, L.Schmitt, E. Classical and alternative pathways of mast cell activation. **Crit Rev Immunol**, v.22. p.115-40., 2002.

Steinman, R.M., Mellman, I.S., Muller, W.A. et al. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. **J Cell Biol**, v.96. p.1-27., 1983.

Stenson, W.F.Parker, C.W. Prostaglandins, macrophages, and immunity. **J Immunol**, v.125. p.1-5., 1980.



Stevens, A.Lowe, J. *Histologia*. 1995.

Stransky, B., Faria, A.M.C.Vaz, N.M. Oral tolerance induction with altered forms of ovalbumin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31. p.381-386, 1998.

Strober, W., Fuss, I.J.Blumberg, R.S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annu Rev Immunol**, v.20. p.495-549., 2002.

Stumbles, P.A., McWilliam, A.S.Holt, P.G. Dendritic cells and mucosal macrophages. **Mucosal Immunology**, 1999.

Szabo, G., Mandrekar, P.Catalano, D. Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. **J Leukoc Biol**, v.58. p.342-50., 1995.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. **International Immunology**, v.10. p.1969-1980, 1998.

Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T. et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. **Immunity**, v.10. p.39-49., 1999.

Tangye, S.G., Ferguson, A., Avery, D.T. et al. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. **J Immunol**, v.169. p.4298-306., 2002.

Taub, D.D., Turcovski-Corrales, S.M., Key, M.L. et al. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. **J Immunol**, v.156. p.2095-2103., 1996.

Taylor, P.M., Thomas, D.B.Mills, K.H.G. In vivo culture of T cell lines and clones. **Lymphocytes. A practical approach.**, p.133-147, 1987.

Thompson, H.S.G.Staines, N.A. Prevention of collagen-induced arthritis by oral administration of encapsulated type II collagen. **Clin.Exp.Immunol.**, v.64. p.581-586, 1986.

Thompson, H.S.G.Staines, N.A. Could specific oral tolerance be a therapy for autoimmune disease? **Immunology Today**, v.11. p.396-399, 1990.

Tsuji, N.M., Mizumachi, K.Kurisaki, J. Antigen-specific, CD4(+)CD25(+) regulatory T cell clones induced in Peyer's patches. **Int Immunol**, v.15. p.525-34., 2003.

Vally, H.Thompson, P.J. Alcoholic drink consumption: a role in the development of allergic disease? **Clinical Experimental Allergy**, v.33. p.156-158, 2003.

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.

van der Pouw Kraan, T.C., Boeije, L.C., Smeenk, R.J. et al. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **J Exp Med**, v.181. p.775-9., 1995.

Vaz, N.M., Rios, M.J., Lopes, L.M. et al. Genetics of susceptibility to oral tolerance to ovalbumin. **Braz J Med Biol Res**, v.20. p.785-90, 1987.

Vidal, C., Armisen, M., Dominguez-Santalla, M.J. et al. Influence of alcohol consumption on serum immunoglobulin E levels in atopic and nonatopic adults. **Alcohol Clin Exp Res**, v.26. p.59-64., 2002.

Vinney, J.L., Mowat, A.M., O'Malley, J.M. et al. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. **J.Immunol.**, v.160. p.5815-5825, 1998.

Virelizier, J.L. Murine genotype influences the in vitro production of gamma (immune) interferon. **Eur J Immunol**, v.12. p.988-90., 1982.

Walker-Smith, J.A., Ford, R.P., Phillips, A.D. The spectrum of gastrointestinal allergies to food. **Ann Allergy**, v.53. p.629-36., 1984.

Waltenbaugh, C., Peterson, J.D. Ethanol impairs the induction of delayed hypersensitivity in C57BL/6 mice. **Alcohol**, v.14. p.149-53., 1997.

Watson, R.R., Borgs, P., Witte, M. et al. Alcohol, immunomodulation, and disease. **Alcohol Alcohol**, v.29. p.131-9., 1994.

Weiner, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. **Immunology Today**, v.18. p.335-343, 1997.

Weiner, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. **Immunol Rev**, v.182. p.207-14., 2001.

Whitacre, C.C., Gienapp, I.E., Orosz, C.G. et al. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelites. III. Evidence for clonal anergy. **J.Immunol.**, v.147. p.2155-2163, 1991.

Xu-Amano, J., Aicher, W.K., Taguchi, T. et al. Selective induction of TH2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. **Internatl.Immunol.**, v.4. p.433-445, 1992.

Yaswen, L., Kulkarni, A.B., Fredrickson, T. et al. Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. **Blood**, v.87. p.1439-45., 1996.

Zhang, X., Izikson, L., Liu, L. et al. Activation of CD25+CD4+ regulatory T cells by oral antigen administration. **J Immunol**, v.167. p.4245-53., 2001.

## ARTIGOS

**Andrade, M.C.;** Vaz, N.M. & Faria, A.M.C. Alcohol-induced colitis abrogates oral tolerance in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (submetido).

**Andrade, M.C.;** Menezes, J.S.; Cassali,G.D.; Cara, DC & Faria, A.M.C. Alcohol-induced colitis abrogates oral tolerance in mice. *Immunology* (submetido).

**Andrade, M.C.,** Faria, A.M.C. Short-term administration of alcohol induces severe gastritis and alterations of gastric functions and IgA. *Gut* (em preparação).



ALCOHOL-INDUCED COLITIS ABROGATES ORAL TOLERANCE INDUCTION  
IN MICE.

Andrade, M.C.; Vaz, N.M. & Faria, A.M.C.

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG,  
Brasil.

Running title: Alcohol-induced colitis and oral tolerance

Key words: alcohol, colitis, oral tolerance, cytokines

Corresponding author:

Ana Maria Caetano de Faria

Departamento de Bioquímica e Imunologia

ICB - UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627

31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

tel: (31) 3499-2630

fax: (31) 3499-2640

e-mail: [afaria@icb.ufmg.br](mailto:afaria@icb.ufmg.br)

### **Abstract**

The gut mucosa is a major site of contact with antigens from food and microbiota. Usually, these daily contacts with natural antigens does not result in inflammatory reactions but in a state of systemic hyporesponsiveness named oral tolerance. Inflammatory bowel diseases (IBD) are associated with breakdown in the immunoregulatory mechanisms that maintain oral tolerance. Several animal models of IBD/colitis are available in mice with targeted disruptions of the genes encoding cytokines, T cell subsets or signalling proteins. Colitis can also be induced by intrarectal administration of chemical substances such as 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) in 50% ethanol. Herein we report a novel model of colitis that is induced by intrarectal administration of 50% ethanol alone. Ethanol-treated mice develop an inflammatory reaction in the colon characterized by intense inflammatory infiltrate in mucosa and submucosa of the large intestine. They also show upregulation of both IFN- $\gamma$  and IL-4 production by caecal lymph node and splenic cells. These results suggest a mixed type of inflammation as the substrate of the colitis. Interestingly, cells from mesenteric lymph nodes of ethanol-treated mice present an increase in IFN- $\gamma$  production and a decrease in IL-4 production indicating that cytokine balance is altered throughout the gut mucosa. Moreover, induction of oral tolerance to ovalbumin is abrogated in these animals strongly suggesting that ethanol-induced colitis interferes with immunoregulatory mechanisms in the intestinal mucosa. In conclusion, we described a novel model of colitis that bears resemblance with human inflammatory bowel disease, it is easy to reproduce and it may help to understand the mechanisms involved in IBD pathogenesis.

The gut mucosa is constantly and physiologically exposed to a large variety of antigenic materials represented by dietary proteins and bacterial antigens. These antigens contact a large and complex gut-associated lymphoid tissue (GALT) that is mainly located in the small intestine (1). Interestingly, the major immunological consequence of the chronic stimulation of lymphocytes at the gut mucosa is a state of systemic hyporesponsiveness to subsequent parenteral challenges with the same antigen named oral tolerance (2, 3). Many mechanisms have been shown to be involved in oral tolerance induction such as active suppression, anergy and clonal deletion (3). Active suppression is based on the generation of regulatory cells following antigenic contact in the GALT that act mostly via secretion of down-regulatory cytokines such as TGF- $\beta$  (4, 5) and IL-10 (6). The mechanisms by which these regulatory cells are induced remains elusive, but it is clear that features of the gut microenvironment are extremely important in their generation. Under normal conditions, intestinal environment present high levels of cytokines such as IL-10, TGF- $\beta$  and IL-4 that are believed to be important in the establishment of regulatory events and in the inhibition of inflammatory responses (3). Other local anti-inflammatory mediators are likely to play a role. Moreover, mucosal lymphocytes usually express markers of chronically activated cells (CD45RB<sup>low</sup>,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 and  $\alpha$ E $\beta$ 7 integrins, CD62L<sup>lo</sup>, CD44<sup>hi</sup>) some of which have been also identified as suppressor cell markers (6) (5).

Breakdown of these multiple regulatory mechanisms is usually associated with inflammatory intestinal pathologies. Inflammatory bowel disease (IBD), encompassing



Crohn's disease and ulcerative colitis, is a chronic relapsing inflammatory disease of the gastrointestinal tract. Several manipulations in key elements of the immune system are reported to induce IBD in mice. Mice genetically deficient in either IL-2 (7) or IL-10 (8) develop an inflammatory bowel disease (IBD) that affects multiple sites in the intestinal tract suggesting that disruption in these genes interfere with the generation of regulatory mechanisms in the gut. Similarly, IBD develops in mice with alterations in T-cell subsets, such as TCR $\alpha$ -deficient mice (9), and in severe combined immunodeficient (SCID) mice reconstituted with CD4<sup>+</sup> T-cell subsets (5). In addition, colitis can be induced by the rectal administration of peptidoglycan-polysaccharide (PG-PS) polymers in rats, dextran sulfate sodium, oxazolone or the contact sensitizing allergen 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in 50% ethanol in mice (10). These agents are believed to act as stressors of the mucosa triggering an inflammatory process that is enhanced by local bacterial stimulation. Intestinal lesions in the models of IBD resemble those seen in the human disease and include the presence of extensive leukocytic infiltrates, epithelial cell hyperplasia, depletion of mucin-secreting cells and, in some cases, ulceration.

The best described model of agent-induced colitis is the TNBS-induced colitis where TNBS is believed to act by haptenizing colonic cells. TNBS colitis appears to be a classic delayed type hypersensitivity (DTH) response mediated by T cells responding to "hapten-modified self antigen" formed by the covalent attachment of the hapten, TNP, to self peptides (11). Ethanol is used as a vehicle for TNBS although it is known to cause a local irritation.

Herein we describe a novel experimental model of colitis that is induced by administration of 50% ethanol alone. Colitis was induced in 8-week-old BALB/c mice by two intrarectal administrations of ethanol 5 days apart. Intrarectal procedures were performed using straight gavage needle with either 200  $\mu$ l of ethanol in saline (EtOH 50%w/v, pH 7.0), or only 200  $\mu$ l saline as a control. Seventy two hours after the last administration was determined as the optimal time for the inflammatory reaction in the colon as characterized by histological analyses. At this time, animals were sacrificed by cervical dislocation. Stomach, small and large intestines, and liver were excised, washed with cooled PBS and fixed in 10% PBS buffered formalin for 24 hours. After embedded in paraffin, transversal sections of the tissues were obtained (4 $\mu$ m thick), stained with haematoxylin and eosin and examined under a light microscope. Mice developed an inflammatory reaction in the colonic mucosa and submucosa characterized by an infiltrate of mono and some polymorphonuclear cells that form lymphoid aggregates, disruption of mucosal integrity and some erosive spots in epithelial surface. These alterations result in loss of mucosal integrity (Figure 1A). There was no sign of inflammation in the other isolated tissues (data not shown). Cytokine production by cells from several lymphoid organs was measured by culturing isolated cells ( $1 \times 10^7$  cells/ml) in the presence of 4  $\mu$ g/ml concanavalin A for 72 hours. Culture supernatants were tested by ELISA for IFN- $\gamma$  and IL-4. Cells from the draining lymph node (caecal) and from a systemic lymphoid organ (spleen) from ethanol-treated mice produce significantly higher levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 as compared to cells from control mice suggesting that a mixed inflammatory reaction is

triggered by ethanol. Although some authors described TNBS-induced colitis as a typical DTH reaction with a predominance of IFN- $\gamma$  production (11), others have reported that, in BALB/c mice, the initial production of IFN- $\gamma$  is followed by a predominant local IL-4 secretion (10). Whether a Th1 or a Th2-type of response prevails has a considerable impact on the nature of the inflammation since IFN- $\gamma$  production is associated with transmural cellular infiltration that, in some cases, results in granuloma formation. On the other hand, IL-4 and IL-5 production are associated with more superficial cellular infiltrates, a greater disruption of the epithelial layer and polymorphonuclear infiltrates. These type of inflammation is observed in the some experimental models such as TCR- $\alpha$  knockout mice, oxazolone-induced colitis and WASP deficiency (10). Human ulcerative colitis seem to present both components being characterized as a mixed inflammatory reaction (12). Our model seem to be more related to this type of inflammatory disease as shown by cytokine production (Figure 1B) and by the local cellular infiltrate (Figure 1A).

Interestingly, mesenteric lymph node cells from ethanol-treated mice produce higher levels of IFN- $\gamma$  and lower levels of IL-4 as compared to cells from control mice. Mesenteric lymph nodes drain the small intestine. This region of the gut is where dietary protein absorption takes place and where the vast majority of the gut-associated lymphoid tissue is located (1). The lymphoid gut environment is a complex interplay of mediators and cells that are constantly activated towards a regulatory immunological pattern probably responsible for oral tolerance induction. Several mechanisms can account for the predominant regulatory activity of the gut-associated lymphoid cells and locally produced

cytokines are among them (3). Isolated cells from Peyer's patches and mesenteric lymph nodes produce high levels of IL-10 and IL-4 when stimulated in cultures by polyclonal activators whereas splenic cells produce mostly IFN- $\gamma$  (13). Moreover, TGF- $\beta$  and IL-10 are abundant cytokines in the gut milieu and they are clearly involved in suppression of inflammatory reactions in the gut (5) and in oral tolerance induction (14) (3). The switch in IL-4/IFN- $\gamma$  production by mesenteric lymph node cells observed upon colitis induction suggests that ethanol treatment interferes with cytokine balance through the gut mucosa. It also indicates that regulatory mechanisms that maintain oral tolerance may be disturbed.

Therefore, the next step was to study oral tolerance development in these animals. Ethanol-treated and control mice were tested for oral tolerance induction using a single gavage of 20 mg ovalbumin (Ova) as a tolerogenic procedure. Mice were fed 72 hours after the last ethanol treatment, immunized with 10  $\mu$ g Ova in 3 mg Al(OH)<sub>3</sub> 7 days thereafter and boosted with 10  $\mu$ g soluble Ova 14 days later. Sera were collected 7 days after the booster for specific antibody measurements by standard ELISA. For the ELISA test, plates were sensitized with 2  $\mu$ g Ova, blocked with a solution containing 0.25% casein and incubated with serial dilutions of sera samples. To reveal bound anti-Ova antibodies, peroxidase(HRP) -conjugated goat anti-mouse Ig antibodies were used and reaction was developed in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and orto-phenileno-diamino (OPD). Reaction was stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and color was read at 492 nm. As shown in Figure 2, oral tolerance induction is abrogated in ethanol-treated mice. This is a clear indication that immunoregulatory mechanisms in the gut are affected by ethanol-induced colitis. It is

likely that ethanol acts not only as an irritant breaking the mucosal barrier of epithelial cells but also as stressor that interferes with antigen presentation and cytokine production. Both types of actions may interfere with oral tolerance to microbiota antigens and trigger an inflammatory reaction to otherwise innocuous bacteria. Our results are in agreement with recent studies showing that ethanol is a potent inhibitor of the glutathione synthesis and that glutathione (GSH) levels in antigen presenting cells (APCs) is an important factor in the prevalence of Th1 versus Th2 profile of immune responses (15). Inhibition of glutathione affects the ability of spleen APCs to produce IL-12, as already described in other models, compromising IFN- $\gamma$  production by T cells and allowing for the development of IL-4-producing T cells. Although reports on active suppression in oral tolerance induction agree that the predominance of a Th2 profile in the gut microenvironment is crucial to establishment of the phenomenon (16), overproduction of IL-4 may trigger Th2-type inflammatory events (17). This would help to explain the upregulation of IL-4 by caecal and spleen cells in our model. On the other hand, ethanol may have other irritant and inflammatory effects that stimulate IFN- $\gamma$  production by local and systemic lymphocytes. Interference with oral tolerance to components of the microbiota is certainly a major inflammatory mechanism that may trigger IFN- $\gamma$  production. It has been already demonstrated that oral tolerance to normal microbiota is abrogated in Crohn's disease (18) and in mice with experimental colitis (19). In addition, for several models of colitis, inflammatory disease either do not develop or is reduced in germ-free animals and in antibiotic treated animals suggesting that immunological reaction to enteric bacteria has a major impact on disease expression (20). In accordance with these

previous results, our data show that the immunoregulatory mechanisms triggered by oral tolerance induction are impaired by ethanol treatment and they suggest that an inflammatory reaction to the intestinal microbiota may be involved in colitis development.

We reported a novel model of colitis that is induced by administration of alcohol alone and it seems to bear some resemblance with human inflammatory bowel disease such as ulcerative colitis. Alcohol-induced colitis interferes with cytokine production throughout the intestinal mucosa as well as systemically and it also abrogates the induction of oral tolerance. This novel model is easy to reproduce and it may be useful to study the mechanisms involved in immunoregulation triggered by oral administration of antigen and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. It also sheds some light on the immunological effects of alcohol.

### **Acknowledgments**

We thank Ms Frankinéia Aparecida de Assis and Ms Ilda Martins Marçal de Souza for their excellent technical assistance.

## References

1. Mowat AM & Viney JL (1997). The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunological Reviews*, 156: 145-166.
2. Vaz NM, de Souza CM, Hornbrook MM, Hanson DG & Lynch NR (1977). Sensitivity to intravenous injections of histamine and serotonin in inbred mouse strains. *International Archives of Allergy Applied in Immunology*, 53: 545-554.
3. Faria AMC & Weiner HL (1999). Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Advances in Immunology*, 73: 153-264.
4. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB & Weiner HL (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vivo* and *in vitro* immune response by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89: 421-425.
5. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S & Coffman RL (1996). A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 183: 2669-2674.
6. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL & Powrie F (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 190: 995-1004.

7. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC & Horak I (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene [see comments]. *Cell*, 75: 253-261.
8. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K & Muller W (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75: 263-274.
9. Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK & Tonegawa S (1993). Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell*, 75: 274-282.
10. Strober W, Fuss IJ & Blumberg RS (2002). The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual Review of Immunology*, 20: 495-549.
11. von Bonin A, Ortmann B, Martin S & Weltzien HU (1992). Peptide-conjugated hapten groups are the major antigenic determinants for trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells. *International Immunology*, 4: 869-874.
12. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C & Strober W (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *Journal of Immunology*, 157: 1261-1270.
13. Iwasaki A & Kelsall BL (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 190: 229-239.



14. Rizzo LV, Morawetz RA, Miller-Rivero NE, Choi R, Wiggert B, Chan C-C, Morse III HC, Nussenblatt RB & Caspi RR (1999). IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *Journal of Immunology*, 162: 2613-2622.
15. Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K & Waltenbaugh C (1998). Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95: 3071-3076.
16. Khoury SJ, Hancock WW & Weiner HL (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelites are associated with down-regulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor b, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *The Journal of Experimental Medicine*, 176: 1355-1364.
17. Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, de Castro Keller A, Rodriguez D, Ribeiro OG, Adriouch S, Gallois V, de Faria AM & Vargaftig BB (2001). Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24: 518-526.
18. Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J & Targan SR (2002). Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology*, 123: 689-699.
19. Duchmann R, Schimitt E, Knolle P, Meyer zum Büschenfelde KH & Neurath M (1996). Tolerance towards resident flora in mice is abrogated in experimental

colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *European Journal of Immunology*, 26: 934-938.

20. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS & Riddell RH (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 109: 1344-1367.

## Legends

**Figure 1-** Effect of intrarectal alcohol administration on colonic morphology (A) and cytokine production by various lymphoid organs (B). All mice received one intrarectal administration of 0.2 ml of 50% ethanol (colitis, open bar) or saline (control, solid bar) and were challenged with ethanol *ir* five days later. Three days thereafter, histological analyses of large intestine was performed. Tissue was staining with hematoxilin and eosin. Inguinal, caecal and mesenteric lymph nodes as well as spleen cells were stimulated *in vitro* with concanavalin A and supernatant collected 72 hours later to measure cytokine production by quantitative ELISA.  $p < 0.05$  compared to control mice (unpaired t-test). *ir*= intrarectally.

**Figure 2-** Effect of colitis on oral tolerance induction to ovalbumin. Mice received one intrarectal administration with 0.2 ml of 50% ethanol (colitis, open bar) or saline (control, solid bar) and were challenged with ethanol *ir* five days later. Three days later, mice were fed either Ova (Ova fed, open bar) or saline (saline fed, solid bar). All animals received *ip* injection of 10  $\mu$ g Ova in alumen and were boosted with 10  $\mu$ g Ova 7 and 21 days later. Bars represent the mean of the running sum of absorbances at dilutions 1:800 to 1:6400 and significance between groups was calculated by two-tailed Student's t-test.  $p < 0.05$  compared to control saline-fed mice (unpaired t-test). *ir*= intrarectally, *ip*=intraperitoneal, Ova= ovalbumin.

FIGURE 1A

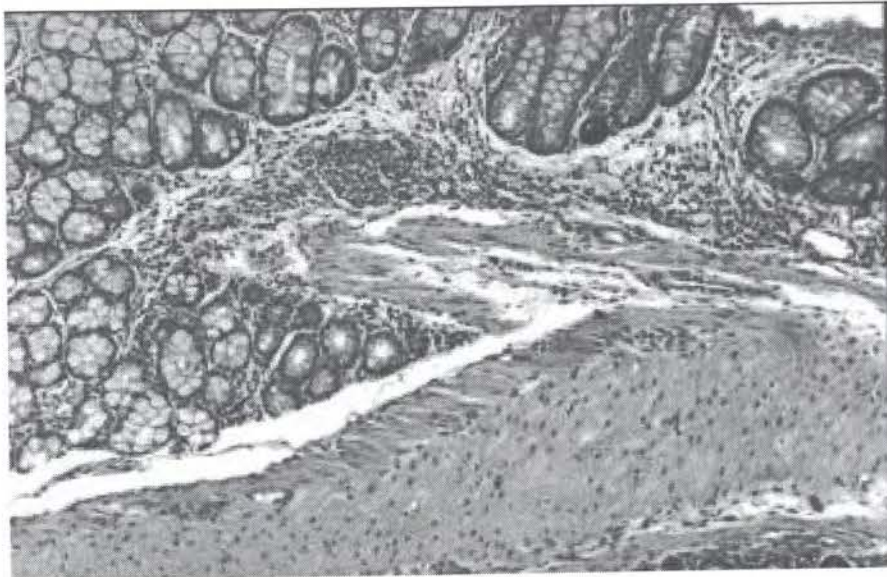
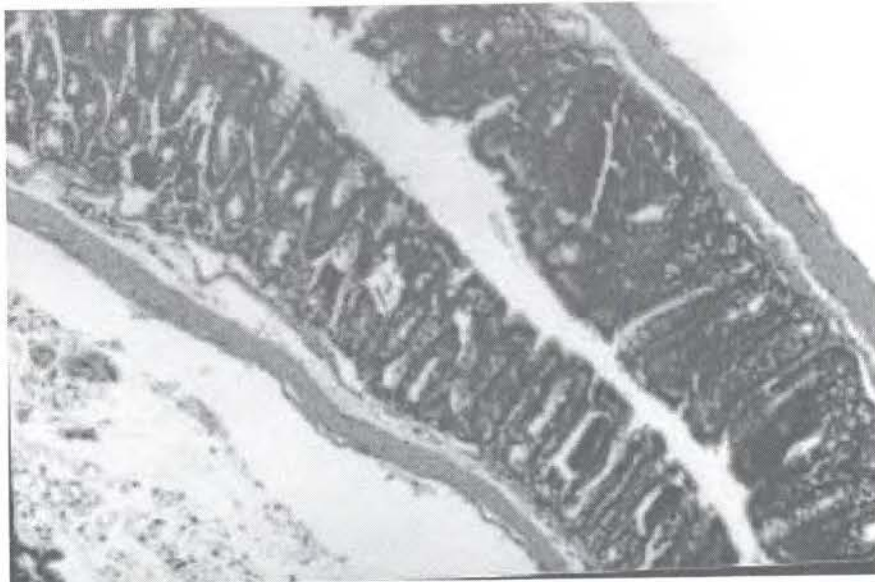


FIGURE 1B

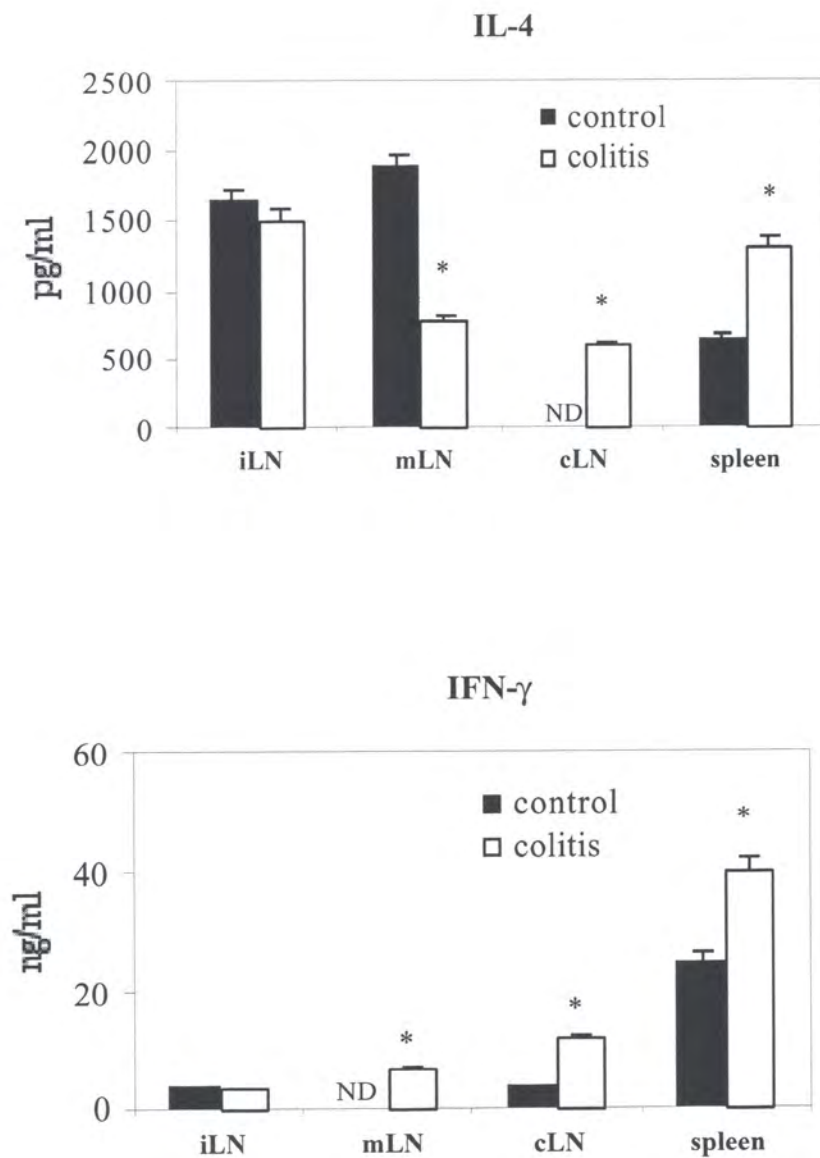
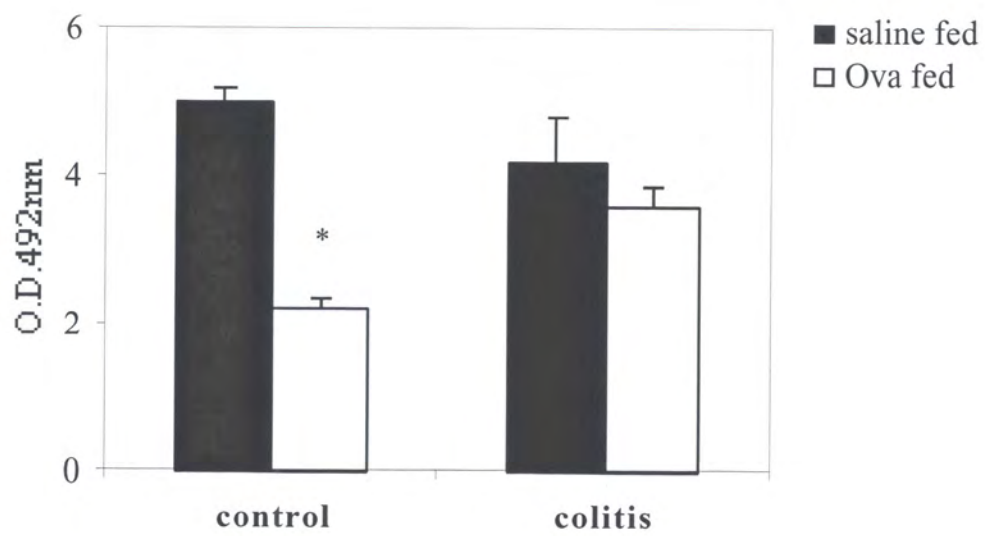


FIGURE 2



ALCOHOL-INDUCED GASTRITIS ABROGATES ORAL TOLERANCE  
INDUCTION IN MICE.

Andrade, M.C.\*; Menezes, J.S.<sup>§</sup>, Cassali, G.D.<sup>τ</sup> Cara, DC<sup>τ</sup> & Faria, A.M.C.\*

\*Departamento de Bioquímica e Imunologia, <sup>τ</sup>Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil, 31270-901; <sup>§</sup>Departamento de Imunologia, ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, 05508-900.

Running title: Gastritis and oral tolerance

Keywords: Gastritis, Alcohol, Mucosa, Oral tolerance

Abbreviations: APC/antigen presenting cell, GALT/gut-associated-lymphoid tissue, IEL/intraepithelial lymphocytes, ConA/concanavalin A, CFA/complete Freund's adjuvant, ip/intraperitoneal, DTH/delayed type hypersensitivity reaction

Corresponding author: Ana Maria C. Faria

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas – UFMG  
Av. Antônio Carlos, 6627 Pampulha, Belo Horizonte, 31270-901, MG, Brazil

Tel: (5531) 3499-2630 Fax: (5531) 3499-2640

e-mail: [afaria@icb.ufmg.br](mailto:afaria@icb.ufmg.br)

## ABSTRACT

Antigenic contacts with the gut mucosa usually leads to a state of hyporesponsiveness named oral tolerance. Under normal conditions, high levels of cytokines such as IL-10, TGF- $\beta$  and IL-4 are present in the intestinal microenvironment and play a key role in oral tolerance induction. As a regulatory event, oral tolerance is important for the gut homeostasis preventing the development of local inflammatory reactions against microbial and dietary antigens. Therefore, intestinal inflammatory pathologies are usually associated with abrogation of oral tolerance. Although several studies addressed the relationship between inflammatory bowel diseases (IBD) and immunoregulation in the gut, there is no systematic study on the effects of inflammatory processes in the stomach in oral tolerance induction. Herein we report the development of a novel model of gastritis induced by short-term administration of ethanol and its impact on oral tolerance. C57BL/6 mice treated with alcohol for only four days present an infiltrate of inflammatory cells in the gastric mucosa that characterizes a process of gastritis. Levels of IL-4 and IFN- $\gamma$  are elevated in the stomach. Increase in IL-4 and abolishment of IL-10 production by spleen cells, high levels of serum IgE and the presence of eosinophils after footpad immunization with antigen in these mice suggest that systemic inflammatory events resembling allergic reactions are involved. In addition, oral tolerance is abrogated in ethanol-treated animals for both humoral and cellular immune responses. Our results suggest that short-term ingestion of alcohol is associated with inflammatory events in the gastric mucosa and with the breakdown of immunoregulatory mechanisms that maintain mucosal homeostasis and oral tolerance.



## INTRODUCTION

Mucosal surface, specially the gut mucosa, is constantly and physiologically exposed to a large variety of antigenic materials represented by dietary proteins and bacterial antigens. The gut mucosa also lodges a large and complex gut-associated lymphoid tissue (GALT) that is mainly located in the small intestine (1). Interestingly, the major immunological consequence of the chronic stimulation of lymphocytes at the gut mucosa is a state of systemic hyporesponsiveness to subsequent parenteral challenges with the same antigen named oral tolerance (2).

Many mechanisms have been shown to be involved in oral tolerance induction such as active suppression (3); (4); (5), anergy (6); (7), and clonal deletion (8); (9). Active suppression is based on the generation of regulatory cells following antigenic contact in the GALT that act mostly via secretion of down-regulatory cytokines such as TGF- $\beta$ (10); (11) and IL-10 (12). The mechanisms by which these regulatory cells are induced remains elusive, but it is clear that features of the gut microenvironment are extremely important in their generation.

The intestinal microenvironment, under normal conditions, present high levels of cytokines such as IL-10, TGF- $\beta$  and IL-4 that are believed to be important in the establishment of regulatory events and in the inhibition of inflammatory responses (13, 14). Other local anti-inflammatory mediators are likely to play a role. Prostaglandins, such as PGE<sub>2</sub>, exert many immunomodulatory effects such as downregulation of MHC-II (major histocompatibility complex) (15) and IL-12 receptor expression, upregulation of IL-10 (16) and inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-12 production (17). Interestingly, mucosal lymphocytes usually express markers of

chronically activated cells ( $CD45RB^{low}$ ,  $\alpha4\beta7$  and  $\alpha E\beta7$  integrins,  $CD62L^{lo}$ ,  $CD44^{hi}$ ) some of which have been also identified as suppressor cell markers (12) (18).

Intestinal inflammatory pathologies are usually associated with the breakdown of these multiple regulatory mechanisms. Indeed, administration of cyclophosphamide, a potent immunosuppressive drug, by the oral route is able to induce a mild inflammatory reaction characterized by an increase in intraepithelial lymphocyte (IEL) numbers in mice(19). To achieve an overt inflammation in the gut mucosa, disturbance in key components that maintain intestinal regulation is required. Mice genetically deficient in either  $TCR\alpha$  (20), IL-2 (21) or IL-10 (22) develop an inflammatory bowel disease (IBD) that affects multiple sites in the intestinal tract suggesting that disruption in these genes interfere with the generation of regulatory mechanisms in the gut.

Inflammatory processes in the gut are known to alter intestinal permeability, change the cytokine balance in the mucosa, and hinder oral tolerance induction (23). Although anatomically distinct and devoid of lymphoid tissue, the gastric mucosa is contiguous to the gut mucosa. To our knowledge, there is no systematic study evaluating the repercussions of inflammatory events in the stomach in the induction of oral tolerance.

Herein, we report a novel model of experimental gastritis that is induced by short-term administration of ethanol. In addition, we evaluate the immunological consequences of alcohol-induced gastritis on the gastrointestinal microenvironment and its influence on the establishment of oral tolerance. C57BL/6 mice that were treated with alcohol for only 4 days presented local and systemic immunological alterations. Levels of IL-4 and IFN- $\gamma$  were elevated and secretory IgA (sIgA) production was diminished in the stomach. We also observed elevated levels of IL-4

and abolishment of IL-10 production in the spleen as well as an increase in total serum IgE. In addition, these animals could not be rendered tolerant by the oral route.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Male and female young adult (8- to 10- week-old) C57BL/6 strain mice were obtained from Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (Belo Horizonte, Brasil). They were maintained under normal conditions in our facilities.

### *Gastritis induction*

Gastritis was induced by four daily intragastric administrations (gavage) of ethanol. Gavage procedures were performed using straight gavage needle with either 200  $\mu$ l of ethanol in saline (EtOH 50%w/v, pH 7.0), or only 200  $\mu$ l saline as a control. Twenty four hours after the last administration was determined as the optimal time for the acute inflammatory reaction in the stomach as characterized by histological analyses.

### *Histological analyses*

Animals were sacrificed by cervical dislocation. Stomach, small and large intestines, and liver were excised, washed with cooled PBS and fixed in 10% PBS buffered formalin for 24 hours. After embedded in paraffin, transversal sections of the tissues were obtained (4 $\mu$ m tick), stained with haematoxylin and eosin and examined under a light microscope.

### *Preparation of tissues extracts*

For cytokine measurement from mice with gastritis induction, stomach and small intestine were excised, washed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analyses. An extraction

solution containing 2.34g NaCl, 2 $\mu$ l aprotinin (10000UIC/ml, Sigma, St Louis, MO), 37.2 mg EDTA (VETEC Química, Rio de Janeiro, RJ), 4.48 mg BC (Benzotonic Chloride, Sigma, St Louis, MO), 1.7 mg phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, St Louis, MO), 500 mg BSA (Bovine serum albumin, Sigma, St Louis, MO) and 50 $\mu$ l Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) in 100ml milli-Q water was added in the tissue samples (1ml for each 100 mg of tissue). Samples were vigorously mixed and homogenates were centrifuged at 10000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatants were removed and stored at -20°C for cytokine measurement by ELISA.

#### *Splenic cell preparation*

Spleens were aseptically removed 24 h after the last ethanol treatment for cytokine analysis. Briefly, cell suspensions were prepared using a tissue homogenizer. Red blood cells were lysate by incubating cells with 9 ml destiled water and adding 1 ml 10X PBS solution shortly thereafter. Cells were then centrifuged and plated in 96-well- flat bottom plates (NUNC, Naperville, IL) at  $1 \times 10^6$  cells/well in complete RPMI 1640 supplemented with sodium piruvate, nonessential and essential amino acids,  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% FCS, penicilin/streptomycin, and cultured at 37°C in a humidified 6% incubator. All cultures were performed in duplicates in a total volume of 400 $\mu$ l either alone or in the presence of 4 $\mu$ g/ml or 10 $\mu$ g/ml ConA (Sigma, St Louis, MO) or 1mg/ml Ova. Supernatants were collected after 24 hours for IL-2 detection and 72 hours for IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 and IL-10 detection.

#### *Cytokine measurement by ELISA*

Levels of IL-2, IL-4, IL-10, and IFN- $\gamma$  in the cell culture supernatants and in the tissues homogenates were determined by capture ELISA as described previously (24).

Briefly, supernatants were added to microtiter plates (NUNC, Naperville, IL), previously coated with rat anti-mouse IL-2, IL-4, IL-10 or IFN- $\gamma$  mAb (PharMingen, San Diego, CA) at 1-5  $\mu\text{g/ml}$  and blocked with PBS-Casein 0.25%. Standards and samples were incubated overnight at 4°C. Biotinylated rat anti-mouse IL-2, IL-4, IL-10, or IFN- $\gamma$  mAb (PharMingen, San Diego, CA) were added and followed by peroxidase-labeled streptavidin (Sigma, St. Louis, MO). Detection was accomplished by addition of 100  $\mu\text{l/well}$  0.04%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and orthophenylenediamine (OPD, 1mg/ml) in sodium citrate buffer. Color development was read at 495 nm after addition of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Cytokine levels were calculated from a standard curve obtained with recombinant cytokines (PharMingen, San Diego, CA) and results were expressed in  $\text{pg/ml}$  or  $\text{ng/ml}$ . Threshold sensitivities of ELISA assays were 80pg/ml, 320 pg/ml, 4 pg/ml and 80 pg/ml for IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 respectively.

#### *Analysis of immunoglobulin isotypes by ELISA*

Levels of isotype-specific immunoglobulins (Ig) in gastrointestinal lavage samples and serum were determined by ELISA. Briefly, 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$  goat anti-mouse Ig (100  $\mu\text{l}$  at 1  $\mu\text{g/ml}$ ; Southern Biotechnology, Birmingham, AL) in coating buffer pH 9.8. Wells were blocked with 200  $\mu\text{l}$  of PBS contain 0.25% casein for 1h at room temperature. After washing the plates six times, serial dilutions of samples were added to wells and incubated for 1 h at 37°C. Plates were washed six times again and 0.5  $\mu\text{g/ml}$  biotinylated goat anti-mouse  $\mu$ ,  $\gamma$  or  $\alpha$  heavy chain-specific polyclonal antibodies (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) were added and then incubated for 1 h at 37°C. After 6 washes, a detection solution containing a 1/2000 dilution of horse-radish peroxidase-conjugated streptavidin (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) was added and incubated for

30 min. After washing, the color reaction was developed at room temperature with 100µl/well of OPD (1 mg/ml), 0,04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate in sodium citrate buffer. The reaction was interrupted by the addition of 20 µl/well of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was measured at 495 nm by an ELISA reader (BIORAD) and immunoglobulins concentrations were determined by a standard curve.

#### *Induction and assessment of oral tolerance*

To assess the effect of gastritis on oral tolerance, mice were treated with single or continuous feeding. Mice received a single feeding of 20mg Ova (fraction III, Sigma, St Louis, MO) in 0.2 ml of saline or only saline by gavage. Continuous feeding refers to the administration of the antigen in the drinking water. Total daily dose of antigen in this regimen is calculated based on the average consumption per mouse (5ml/day). Bottles containing Ova (5mg/ml) in the drinking water during 4 days were changed every day to avoid contamination. For specific antibody measurement, seven days later, all mice were immunized intraperitoneally (i.p.) with 10µg Ova in 3mg Al(OH)<sub>3</sub> to evaluate serum specific antibody production. A booster with 10µg Ova was administered 14 days thereafter and 7 days later, sera were collected. Oral tolerance induction was also assessed by measuring the development of delayed type hypersensitivity reaction using ovalbumin as antigen and complete Freund's adjuvant.

#### *Delayed type hypersensitivity reaction (DTH)*

For cellular reactivity *in vivo* by delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction protocol, after seven days of tolerogenic treatment, mice were subcutaneously (s.c.) injected in the base of the tail with 100µg Ova in 40µl CFA (Complete Freund Adjuvant, Sigma,

St Louis, MO). Thirty days after immunization, animals were challenged with 600µg of heat-aggregated Ova in 30µl saline in the footpads as described previously (25). Cellular reactivity was measured by the increment in footpad thickness 24, 48 and 72 hours after challenge. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM of the difference between right and left footpads that received saline and Ova, respectively.

#### *Footpad histological examination*

Histologic examination of the DTH reaction in the footpads was performed as described below. Footpad tissue samples were collected 24, 48 and 72 hours after the challenge with Ova and immersed in formalin for 24 hours. After embedded in paraffin, transversal sections of the tissues were obtained (4µm tick), stained with haematoxilin and eosin and examined under a light microscope.

#### *Analysis of anti-Ova serum antibodies*

Ninety six-well ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4°C with 2µg/well Ova in coating buffer. Plates were blocked with 200 µl/well of PBS contain 0.25% casein for 1h at room temperature. After washing with PBS containing 0.1% Tween-20, serum samples were diluted in PBS/0.25% casein (starting at 1/100), and dilutions were made. Plates were incubated for 1 h at 37°C, washed six times and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody for 1h at 37°C. After 6 washes, the color reaction was developed at room temperature with 100µl/well of OPD (1 mg/ml), 0,04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate in sodium citrate buffer. The reaction was interrupted by the addition of 20 µl/well of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was measured at 492 nm by an ELISA reader (BIORAD). Scores is based in a single



point value of serum dilution. Each score is shown as a mean  $\pm$  SEM of a group. Differences between groups were determined by two-tailed Student's t-test.

*Statistical analysis*

Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM and significance between groups was determined by two-tailed Student's t-test.

## RESULTS

### *Acute gastritis is induced by short-term alcohol treatment.*

To induce gastritis, C57BL/6 mice were treated intragastrically with either ethanol (EtOH 50% v/v) in saline or only saline (control mice) for 4 consecutive days and sacrificed 24h after the last treatment. Macroscopical examination of the stomachs of alcohol-treated mice showed lesions in the stomach wall and intense hyperaemia mostly in the corpus region (data not shown). When compared to saline-treated mice (Figure 1A), the morfological analyses of alcohol-treated mice (Figure 1B) characterized inflammatory alterations in the mucosal and submucosal tissue that are typical of acude gastritis: hyperaemia, edema, mixed cellular infiltrate with mononuclear and polymorphonuclear cells. Some hemorrhagic foci in *lamina propria*, and erosive spots in the epithelial surface were also observed in the gastric mucosa.

The consequences of alcohol treatment were stomach-restrict since there were no inflammatory alterations in any portion of the small or large intestine of alcohol-treated mice. Moreover, the number of *lamina propria* cells and of intraepithelial lymphocytes (IELs) throughout the intestinal mucosa was similar to the one found in control animals. No change was found in the liver of alcohol-treated mice either (data not shown).

### *Mice with alcohol-induced gastritis present an increase in IFN- $\gamma$ and IL-4 production in the stomach.*

To investigate the local immunological consequences of gastritis, we analysed the profile of cytokines secreted by cells from gastric and intestinal mucosa. Stomachs and small intestines from control and alcohol-treated mice were removed twenty four hours after the last ethanol treatment, and the latter was subdivided in duodenum,

proximal and distal jejunum, and ileo. Local production of cytokines was detected by ELISA in supernatants obtained from tissue extracts. Figure 2 shows that mice with gastritis but not control mice presented elevated levels of IL-4 in the stomach and a decrease in the jejunum. Presence of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$ , was also elevated in stomach after alcohol treatment. IL-10, an important cytokine involved in regulatory mechanisms on mucosal surfaces, was altered neither in stomachs nor in intestines of alcohol-treated animals (data not show). Thus, the inflammatory process in the stomach presented a mixed pattern of inflammatory cells as demonstrated by the morphological analyses (Figure 1), and resulted in local increase of both Th1 and Th2 cytokines.

*Abolishment of IL-10 and increase in IL-4 production by spleen cells from alcohol-treated mice after in vitro stimulation.*

To assess the systemic effects of the inflammatory process triggered in gastric mucosa, spleen was chosen due to its importance in systemic immunity. Spleens were removed 24 hours after the last alcohol treatment and pooled cells were cultured *in vitro* in the presence of Concanavalin A (ConA), a polyclonal activator. Cytokine concentration in the supernatants were measured by ELISA. No difference was observed in IFN- $\gamma$  production between the two groups. A slight increase in IL-2 levels seemed to occur in cultures of spleen cells from alcohol-treated mice (data not shown). A clear difference between groups was present for both IL-4 and IL-10 production (Figure 3). IL-4 levels were only detectable, in the present culture conditions, in spleen cells from alcohol-treated mice. Interestingly, production of IL-10 was fully abolished in mice with gastritis. Since cytokines are important for determining isotype switching, we evaluated the concentration of the different isotypes

of immunoglobulin in these mice. Analysis of serum immunoglobulins showed that there was a significant increase in IgE levels in ethanol-treated mice as compared to control mice (Figure 4B). No alteration in the serum levels of total or of other subtypes (IgM, IgG, IgA) of immunoglobulin were detected in ethanol-treated mice (Figure 4A).

*Oral tolerance induction is abrogated in mice with alcohol-induced gastritis.*

To evaluate the repercussions of the inflammatory alterations in the gastric mucosa on the physiologic immunological events in the mucosa, oral tolerance to ovalbumin (Ova) was assessed by both humoral and cellular responses. We fed C57BL/6 either by a single gavage of 20 mg ovalbumin (Grade III, Sigma) or by continuous feeding of equivalent doses of Ova for 4 consecutive days. For humoral response, all mice were immunized ip with Ova adsorbed in alumen, as described in Methods, and serum anti-Ova antibodies were measured by ELISA. Oral tolerance to antibody production was observed in saline-treated control mice. Ova fed mice produced significantly lower levels of anti-Ova antibody as compared to saline fed mice (Figure 5A). However, in alcohol-treated mice, oral administration of Ova either by gavage (Figure 5A) or continuous feeding (Figure 5B) did not result in antibody suppression suggesting either ethanol administration or the resulting gastritis hindered oral tolerance induction in these mice.

Oral tolerance induction was also assessed by a cellular *in vivo* response which is DTH reaction. Reaction was measured as footpad increment after subcutaneous challenge with heat-aggregated Ova in mice previously immunized with Ova adsorbed in CFA. In Ova-fed control mice, footpad thickness was significantly smaller as compared to saline fed mice (Figure 6) suggesting oral tolerance was

induced. Histologically, no inflammatory reaction was observed in the footpad of Ova-fed control mice 24 hours after challenge (Figure 7B) and the same morphological features were maintained steadily up to the reaction peak (72 hours, data not show). In contrast, in saline-fed control mice (Figure 7A), 24 hours after challenge, there was an intensive cellular reaction with the presence of mono and polymorphonuclear cells such as neutrophils, lymphocytes and some eosinophils (see arrows). No change in the cellular infiltrate was observed 72 hours after challenge (data not show). On the contrary, in alcohol-treated mice, suppression of inflammatory reaction could be observed only after 24 hours. An intensive inflammatory infiltrate and edema was observed in saline-fed group 24 hours after challenge (Figure 7C) with progressive decline thereafter (48 and 72 hours). In Ova-fed mice, cellular infiltrate was as intensive as in saline-fed mice but edema was discrete (Figure 7D). Therefore, the transitory suppression observed in Ova-fed-alcohol-treated mice may be due to differences in the initial steps of inflammatory process such as intensity of edema. After 48 and 72 hours, there was no significant difference in footpad thickness between saline-fed and Ova-fed mice. Moreover, histological characteristics of the DTH reaction in alcohol-treated mice also differs from the one observed in control mice. In alcohol-treated mice of both groups a marked infiltrate of eosinophils (Figure 7F and 7G, see arrows) was observed whereas these cells are very rare among the cellular infiltrate of control mice (Figure 7E, see arrows). Our results suggests that alcohol treatment induced a shift in the pattern of inflammatory reaction elicited by antigen and CFA towards an allergic-type reaction with a predominance of eosinophils.

## DISCUSSION

Oral tolerance is a physiological phenomenon that maintains immunological homeostasis for the constant mucosal stimulation by food proteins and microorganisms. It is known that the small intestine, mainly the proximal portions, play a special role in the immunological events taking place in the gut mucosa because it is where antigens are absorbed and most of the gut-associated-lymphoid tissue is located (26, 27). Several experimental models of inflammatory bowel disease and their detrimental effect on oral tolerance induction have been reported in the literature. To our knowledge, no systematic study have addressed the effects of inflammatory processes in the gastric mucosa in oral tolerance development. We presented data demonstrating that an inflammatory condition triggered by acute alcohol administration which is restricted to the gastric mucosa has an impact on oral tolerance induction. Moreover, these effects are associated with systemic and local disturbances in cytokine production.

There are reports on different protocols designed to induce experimental gastritis such as administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs(28); (29) (30, 31) and chronic ingestion of alcohol (32). We chose to use alcohol because it is a highly consumed substance and therefore the consequences of its use have immediate clinical relevance. Differently from models of chronic administration of alcohol, in our study, C57BL/6 were mice treated with alcohol for only four days. Mice that received ethanol present several macro and microscopic alterations in the stomach. Macroscopically, we observed hyperemia and an increase in the size of the stomach (data not shown). Gastromegaly has been reported to be associated with motility dysfunction in gastrointestinal disorders related to eosinophilic inflammation (33). In

our model, only few eosinophils are observed in the stomach as compared to other allergic models of gastritis. However, a similar eosinophilic inflammatory reaction might occur in the stomach provided the animals were challenged with an antigen such as ovalbumin. Histological analysis of the stomachs of ethanol-treated mice shows an infiltrate of polymorpho and mononuclear cells, hemorrhage, and edema. Gastric production of cytokines as distinct as IFN- $\gamma$  and IL-4 are also increased suggesting that a mixed type of inflammatory reaction was triggered locally by alcohol administration. Surprisingly, increased levels of IL-4 are observed in the proximal jejunum although no morphological alterations could be found in the intestinal mucosa. Also, a significant reduction in the levels of this cytokine in distal regions of the small intestine is found suggesting that alcohol-induced gastritis has an impact on the balance of IL-4 production throughout the gastro-intestinal tract. Production of IL-10, an important cytokine involved in immune suppressive processes(14, 34), is altered neither in the stomach nor in the small intestine. It is important to note that no histological signs of inflammation, not even increase in intraepithelial lymphocyte or *lamina propria* cell numbers, is detected in any portion of the intestine.

Several authors have studied the immunological effects of short term and chronic consumption of alcohol. These immunological alterations include suppression of Th1-type cytokine production (35-37), reduced levels of interleukin-2 (IL-2) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), alterations in the number of various subsets of lymphocytes (38, 39), impairment in the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 by human macrophages and murine Kupffer cells (40, 41). Our results show that short term treatment of mice with alcohol is associated with systemic changes in the production of IL-4 and IL-10 by spleen cells. When cultured *in vitro* with a polyclonal activator of T cells, spleen

cells from ethanol-treated mice produce higher levels of IL-4 as compared to cell cultures from control mice, where this cytokine is not detectable. This is a remarkable finding since C57BL/6 mice is a strain known to produce predominantly Th1 cytokines upon unspecific stimulation (42). Our results are in agreement with recent studies showing that glutathione (GSH) levels in antigen presenting cells (APCs) is an important factor in the prevalence of Th1 versus Th2 profile of immune responses (43), and that ethanol is a potent inhibitor of the glutathione synthesis. It is likely that inhibition of glutathione affects the ability of spleen APCs to produce IL-12, as already described in other models (44), compromising IFN- $\gamma$  production by T cells and allowing for the development of IL-4-producing T cells. IL-4 is a crucial cytokine to promote switching to IgE and IgG1 in mice and to IgE and IgG4 in humans (45, 46). As expected, our results show that upregulation of IL-4 production by spleen cells is associated with a significant increase in serum levels of total IgE in ethanol-treated mice. Analysis of total Ig, IgG, IgM or IgA shows no other alterations in serum immunoglobulin production suggesting that the process of class switch to IgG1 is not affected and that the increase in IgE levels is not enough to change the total production of immunoglobulins by these animals. However, IgE is a potent mediator of allergic inflammatory reactions, and increase in its total concentration in the serum of these animals suggests an allergic component related to the ethanol-induced gastritis. Recent population-based studies also support the notion that moderate levels of alcoholic drink consumption are associated with increased levels of IgE and it may play a role in the development of allergic disease (47). Moreover, in our study, spleen cells from ethanol-treated mice did not produce IL-10 when stimulated *in vitro*. IL-10 is an important cytokine involved in regulatory mechanisms in the gut and its genetic deficiency has been associated with breakdown of oral tolerance to intestinal



microbiota and development of inflammatory bowel disease (22). IL-10 has been also associated to induction of nasal tolerance and its suppressive effects on allergic inflammation in the lung (48).

Evaluation of oral tolerance susceptibility in ethanol-treated mice shows that oral tolerance induction is severely impaired in these animals. We analysed development of tolerance to both humoral and cellular responses. It is known that several factors may affect the induction of oral tolerance and, among them, the regime of feeding seem to be crucial. Experiments in mice have demonstrated that multiple feedings are more effective than single feeding and that continuous feeding is the most effective regime for oral tolerance induction (49) (50, 51). We observed that oral tolerance is totally abrogated in alcohol-treated mice for specific antibody production, independently of the feeding protocol used. This interference in oral tolerance induction is mediated by the acute effects of alcohol treatment since animals fed Ova 30 days after alcohol treatment are no longer refractory to oral tolerance induction by a single feeding of Ova (data not shown).

Suppression of cellular immune response is only achieved in the first 24 hours after challenge with the antigen in the footpad. At this time point, suppression of the edema probably accounts for the difference in the footpad increment since there is no difference in the intensity of the cellular infiltrate. No suppression was observed after 48 or 72 hours after challenge suggesting that recruitment of inflammatory cells is not inhibited. The predominant cellular type in the footpad infiltrate from alcohol-treated mice are eosinophils supporting the hypothesis that the late phase of an inflammatory allergic process instead of a Th1-type cellular DTH reaction is triggered by footpad immunization in these mice. Therefore, the effect of ethanol treatment in oral tolerance induction seem to be associated with acute events but its systemic impact in

the profile and progression of systemic inflammatory events last much longer than the gastritis process.

Most of the reports on active suppression in oral tolerance induction agree that the predominance of a Th2 profile in the gut microenvironment is crucial to establishment of the phenomenon (2, 52). On the other hand, breakdown of oral tolerance has been usually associated with inflammatory reactions in the gut due to increased permeability of the mucosa and disturbances in the local cytokine network. Our results clearly show that inflammatory events in regions distinct but contiguous to the gut may also abrogate oral tolerance induction. On the other hand, the pattern of inflammation-related cytokines we found is a mixed one with an important component that is typical of a Th2 profile. There is an increase in IFN- $\gamma$  production in the gastric mucosa, yet IL-4 production seem to be upregulated in the gastric mucosa, small intestine and spleen of ethanol-treated mice and serum IgE levels are significantly increased. Therefore, the inflammatory reaction in the stomach of alcohol-treated mice seem to be an allergic reaction and its immediate consequence is the breakdown of oral tolerance to recently ingested antigens. The occurrence of a local inflammatory reaction with systemic consequences after such a short term treatment with alcohol raises important clinical implications that our model may help to study.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Danielle Souza, Vanessa Pinho and Dr. Mauro Teixeira from Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG for their help in the preparation of tissue extracts for cytokine measurements. We thank Adolfo Firmino for helping with the

PDF version of manuscript, Ms Frankinéia Aparecida de Assis and Ms Ilda Martins Marçal de Souza for their excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Mowat A. M., & Viney J. L. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immuno. Rev.* **156**: 145.
2. Faria A. M., & Weiner H. L. 1999. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol* **73**: 153.
3. Mowat A. M. 1987. The regulation of immune responses to dietary proteins. *Immunol.Today* **8**: 93.
4. Strobel S., Mowat A. M., Drummond H. E., Pickering M. G., & Ferguson A. 1983. Immunological responses to fed protein antigens in mice. II. Oral tolerance for CMI is due to activation of cyclophosphamide-sensitive cells by gut-processed antigen. *Immunology* **49**: 451.
5. Gautam S. C., Chikkala N. F., & Battisto J. R. 1990. Oral administration of the contact sensitizer trinitrochlorobenzene: initial sensitization and subsequent appearance of a suppressor population. *Cell.Immunol.* **125**: 437.
6. Melamed D., & Friedman A. 1993. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur.J.Immunol.* **23**: 935.
7. Whitacre C. C., Gienapp I. E., Orosz C. G., & Bitar D. M. 1991. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelites. III. Evidence for clonal anergy. *J.Immunol.* **147**: 2155.
8. Chen Y., Inobe J., Marks R., Gonnella P., & Kuchroo V. K. 1995. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* **376**: 177.

9. Marth T., Strober W., & Kelsall B. 1996. High dose oral tolerance in Ovalbumin TCR-transgenic mice. Systemic neutralization of IL-12 augments TGF- $\beta$  secretion and T cell apoptosis. *J. Immunol.* **157**: 2348.
10. Miller A., Lider O., Roberts A. B., Sporn M. B., & Weiner H. L. 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vivo* and *in vitro* immune response by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **89**: 421.
11. Powrie F., Carlino J., Leach M. W., Mauze S., & Coffman R. L. 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* **183**: 2669.
12. Asseman C., Mauze S., Leach M. W., Coffman R. L., & Powrie F. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**: 995.
13. Husband A., Beagley K., & McGhee J. 1999. Mucosal cytokines, *Mucosal Immunology* 2nd ed., Academic Press, London, 1628 pp.
14. Daynes R. A., Araneo B. A., Dowell T. D., Huang K., & Dudley D. 1990. regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J. Exp. Med.* **171**: 979.
15. Snyder D. S., Beller D. I., & Unanue E. R. 1982. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature* **299**: 163.
16. Kalinski P., Hilkens C. M., Snijders A., Snijdewint F. G., & Kapsenberg M. L. 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of

- prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* **159**: 28.
17. van der Pouw Kraan T. C., Boeijs L. C., Smeenk R. J., Wijdenes J., & Aarden L. A. 1995. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med* **181**: 775.
  18. Powrie F., Correa-Oliveira R., Mauze S., & Coffman R. L. 1994. Regulatory interactions between CD45RB<sup>high</sup> and CD45RB<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* **179**: 589.
  19. Mowat A. M., & Ferguson A. 1981. Hypersensitivity in the small intestinal mucosa. *Clin. Exp. Immunol.* **43**: 574.
  20. Mombaerts P., Mizoguchi E., Grusby M. J., Glimcher L. H., Bhan A. K., & Tonegawa S. 1993. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* **75**: 274.
  21. Sadlack B., Merz H., Schorle H., Schimpl A., Feller A. C., & Horak I. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene [see comments]. *Cell* **75**: 253.
  22. Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., & Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**: 263.
  23. Powrie F., & Leach M. W. 1995. Genetic and spontaneous models of inflammatory bowel disease in rodents: evidence for abnormalities in mucosal immune regulation. *The Immunol* **2**: 115.
  24. Maron R., Hancock W. W., Slavin A., Hattori M., Kuchroo V., & Weiner H. L. 1999. Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis

- in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol* **11**: 1573.
25. Titus R. G., & Chiller J. M. 1981. Orally-induced tolerance. Definition at the cellular level. *Internat.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **65**: 323.
26. Mestecky J. 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J.Clin.Immunol.* **7**: 265.
27. van der Heidjen P. J., Stock W., & Bianchi A. T. J. 1987. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total "background" immunoglobulin production. *Immunology* **62**: 551.
28. Kim T. I., Lee Y. C., Lee K. H., Han J. H., Chon C. Y., Moon Y. M., Kang J. K., & Park I. S. 2001. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae of mice: apoptosis, cell proliferation, and inflammatory activity. *Infect Immun* **69**: 5056.
29. Barnett K., Bell C. J., McKnight W., Dickey M., Sharkey K. A., & Wallace J. L. 2000. Role of cyclooxygenase-2 in modulating gastric acid secretion in the normal and inflamed rat stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G1292.
30. Beck P. L., Xavier R., Lu N., Nanda N. N., Dinauer M., Podolsky D. K., & Seed B. 2000. Mechanisms of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. *Gastroenterology* **119**: 699.
31. Okada A., Kinoshita Y., Waki S., Fukui H., Maekawa T., Matsushima Y., Kawanami C., Kishi K., Nakata H., Wang H. Y., Hassan S., & Chiba T. 1998. Rat gastric mucosal cells express ICAM-1 and proinflammatory cytokines during indomethacin-induced mucosal injury. *J Lab Clin Med* **131**: 538.

32. Si J., Zhou W., Wu J., Cao Q., Xiang Z., Jiang L., Lu W., & Huang H. 2001. Establishment of an animal model of chronic atrophic gastritis and a study on the factors inducing atrophy. *Chin Med J (Engl)* **114**: 1323.
33. Hogan S. P., Mishra A., Brandt E. B., Royalty M. P., Pope S. M., Zimmermann N., Foster P. S., & Rothenberg M. E. 2001. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. *Nat Immunol* **2**: 353.
34. Xu-Amano J., Aicher W. K., Taguchi T., Kiyono H., & McGhee J. R. 1992. Selective induction of TH2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. *Internatl.Immunol.* **4**: 433.
35. Wang Y., Huang D. S., Wood S., & Watson R. R. 1995. Modulation of immune function and cytokine production by various levels of vitamin E supplementation during murine AIDS. *Immunopharmacology* **29**: 225.
36. Watson R. R., Borgs P., Witte M., McCuskey R. S., Lantz C., Johnson M. I., Mufti S. I., & Earnest D. L. 1994. Alcohol, immunomodulation, and disease. *Alcohol Alcohol* **29**: 131.
37. Watzl B., Lopez M., Shahbazian M., Chen G., Colombo L. L., Huang D., Way D., & Watson R. R. 1993. Diet and ethanol modulate immune responses in young C57BL/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res* **17**: 623.
38. Chen G. J., Huang D. S., Watzl B., & Watson R. R. 1993. Ethanol modulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by murine splenocytes and macrophages. *Life Sci* **52**: 1319.
39. Lopez M. C., Huang D. S., Borgs P., Wang Y., & Watson R. R. 1994. Modification of lymphocyte subsets in the intestinal-associated immune

- system and thymus by chronic ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* **18**: 8.
40. Gallucci R. M., & Meadows G. G. 1995. Ethanol consumption reduces the cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. *Alcohol Clin Exp Res* **19**: 402.
41. Bermudez L. E. 1994. Effect of ethanol on the interaction between the macrophage and *Mycobacterium avium*. *Alcohol* **11**: 69.
42. Virelizier J. L. 1982. Murine genotype influences the in vitro production of gamma (immune) interferon. *Eur J Immunol* **12**: 988.
43. Peterson J. D., Herzenberg L. A., Vasquez K., & Waltenbaugh C. 1998. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3071.
44. Sarnstrand B., Jansson A. H., Matuskeviciene G., Scheynius A., Pierrou S., & Bergstrand H. 1999. N,N'-Diacetyl-L-cystine-the disulfide dimer of N-acetylcysteine-is a potent modulator of contact sensitivity/delayed type hypersensitivity reactions in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* **288**: 1174.
45. Fallon P. G., Jolin H. E., Smith P., Emson C. L., Townsend M. J., Fallon R., & McKenzie A. N. 2002. IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* **17**: 7.
46. Tangye S. G., Ferguson A., Avery D. T., Ma C. S., & Hodgkin P. D. 2002. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol* **169**: 4298.
47. Vally H., & Thompson P. J. 2003. Alcoholic drink consumption: a role in the development of allergic disease? *Clin. Exp. Allergy* **33**: 156.



48. Akbari O., DeKruyff R. H., & Umetsu D. T. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* **2**: 725.
49. Saklayen M. G., Pesce A. J., Pollak V. E., & Michael J. G. 1984. Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. *Internat.Arch. Allergy Appl.Immunol.* **73**: 5.
50. Peng H.-J., Turner M. W., & Strobel S. 1989. The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunol.* **67**: 425.
51. Faria A. M., Maron R., Ficker S. M., Slavin A. J., Spahn T. W., & Weiner H. L. 2003. Oral tolerance induce by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor- $\beta$ /interleukin-10 and suppression of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Autoimmunity* **in press**.
52. Khoury S. J., Hancock W. W., & Weiner H. L. 1992. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelites are associated with down-regulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor  $\beta$ , interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J. Exp. Med.* **176**: 1355.

## Legends

**Figure 1-** Histological analyses of the stomach. Visualization of mucosa (M) and submucosa (SM) from corpus region of stomachs of C57BL/6 mice treated either with saline (A) or ethanol (B) 24 hours after the last administration. Pictures are at X30 magnification.

**Figure 2-** Production of IL-4 and IFN- $\gamma$  in stomach and small intestine of control and ethanol-treated C57BL/6 mice. Tissue extracts from stomach (S), duodenum (Dd), proximal (PJ) and distal jejunum (DJ) and ileum (I) from C57BL/6 treated with either saline (solid bar) or ethanol (open bar) were prepared 24 hours after the last ethanol administration. IL-4 and IFN- $\gamma$  were measured in the extract supernatants by quantitative ELISA. Bars represent values (mean  $\pm$  SEM) of a group (n=5). \*p<0.05 (two-tailed Student t-test).

**Figure 3-** Production of cytokines by stimulated spleen cells. Cells were isolated from spleen of control (solid bar) and gastritis- induced (open bar) mice 24 h after the last ethanol administration. They were pooled and stimulated *in vitro* with concanavalin A (4 $\mu$ g/ml). IL-4, IFN- $\gamma$  and IL-10 were measured in the culture supernatants after 72 hours by quantitative ELISA.

**Figure 4-** Serum concentrations of total immunoglobulins, IgM, IgG, IgA (A) and IgE (B). Normal (solid bar) and ethanol-treated C57BL/6 mice (open bar) were bled 24 hours after the last ethanol administration and serum immunoglobulin levels were determined by ELISA. Bars represent values (mean  $\pm$  SEM) of a group (n=5).

**Figure 5-** Specific antibody production after oral tolerance induction. Twenty four hours after the last ethanol administration, C57BL/6 mice were fed either saline (solid bar) or 20 mg of Ova (open bar) by gavage (A) or continuous feeding (B). All animals were challenged ip with Ova in alumen, 7 days thereafter and boosted with soluble Ova 14 days later. Specific antibody production was measured in serum 7 days later by ELISA. Bars represent values (mean  $\pm$  SEM) of a group (n=5) at an optimal serum dilution (1:400 –A; 1:10000- B). \*p<0.05 (two-tailed Student t-test).

**Figure 6-** Delayed type hypersensitivity reaction after oral tolerance induction. Twenty four hours after the last ethanol administration, control and ethanol-treated C57BL/6 mice were fed either 20 mg Ova (Ova fed) or saline (saline fed). Seven days thereafter, all mice were immunized in the base of the tail with 100  $\mu$ g Ova in CFA. After 30 days, animals received a challenge with heat-aggregated Ova in the footpads. Footpad increment was measured 24, 48 and 72 hours after challenge. Bars represent mean  $\pm$  SEM between right and left footpads that were challenged with saline and Ova, respectively. \*p<0.05 (two-tailed Student t-test).

**Figure 7-** Histological analyses of footpads after DTH reaction. Footpad tissue samples from control (A, B) and ethanol-treated mice (C, D) were collected 24, 48 and 72 hours after challenge in saline fed (A, C) and Ova fed (B, D) groups. Pictures are at X12 magnification. E, F and G show details from A, C and D, respectively, at X300 magnification. Arrows show eosinophils.

FIGURE 1

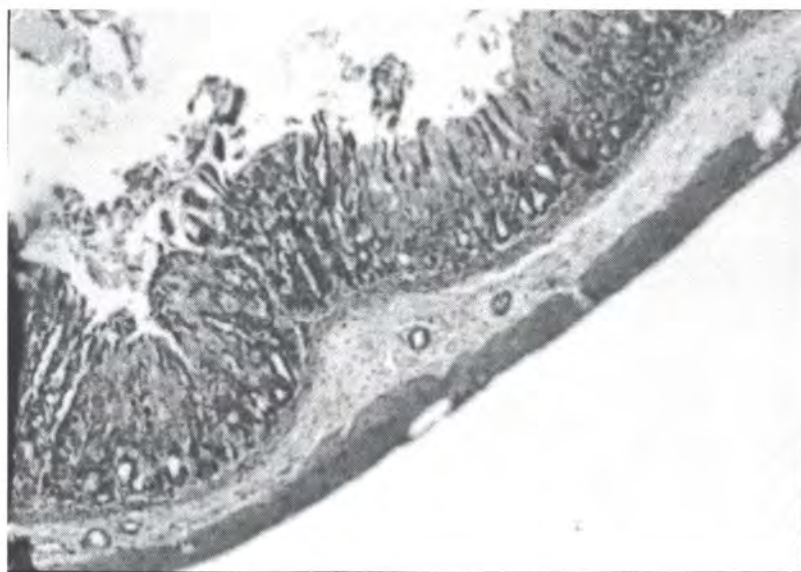
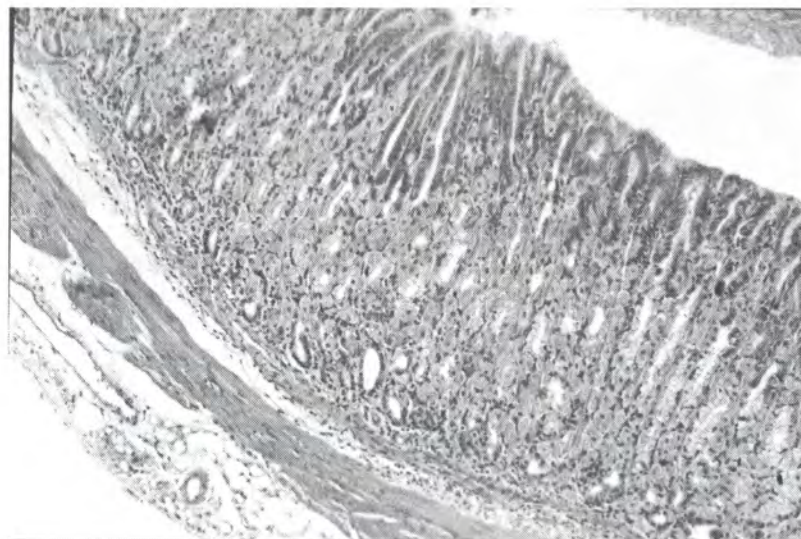


FIGURE 2

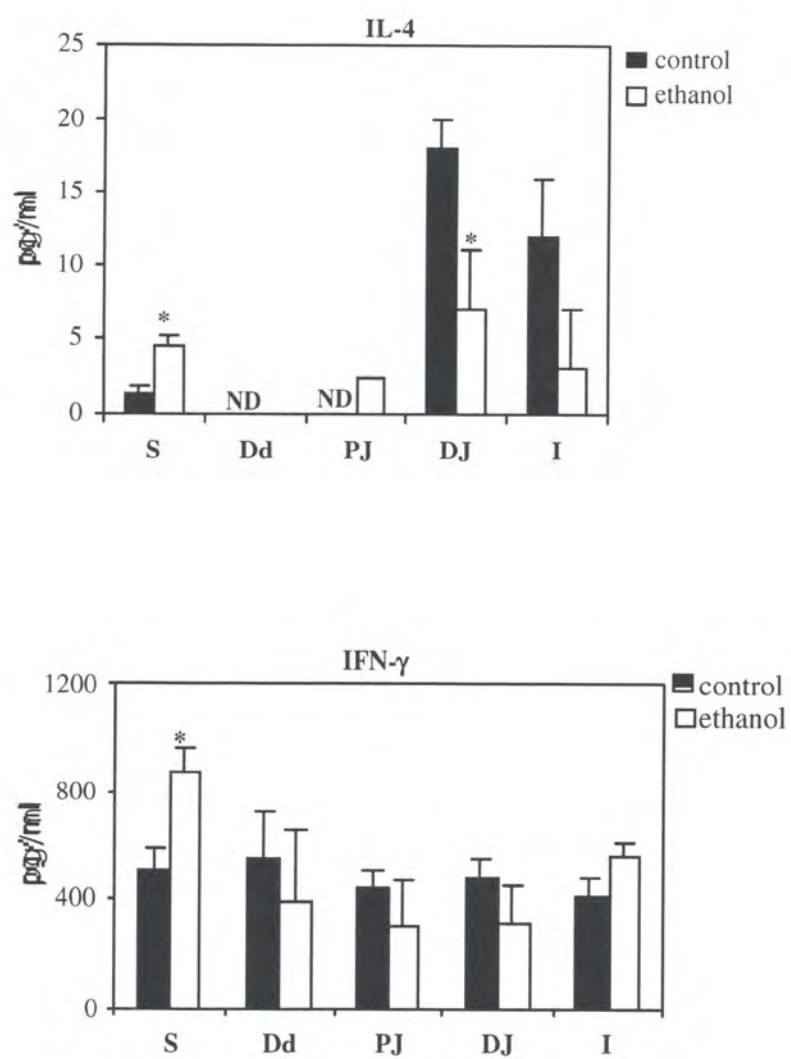


FIGURE 3

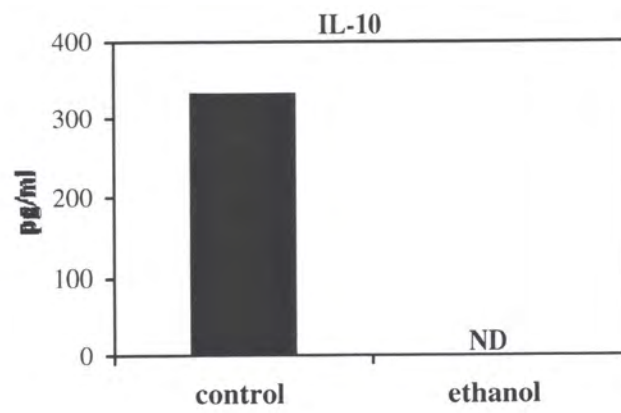
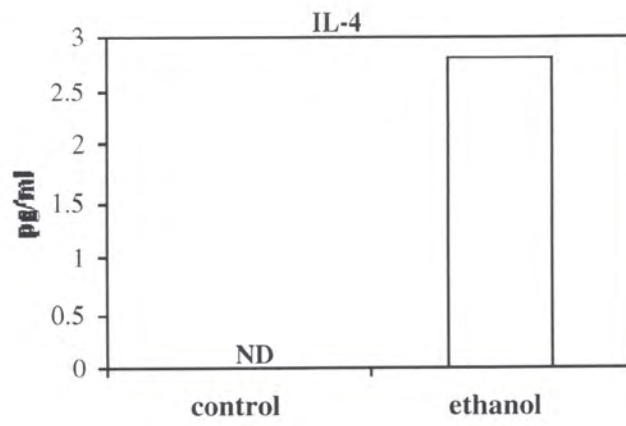


FIGURE 4

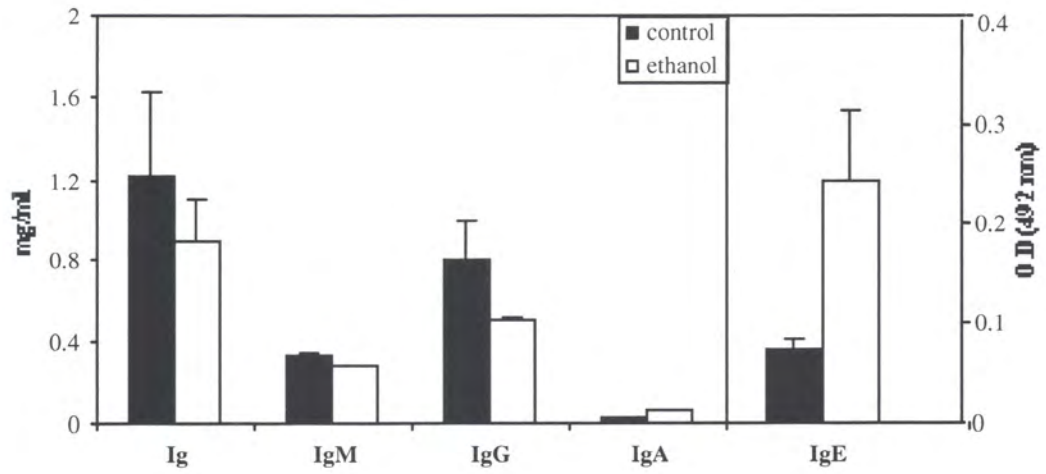


FIGURE 5

## SPECIFIC ANTIBODY PRODUCTION

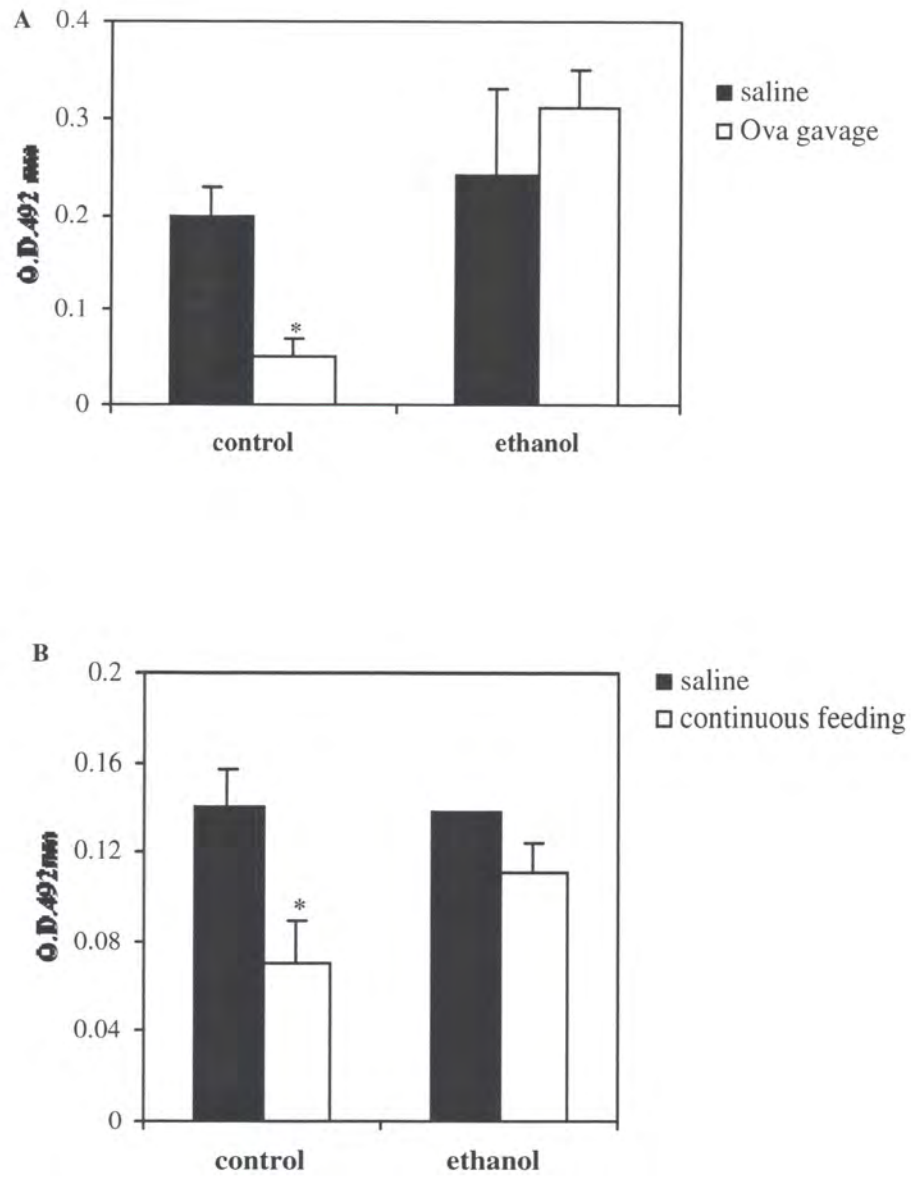




FIGURE 6

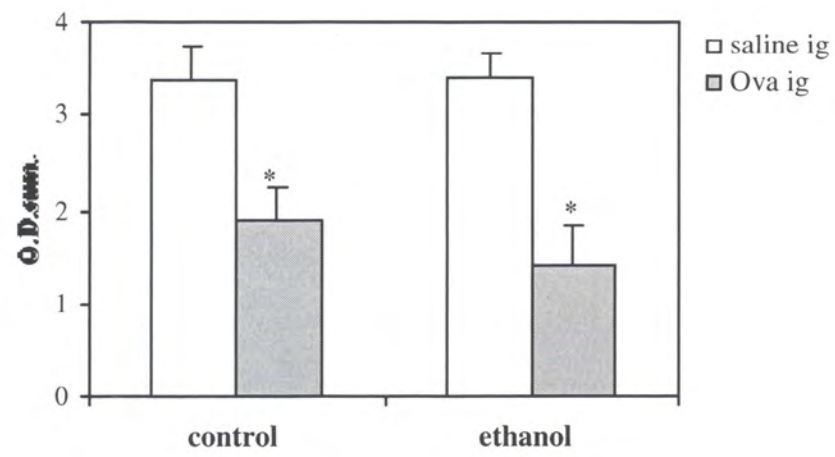


FIGURE 7

