Luana Pereira Antunes Dourado

PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS NA AVERSÃO E ALERGIA ALIMENTAR INDUZIDA À OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2006

Luana Pereira Antunes Dourado

PARTICIPAÇÃO DAS CITOCINAS NA AVERSÃO E ALERGIA ALIMENTAR INDUZIDA À OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª Drª Denise Carmona Cara Machado
Departamento de Patologia Geral - ICB – UFMG
Colaboradora:
Profª Drª Danielle da Glória de Souza
Departamento de Microbiologia - ICB – UFMG

Belo Horizonte
2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuro Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
Contamos com apoio financeiro do CNPq e da FAPEMIG.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim; esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da tristeza. Todo caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta.”

(Guimarães Rosa)

Dedico este trabalho aos meus pais por terem me apoiado e me incentivado, possibilitando que eu chegasse até aqui. Ao Bruno pelo amor, companheirismo, paciência, carinho e apoio constante.
Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que guiou meus passos, me protegeu com suas mãos misericordiosas e colocou pessoas iluminadas em meu caminho.

Aos meus pais, Zilmo e Maria que me amaram, cuidaram de mim e me ofereceram o que eles tinham de melhor. Tenham certeza de que todas as minhas conquistas são mais de vocês do que minhas.

Aos meus irmãos Vinícius, Fernanda e Letícia, pelo vínculo de amor. Obrigada pela paciência e por torcerem por mim em todos os meus projetos.

Ao Bruno, por compartilhar todos os meus sentimentos, pelo valioso apoio, pela dedicação e paciência em todos os momentos.

Ao Dílson, Eunice e Débora, por me acolherem com carinho e pelo incentivo.

Aos meus queridos afilhados Maria Luíza, Bruno e Natália, pelo amor e pela alegria.

À minha orientadora Denise, pela confiança no meu potencial. Agradeço também pela amizade sincera, pelo apoio desde a Iniciação Científica e principalmente nestes últimos tempos, por ter sido essencial para minhas conquistas.

Á professora Danielle pelo carinho, pela disponibilidade constante e pelo apoio.

À professora Leda Quercia Vieira, pelo fornecimento dos animais deficientes.

Às amigas Daniela e Janaína, pelos ensinamentos, pela convivência e pela amizade.

À Cláudia, por ser minha companheira no laboratório desde o início; pela parceria, disponibilidade e por ser minha grande amiga.

À Maria Letícia, Maria, Frank, Paloma e Thales pela amizade e pelo companheirismo.

Aos colegas do laboratório pela convivência, pelos sorrisos e pela disponibilidade em ajudar: Wanderson, Marta, Mirna, Felipe, Eliane, Vanessa, Ferdinan, Carol, Sílvia, Camila e Weverton.

Ao professor Wagner e à professora Rosa, pelo ótimo convívio.

Ao Caio e ao Flávio pela importante ajuda nas dosagens das citocinas.

A todos os meus colegas da graduação que estão presentes, cada um à sua maneira. Em especial, agradeço à amiga Fernanda Nobre pelo carinho e apoio.

A todos os colegas da Biologia Celular.

À Universidade Federal de Minas Gerais por ter me tornado uma pessoa mais completa.

SUMÁRIO

Pág

1. RESUMO..... 11
2. INTRODUÇÃO..... 12
    2.1 Aversão à ingestão de antígenos..... 12
    2.2 A mucosa intestinal..... 13
    2.3 Alergia alimentar..... 16
    2.4 Mecanismo da alergia alimentar..... 18
    2.5 Modelo de alergia..... 24
3. OBJETIVOS..... 27
    3.1 Objetivo geral..... 27
    3.2 Objetivos específicos..... 27
4. METODOLOGIA..... 28
    4.1 Animais..... 28
    4.2 Sensibilização e desafio alergênico..... 28
    4.3 Teste de aversão..... 29
    4.4 Avaliação do peso corpóreo..... 31
    4.5 Obtenção do soro..... 31
    4.6 Dosagem sérica dos anticorpos IgG1 anti-ovalbumina..... 31
    4.7 Dosagem sérica dos anticorpos IgE anti-ovalbumina..... 32
    4.8 Avaliação da resposta inflamatória da alergia..... 33
        4.8.1 Avaliação da presença de muco intestinal..... 33
        4.8.2 Avaliação do número de eosinófilos..... 34
    4.9 Cinética da produção de citocinas no intestino e baço..... 34
    4.10 Análise estatística..... 35
5. RESULTADOS..... 36
    5.1 Avaliação da cinética da produção de citocinas no intestino e baço..... 36
    5.2 Teste de aversão à ingestão do antígeno..... 42
    5.3 Avaliação da resposta inflamatória no intestino..... 44
        5.3.1 Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal..... 44
        5.3.2 Produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado..... 46
    5.4 Avaliação da perda de peso corpóreo..... 53
    5.5 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA..... 53

5.5.1 Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes do desafio com SCO..... 53
5.5.2 Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após o desafio com SCO..... 54
6. DISCUSSÃO..... 58
7. CONCLUSÕES..... 67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

LISTA DE FIGURAS

Pág

Figura 1- Protocolo experimental de indução da alergia..... 30
Figura 2- Produção de IFN-γ no tecido..... 36
Figura 3- Produção de IL-4 no tecido..... 37
Figura 4- Produção de TNF-α no tecido..... 38
Figura 5- Produção de IL-12 no tecido..... 39
Figura 6- Produção de IL-10 no tecido..... 40
Figura 7- Produção de IL-5 no tecido..... 41
Figura 8- Teste de aversão à ingestão de SCO adocicada..... 43
Figura 9- Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal..... 45
Figura 10- Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c selvagens e deficientes para IL-4..... 47
Figura 11- Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos BALB/c selvagens e deficientes para IL-4..... 48
Figura 12- Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para as citocinas IL-12 e IFN-γ..... 49
Figura 13- Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para as citocinas IL-12 e IFN-γ..... 50
Figura 14- Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para a citocina IL-10..... 51
Figura 15- Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos C57BL/6 selvagens e deficiente para a citocina IL-10..... 52
Figura 16- Avaliação do peso corpóreo..... 55
Figura 17- Avaliação dos anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA antes do desafio com SCO..... 56

Figura 18- Avaliação dos anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA após o desafio com SCO..... 57

LISTA DE ABREVIATURAS

Ig = Imunoglobulina

MadCam = *Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule*

IL = Interleucina

Th = Células T *helper*

PAF = Fator ativador de plaquetas

PG = Prostaglandina

MIP = *Macrophage inflammatory protein*

GM-CSF = *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

TNF = Fator de necrose tumoral

STAT = *Signal transducer and activator of transcription*

SCF = *Stem cell factor*

VLA = *Very late antigen*

VCAM = *Vascular cell adhesion molecule*

IFN = Interferon

OVA = ovalbumina

SCO = Solução de clara de ovo a 20%

$Al(OH)_3$ = Hidróxido de alumínio

ELISA = *Enzyme linked immunosorbent assay*

PBS = Salina tamponada com fosfato

H_2O_2 = Peróxido de hidrogênio

OPD = Ortofenileno-diamino

H_2SO_4 = Ácido sulfúrico

PAS = *Periodic acid Schiff*

HE = Hematoxilina-eosina

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

1) RESUMO

A incidência de doenças alérgicas tem aumentado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata mediada por IgE que ocorre após a ingestão de determinados alimentos por indivíduos previamente sensibilizados. As citocinas produzidas pelas células Th2 (IL-4, IL-13, IL-10 e IL-5) têm participação importante no desencadeamento da reação alérgica, enquanto as citocinas de perfil Th1 inibem as repostas alérgicas. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo animal para o estudo da alergia alimentar à ovalbumina. Neste modelo, os camundongos são sensibilizados com ovalbumina (OVA) e desafiados com uma solução de clara de ovo a 20% (SCO). Foi observado que, na possibilidade de escolha, os camundongos sensibilizados apresentam aversão à ingestão do antígeno. Neste trabalho, procuramos investigar a participação das citocinas IL-4, IL-12, IFN-γ e IL-10 na aversão à ingestão de antígenos e na alergia alimentar induzida à ovalbumina através da utilização de animais selvagens e deficientes para essas citocinas. O protocolo de sensibilização e desafio antigênico levou ao aumento dos níveis séricos de IgE e IgG1 anti-OVA em todos os grupos estudados, com exceção dos IL-4-/-. Apenas camundongos BALB/c demonstraram aversão à ingestão de SCO após sensibilização com OVA e perderam peso corpóreo após a ingestão restrita da solução do antígeno. Camundongos BALB/c e IL-12-/- sensibilizados apresentaram aumento do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal após desafio com SCO em relação aos seus controles. Além disso, a ingestão de SCO desencadeou um aumento da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado de animais BALB/c e IL-10-/- sensibilizados. Esses resultados demonstram que a produção de IgE e IgG1 anti-OVA é necessária para a ocorrência da aversão ao antígeno e para o desenvolvimento da alergia alimentar. A citocina IL-4 tem uma participação fundamental nesses eventos e a IL-10 participa na regulação da produção de muco no intestino de camundongos C57BL/6.

2. Introdução

2.1 Aversão à ingestão de antígenos

Um dos sinais principais que tornam um alimento agradável ou não é seu sabor. Entretanto, a seleção de um alimento pode estar relacionada a diversos fatores. Preferências ou aversões aos alimentos são manifestações consideradas adaptativas, uma vez que se tende a associar os sabores amargos a venenos e os doces a fontes energéticas (ROZIN & KALAT,1971).

A necessidade de algum nutriente também pode levar o animal a escolher alimentos que contenham esse nutriente, fenômeno conhecido como “fome específica” ou “apetite específico” (ROGERS & BLUNDELL, 1991).

Um efeito digestivo agradável ou não também pode interferir na ingestão posterior de um alimento. Os animais são capazes de associar as conseqüências digestivas com o sabor deste alimento. Foi observado que mesmo que o novo sabor não seja o responsável pelos efeitos indesejáveis, mas desde que ele seja apresentado ao animal juntamente a um estímulo que desencadeie um desconforto digestivo, ocorre aversão em uma segunda exposição a este sabor. Esse fenômeno foi denominado de “Aversão condicionada ao sabor”. Acontece, por exemplo, quando uma solução de sacarina é fornecida a um animal pela primeira vez e, junto à ela, é aplicada uma injeção de cloreto de lítio. O animal associa o desconforto causado pela injeção com o sabor doce da sacarina e demonstra aversão em uma segunda exposição (BILLS et al, 2005).

Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que frente à opção de ingerir água ou solução de clara de ovo adocicada, camundongos sensibilizados com ovalbumina apresentam aversão à ingestão da clara de ovo, ao contrário de animais controle. Os resultados desses estudos permitiram concluir que componentes imunológicos também podem influenciar a seleção de dietas, tendo sido observado que o comportamento de aversão à ingestão do antígeno foi transferido para camundongos que receberam células do baço de camundongos sensibilizados com baixas doses de ovalbumina (CARA et al., 1994; CARA et al., 1997).

Posteriormente, comprovou-se que essa aversão estava relacionada diretamente com a produção de IgE (ANDRADE, 1999; BASSO et al.,2003).

Essa associação leva ao entendimento ou proposta de que a aversão é um mecanismo inicial, induzido imunologicamente, de evitar danos ao organismo caso o animal consuma um alimento nocivo. Certamente, na ausência desse comportamento pode ser desenvolvido um quadro de alergia alimentar. Entretanto, mesmo quando há falha desse possível mecanismo, nem sempre a ingestão de alimentos desencadeia um quadro patológico.

2.2 A mucosa intestinal

As moléculas da dieta entram em contato com a maior área que o organismo expõe ao ambiente. No ser humano, além do intestino possuir metros de extensão, a presença de pregas, vilosidades e microvilosidades aumenta de maneira significativa a superfície da mucosa intestinal disponível para a absorção de nutrientes. Calcula-se que as pregas aumentem a superfície intestinal em cerca de 3 vezes, as vilosidades em 10 vezes e as microvilosidades em 20 vezes, sendo, em conjunto, responsáveis por um aumento de 600 vezes na superfície intestinal. A área da mucosa intestinal no ser humano adulto, portanto, atinge aproximadamente 200m^2 (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A mucosa intestinal possui estruturas linfóides que, em conjunto, formam o GALT (Gut associated lymphoid tissue). Essas estruturas são as placas de Peyer do intestino delgado e os folículos linfóides do intestino grosso e reto. As placas de Peyer formam estruturas em forma de cúpula que se estendem até o lúmem do intestino e são extremamente importantes para a indução de respostas imunes no intestino delgado. O epitélio associado à placa de Peyer contém células epiteliais especializadas conhecidas como células M. Essas células são adaptadas para interagirem diretamente com moléculas e partículas do lúmen intestinal e realizar a transcitose deste material para o interior da célula. A membrana basal da célula M forma muitas pregas ao redor de linfócitos e células apresentadoras de antígeno, sendo estas últimas responsáveis pela captação e processamento do material transportado para a apresentação do antígeno e

ativação de linfócitos. Além deste tecido linfóide organizado, muitos linfócitos encontram-se dispersos pela lâmina própria da parede intestinal, sendo estas as células efetoras do sistema imune da mucosa intestinal (NEUTRA et al, 2001; IWASAKI & KELSALL, 2000; KELSALL & STROBER, 1996).

Os linfócitos T e B ativados migram das placas de Peyer para os linfonodos mesentéricos e desses trafegam para o ducto torácico, chegando à circulação sangüínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa intestinal pelas vênulas de endotélio alto e passam a residir na lâmina própria. Estes vasos da mucosa intestinal e de outras mucosas (respiratória, reprodutiva e mama em lactação) expressam a adressina de mucosa MadCAM-1que se liga à integrina α4β7 presente na superfície dos linfócitos. Esta ligação possibilita o retorno dos linfócitos às mucosas. Dessa forma, uma resposta imune iniciada por antígenos apresentados em um número limitado de placas de Peyer pode ser disseminada através de toda a mucosa corporal (SAMPSON, 1999; EIGNMANN, 2002).

Aproximadamente uma tonelada de alimentos passa pelo trato gastrointestinal a cada ano, portanto, o sistema imune intestinal está em constante contato com uma grande quantidade de antígenos diferentes (SEIBOLD, 2005). A variedade de reações imunes que pode ocorrer em seguida à absorção do antígeno pelo epitélio intestinal depende da natureza do antígeno, da via de entrada no organismo e da história imunológica do indivíduo.

Em contrapartida à grande superfície absortiva da mucosa intestinal, os antígenos da dieta encontram algumas barreiras que controlam a sua absorção, impedindo que ocorra uma reação imunológica aos componentes da dieta. Essas barreiras são constituídas pelo muco que cobre continuamente e de forma aderente a mucosa digestiva, pelas enzimas presentes no lúmem intestinal, pela presença de células T reguladoras específicas e pela produção de IgA (MAYER, 2003).

Provavelmente, a barreira mais significativa à entrada de antígenos na mucosa é a presença de enzimas desde a boca até o intestino grosso. Ao realizarem a quebra de grandes polipeptídeos em pequenos dipeptídeos e tripeptídeos, estas enzimas permitem que ocorra o processo de absorção dos nutrientes e convertem proteínas potencialmente imunogênicas em peptídeos não imunogênicos. A ação destas

proteases juntamente com o efeito emulsificante dos sais biliares e com a atuação de enzimas que quebram carboidratos formam um potente sistema capaz de alterar a exposição a antígenos (MAYER, 2003). Entretanto, as proteínas podem escapar ou resistir à digestão e passar para o lúmem intestinal em uma forma intacta (UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006). A contribuição das enzimas gástricas para a tolerância aos antígenos alimentares foi demonstrada através da correlação entre o tratamento com drogas anti-úlcera e a produção de IgE específica à antígenos da dieta (SCHÖLL et al., 2005).

Outro componente importante no controle da entrada de antígenos pela mucosa intestinal é o muco produzido pelas células caliciformes. Este muco forma uma camada espessa que cobre o epitélio intestinal. As partículas antigênicas são aprisionadas na camada de muco e expelidas pelo movimento peristáltico do intestino. Além desta função de barreira física, o muco também serve como reservatório de IgA secretória (MAYER, 2003).

A IgA é um anticorpo que atravessa o epitélio intestinal e é secretada no lúmem. Esta imunoglobulina pode aglutinar antígenos e aprisioná-los no muco, facilitando a remoção destas moléculas do organismo. A importância da IgA no controle da absorção dos antígenos alimentares pôde ser comprovada pela observação de aumento dos níveis circulantes de complexos antígeno-anticorpo, contendo antígenos derivados de alimentos em indivíduos portadores de deficiências congênitas na secreção de IgA. Entretanto, não se sabe se esta deficiência predispõe à alergia alimentar (MAYER, 2003; CUNNINGHAM-RUNDLES et al., 2002)

Em recém nascidos, as enzimas digestivas não são completamente ativas e o sistema de IgA secretória não é maduro até 4 anos de idade, podendo ocorrer a passagem de proteínas não digeridas pela mucosa intestinal causando o desencadeamento de uma resposta imune aos componente da dieta (MAYER, 2003).

A última barreira à absorção antigênica é conferida pela célula epitelial. As junções oclusivas presentes na membrana apical e basal destas células e nos espaços paracelulares são geralmente impermeáveis a grandes macromoléculas, permitindo apenas a passagem de íons. Entretanto, em eventos inflamatórios, as junções se

tornam menos oclusivas, permitindo a passagem de macromoléculas para a lâmina própria (MAYER, 2003).

Em situações onde houve falha do mecanismo de aversão à ingestão do antígeno ou permeabilidade alterada da mucosa intestinal, antígenos alimentares que normalmente desencadeariam uma resposta imunossupressora, podem desencadear uma resposta das células Th2. Caso isto ocorra em um indivíduo geneticamente predisposto à resposta alérgica, pode ser desencadeada a alergia alimentar.

2.3 Alergia alimentar

Estudos epidemiológicos sugerem um aumento significativo na prevalência de doenças alérgicas nas últimas duas ou três décadas (YAZDANBAKHSH et al., 2002). A alergia alimentar, em particular, é uma patologia que afeta 6-8% das crianças menores de 3 anos e aproximadamente 2% da população adulta no mundo industrializado (SCHÖLL et al., 2005).

Os antígenos que provocam as reações alérgicas, também chamados de alérgenos, são em geral proteínas ambientais comuns (HELM & BURKS, 2000). A maioria dos indivíduos em contato com esses antígenos não produz IgE específica nem desenvolve reações potencialmente lesivas. No entanto, essas reações podem se desenvolver em pessoas geneticamente susceptíveis quando as barreiras fisiológicas são rompidas (SAMPSON, 1999).

Relativamente, poucos alimentos são responsáveis pela grande maioria das reações alérgicas. Esses alimentos incluem leite, ovo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar. Alergias a ovos e leite de vaca são observadas com maior freqüência em crianças, enquanto frutos do mar e amendoim são as causas mais comuns de alergia em adultos (SEIBOLD, 2005). Os alimentos que causam reações imunológicas têm macromoléculas com propriedades comuns: baixo peso molecular, glicosilação e alta solubilidade em fluidos corporais. Essas características estruturais provavelmente protegem os antígenos da desnaturação e da degradação no trato gastrointestinal e permitem sua absorção intacta. Entretanto, não se sabe por que alguns alimentos são mais alergênicos que outros (HELM et al, 2002; BRADLEY, 1997).

A alergia alimentar é a manifestação de uma resposta imune anormal aos antígenos introduzidos no organismo por via oral (MAYER, 2003). Em indivíduos com sensibilidade a estas substâncias, um grupo de distúrbios é desencadeado após a ingestão de determinados alimentos. Nesses indivíduos atópicos, a alergia está relacionada com a presença no soro de anticorpos específicos para antígenos alimentares (SICHERER, 2002).

A propensão à produção de IgE sofre influência de vários genes hereditários. Provavelmente, mais de 20 genes estão envolvidos no desenvolvimento de doenças alérgicas (LEUNG, 1998). Níveis exageradamente elevados de síntese de IgE e atopia associada são comuns em algumas famílias. Estudos familiares demonstraram transmissão autossômica nítida da atopia, embora o padrão completo de herança seja provavelmente poligênico. Vários estudos já identificaram genes candidatos ou loci que podem estar envolvidos na alergia. Um desses loci para a atopia está no cromossomo 5q, próximo ao sítio do aglomerado de genes que codifica as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e o receptor de IL-4. Essa região é de grande interesse por causa da conexão entre vários genes aí localizados e os mecanismos de regulação de IgE, bem como com o crescimento e diferenciação de mastócitos e eosinófilos (XU et al, 2000). Em um estudo sobre a genética da atopia em crianças, foi concluído que algumas variantes nos genes codificantes da IL-4, IL-13 e do receptor alfa da IL-4 desempenham importante papel no controle de respostas à alérgenos mediadas por IgE (LIU et al, 2004).

As reações alérgicas alimentares dependentes de IgE podem afetar um ou mais órgãos: a pele (urticária), o trato respiratório (rinite e asma), o trato gastrointestinal (dor e diarréia) e o sistema cardiovascular (choque anafilático). Estas reações podem ser desencadeadas por exposição direta do órgão envolvido ou por distribuição sistêmica das proteínas após ingestão. Exemplos de reações por exposição direta às proteínas alergênicas são as reações gastrointestinais isoladas após alimentação, asma e rinite que ocorrem após inalação e urticária após contato local com estas proteínas. Já a reação sistêmica mediada por IgE é denominada anafilaxia e é constituída por reações alérgicas severas e potencialmente fatais (SICHERER, 2002).

O termo anafilaxia foi criado para indicar que anticorpos, especialmente IgE, poderiam conferir o oposto de proteção (profilaxia) em um indivíduo menos favorecido. Nesta forma sistêmica mais extrema das reações alérgicas, os mediadores derivados dos mastócitos podem desencadear a obstrução das vias aéreas até o ponto de asfixia e produzir um colapso cardiovascular que pode resultar em morte (KEMP & LOCKEY, 2002).

A ocorrência de diferentes sintomas após a reação alérgica alimentar é determinada por diferenças na quantidade de mediadores inflamatórios liberados no intestino, na taxa de absorção dos antígenos ingeridos e na distribuição de mastócitos ligados à IgE específica ao antígeno. Além disso, estes sintomas refletem as quantidades de anticorpos IgA e IgG capazes de neutralizar o antígeno antes que este possa se ligar nas moléculas de IgE na superfície dos mastócitos (FINKELMAN et al, 2005).

2.4 Mecanismo da alergia alimentar

Nos casos em que há diminuição das barreiras imunológicas e não imunológicas da mucosa digestiva, ocorre uma absorção exacerbada de moléculas da dieta que interagem com células apresentadoras de antígeno. Uma vez processadas por essas células, ocorre a apresentação dos antígenos provenientes destas moléculas para linfócitos T helper (Th). Essa fase inicial leva à proliferação dos linfócitos T e à síntese de citocinas. Essa síntese leva à promoção de uma resposta característica de linfócitos Th2 (SAMPSON, 1999).

Os linfócitos Th2 e seus produtos (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) ativam linfócitos B específicos para os antígenos alergênicos. Sob a influência do ligante CD40 e das citocinas, principalmente IL-4, produzidas pelos linfócitos Th2, os linfócitos B sofrem a troca de isotipo da cadeia pesada e produzem IgE (BACHARIER & GEHA, 2000). Essa imunoglobulina circula como um anticorpo bivalente e está presente normalmente no plasma, em concentrações abaixo de 1μg/mL. Em condições de atopia grave, esse nível pode aumentar para mais de 1.000μg/mL. A IgE específica para o alérgeno produzida pelos linfócitos B entra na circulação e se liga aos receptores Fc

nos mastócitos dos tecidos, de modo que essas células ficam sensibilizadas e prontas para reagir a um encontro subseqüente com o alérgeno (SAMPSON, 1999; ABBAS, 2005).

As reações alérgicas são descritas como reações de hipersensibilidade imediata porque têm início rápido, em alguns minutos a partir do estímulo do antígeno (imediato) e trazem conseqüências patológicas significativas. Este evento é iniciado quando o antígeno é novamente ingerido e forma ligações com várias moléculas de IgE (crosslinking) ligadas a mastócitos (FINKELMAN et al, 2005). Em um indivíduo alérgico a um antígeno em particular, uma grande proporção da IgE ligada aos mastócitos é específica para este antígeno. Portanto, a exposição ao antígeno permitirá ligação cruzada suficiente de moléculas de IgE para desencadear a ativação dos mastócitos (ABBAS, 2005). Esta ativação resultará na liberação de histamina, prostaglandina D_2, fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores que irão gerar muitas modificações locais responsáveis pelos sintomas imediatos da alergia alimentar (BINGHAM & AUSTEN, 2000).

A ligação da histamina ao endotélio provoca a contração celular, levando ao extravasamento do plasma para os tecidos. A histamina estimula as células endoteliais a sintetizarem relaxantes vasculares para as células dos músculos lisos, como a prostaciclina e o óxido nítrico, que provocam a vasodilatação. Além disso, a histamina também provoca constrição da musculatura lisa intestinal, podendo contribuir para o aumento da peristalse associado aos alérgenos ingeridos (AKDIS & BLASER,2003).

A prostaglandina D_2 é um mediador lipídico derivado do ácido araquidônico e, uma vez liberada, adere-se aos receptores nas células da musculatura lisa e atua como vasodilatador. Este mediador também promove a quimiotaxia e o acúmulo de neutrófilos em sítios inflamatórios (BINGHAM & AUSTEN, 2000).

Outro tipo de mediador lipídico produzido pelos mastócitos é o fator ativador de plaquetas (PAF) que provoca retração das células endoteliais, além de ser capaz de relaxar a musculatura lisa vascular. O fator ativador de plaquetas também pode ser importante em reações tardias, pois pode ativar leucócitos. Entretanto, nessa situação, a principal fonte desse mediador pode ser representada pelos basófilos ou pelas células endoteliais vasculares (CHOI et al., 2003).

Tanto no trato respiratório como no digestivo, ocorre a produção de muco, sendo este evento mediado principalmente pela IL-4 e IL-13 (BLANCHARD et al., 2004). No trato gastrointestinal, há um desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando a um estado de diarréia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (WASSERMAN, 1983; PLAUT, 1993).

A reação alérgica imediata é seguida por uma resposta de fase tardia que é causada pela liberação de leucotrienos, citocinas e quimiocinas pelos mastócitos ativados. Esses mediadores recrutam outros leucócitos, incluindo eosinófilos e linfócitos Th2 para o local de inflamação (LUKACS, 2001).

As citocinas liberadas pelos mastócitos na inflamação alérgica são as responsáveis principais pela reação tardia e incluem: fator de necrose tumoral (TNF), IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1α, MIP-1β e o fator estimulador de granulócitos-monócitos (GM-CSF). O TNF, em especial, ativa a expressão endotelial das moléculas de adesão responsáveis pelos infiltrados de células mononucleares e polimorfonucleares (BINGHAM & AUSTEN, 2000; BRESSLER et al, 1997; BURD et al, 1995).

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea que em condições saudáveis, estão espalhados na lâmina própria da mucosa gástrica e intestinal. Entretanto, em pacientes com alergia alimentar, a distribuição, o número, a morfologia e também o comportamento funcional destas células estão alterados (MISHRA et al, 1999; SCHWAB et al, 2003). Os eosinófilos existem em abundância nos infiltrados inflamatórios de reações alérgicas tardias e contribuem para muitos dos processos patológicos em doenças alérgicas (LUKACS, 2001). Sua maturação a partir de precurssores mielóides é promovida pelo GM-CSF e pelas interleucinas IL-3 e IL5 (Rothenberg et al., 2001).

Os eosinófilos são recrutados para o tecido principalmente em resposta à produção local de eotaxina (FOSTER et al., 2002). Camundongos deficientes em IL-5 ou eotaxina demonstram uma reação alérgica significativamente reduzida, apontando para um papel essencial destas citocinas na fase efetora da alergia alimentar (HOGAN et al, 2000).

No local da lesão, sob o estímulo de citocinas e quimiocinas, os eosinófilos podem liberar citocinas pró-inflamatórias, qumiocinas e mediadores lipídicos. Essas moléculas podem induzir a produção de moléculas de adesão, o aumento da permeabilidade vascular e a produção de muco (ROTHENBERG & HOGAN, 2006). Além disso, os eosinófilos agem como células apresentadoras de antígeno promovendo a expansão de células Th2 em tecidos inflamados e amplificando diretamente a resposta imune destas células (SHI, 2004).

Os eosinófilos podem ser facilmente ativados através dos receptores de IgE presentes em sua superfície. Portanto, pode-se especular que estas células contribuem para a reação alérgica através da ligação das moléculas alergênicas aos receptores de IgE (SCHWAB et al, 2003; UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006) .

Como já mencionado, existem várias citocinas envolvidas nas reações alérgicas. As citocinas são pequenas proteínas solúveis (~25KDa) liberadas por várias células do organismo, normalmente em resposta a um estímulo ativador e induzem respostas por meio da ligação a receptores específicos. Elas podem atuar de forma autócrina, afetando o comportamento das células que as liberam, ou de forma parácrina, afetando o comportamento das células adjacentes. Outras podem atuar de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isto dependa de sua capacidade de entrar na circulação e de sua meia-vida. A maioria das citocinas possui múltiplos efeitos biológicos diferentes quando testadas em alta concentração em testes in vitro. A alteração direcionada dos genes de citocinas e seus receptores em camundongos knockouts ajudou no esclarecimento de seus papéis fisiológicos (JANEWAY, 2002).

A IL-4 produzida por linfócitos T é essencial para o desenvolvimento de linfócitos envolvidos na resposta do tipo Th2, enquanto a IL-4 liberada por mastócitos e basófilos pode amplificar respostas deste tipo já estabelecidas (ROMAGNANI, 2000). Esta citocina tem sido fortemente associada com a alergia alimentar por estar relacionada com a troca de isotipo para IgE. A IL-4 induz a produção de IgE ao se ligar em receptores na superfície das células B que por sua vez, ativam as tirosina quinases JAK1 e JAK3, as quais levarão à fosforilação do fator de transcrição STAT6. O STAT6 induz a transcrição de genes que respondem por muitas das ações da IL-4, tais como

diferenciação de células Th2 além da troca de isotipo do linfócito B para IgE (BACHARIER & GEHA, 2000; SHIMODA et al., 1996).

A IL-4 atua, juntamente com o fator de célula tronco (SCF), na regulação do estado funcional dos mastócitos, induzindo aumento da proliferação dessas células. Além disso, a ação sinérgica destas duas substâncias aumenta a liberação de mediadores pelos mastócitos após ativação por IgE (BISCHOFF et al, 1999).

A IL-4 também é necessária para a produção de IL-5 que tem função quimiotática para eosinófilos no tecido (ROMAGNANI, 2000). Juntamente com a IL-5, a IL-4 contribui para um aumento da adesão dos eosinófilos às células endoteliais vasculares e promove sua infiltração nos sítios inflamatórios através da regulação de marcadores de superfície dos eosinófilos (por ex: VLA-4) e do endotélio (por ex: VCAM-1) (TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, a IL-4 é capaz de regular a função de barreira do epitélio intestinal, tendo sido relacionada com a Doença de Crohn e alergia alimentar (DI LEO et al., 2002). Muitos estudos têm demonstrado aumento da produção de IL-4 e diminuição da produção de IFN-γ em doenças atópicas (OSTERLUND & SUOMALAINEN, 2002). A IL-4 antagoniza os efeitos ativadores do IFN-γ sobre os macrófagos e, assim, inibe reações imunes mediadas por células (BOGDAN et al., 1994).

A IL-10 foi originalmente descrita como uma citocina produzida por células Th2. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que esta citocina também é produzida por outras células, incluindo células Th1, macrófagos, células dendríticas e células T reguladoras. A IL-10 é um inibidor da produção de citocinas pelas células Th1, através da sua ação em células dendríticas e macrófagos, que resulta na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, de IL-12, da expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias (HAWRYLOWICZ & O´GARRA, 2005). A participação da IL-10 nas respostas típicas de células Th1 foi demonstrada em estudos nos quais camundongos deficientes em IL-10 (KUHN et al., 1993) ou seu receptor (SPENCER et al., 2002) desenvolvem colite espontânea.

A IL-10 modula também muitas funções efetoras das células associadas com doenças alérgicas, incluindo inibição da ativação de células Th2, da função de eosinófilos e mastócitos e da troca de isotipo para IgE pelas células B. Alguns estudos

demonstraram a ocorrência de correlação inversa entre os níveis de IL-10 e a severidade das doenças alérgicas (HAWRYLOWICZ & O´GARRA, 2005). Existem evidências de que a IL-10 esteja envolvida na modulação da tolerância oral, tendo sido demonstrado que camundongos tolerantes a antígenos alimentares apresentam produção aumentada de IL-10 pelas células da Placa de Peyer (FROSSARD et al., 2004).

A IL-12 é uma citocina produzida por células apresentadoras de antígeno que promove a diferenciação de células Th1 e a produção de IFN-γ, além de inibir a diferenciação de células Th2 secretoras de IL-4, suprimindo, portanto, a produção de IgE. Foi demonstrado que esta citocina tem efeito terapêutico e preventivo na alergia ao amendoim, tendo como efeitos um aumento na produção de IFN-γ (LEE et al.,2001). Sabe-se, ainda, que o aumento da produção de IFN-γ induzido pela IL-12 ocorre através de ativação da via do NF-κB (TEIXEIRA et al.,2005).

A principal citocina produzida pelas células T CD8 efetoras é o IFN-γ, que pode bloquear a replicação de vírus ou mesmo levar à eliminação do vírus sem matar a célula infectada (JANEWAY, 2002). O IFN-γ secretado pelas células Th1 é a principal citocina ativadora de macrófagos, sendo capaz de ativar enzimas que sintetizam óxido nítrico (BOGDAN et al., 1994). Alguns estudos demonstram que a produção de óxido nítrico induzida pelo IFN-γ inibe a desgranulação de mastócitos mediada por IgE, sugerindo uma importância desta citocina no controle das reações alérgicas (EASTMOND et al., 1997).

O IFN-γ promove a diferenciação de células CD4+ virgens para a subpopulação Th1 e inibe a proliferação de células Th2 (TEIXEIRA et al.,2005). Além disso, esta citocina exerce efeito inibidor direto na produção de IL-4 e IL-5 pelas células Th2. Em modelos de inflamação alérgica, a administração intranasal de IFN-γ é capaz de reduzir a eosinofilia nas vias aéreas (COHN et al.,2001).

A redução da produção de IFN-γ está associada a um nível elevado de IgE sérica em pacientes atópicos, o que pode ser explicado pela observação de que esta citocina induz a transcrição de genes relacionados à troca de isotipo pra IgG e diminui a transcrição daqueles relacionados à troca de isotipo para IgE (TEIXEIRA et al., 2005).

2.5 Modelo de alergia

A utilização de modelos animais é uma importante alternativa para o estudo dos mecanismos envolvidos na reação alérgica, bem como para o desenvolvimento de estratégias clínicas que possam minimizar as reações adversas causadas por esta patologia. Especialmente em situações onde os órgãos alvo são inacessíveis, como o trato gastrointestinal na alergia alimentar, estes modelos animais são insubstituíveis.

Várias metodologias experimentais têm sido utilizadas com o intuito de alterar os mecanismos de tolerância na mucosa intestinal e iniciar uma reação de hipersensibilidade que mimetize a alergia alimentar humana. Geralmente, o desenvolvimento destas metodologias requer a utilização de vias não fisiológicas de administração do antígeno, bem como o uso de adjuvantes indutores da produção de citocinas pelas células Th2. Na maioria dos modelos animais, incluindo pequenos animais de laboratório (camundongo e rato) e animais domésticos (cachorro e porco), são utilizadas via intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intradérmica para administração do antígeno com ou sem adjuvante (HELM et al, 2003).

Modelos experimentais em cachorro e suínos demonstraram-se particularmente adequados ao estudo da alergia alimentar. Estes modelos são vantajosos uma vez que aspectos da anatomia e fisiologia destes animais, incluindo o sistema imune, são comparáveis às características de pacientes humanos. Além disso, amostras obtidas desses animais são maiores e as intervenções, como análises endoscópicas, são mais fáceis de serem realizadas (UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006).

Com o objetivo de investigar as características histológicas e imunológicas da alergia alimentar, foi desenvolvido um modelo de alergia ao amendoim em porcos recém nascidos, cujos sintomas são consistentes com a resposta alérgica em humanos. Neste estudo, os animais foram sensibilizados com extrato de amendoim e desafiados oralmente com este antígeno. Após o desafio, estes porcos sensibilizados desenvolveram uma resposta alérgica mediada por IgE, alterações morfológicas e histológicas no esôfago, estômago e intestino delgado, hemorragia intestinal e diarréia (HELM et al, 2002).

Como exemplo da utilização do cachorro como um modelo experimental, podemos citar um estudo de alergia alimentar ao amendoim, castanha-do-pará e nozes. Para investigar se a sensibilização com extratos destes alimentos era capaz de gerar reações de hipersensibilidade, foram utilizados 11 cachorros de uma raça que produz, normalmente, altos níveis de IgE. Estes cachorros receberam estes extratos por via subcutânea e posteriormente, foram desafiados oralmente com o mesmo antígeno utilizado na sensibilização. Após serem submetidos à esta metodologia, os animais demonstraram reações positivas em testes cutâneos com o antígeno e apresentaram sintomas clínicos como vômito, diarréia e letargia após o desafio oral. Estes resultados confirmam a viabilidade da utilização do cachorro como um modelo experimental de alergia alimentar humana (TEUBER et al, 2002).

Uma das vantagens do uso de roedores para as pesquisas sobre a alergia alimentar é a disponibilidade de uma grande variedade de linhagens, incluindo também animais knockouts. Além disso, através da utilização de roedores é possível a investigação da questão de interesse em grupos com grandes números de animais (UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006).

Entre os roedores, os ratos da linhagem Brown Norway apresentam uma resposta expressiva quando submetidos a protocolos de sensibilização alimentar. Quando ratos desta linhagem receberam alimentação intragástrica diária com ovalbumina durante 6 dias, foram induzidas resposta imunes específicas ao antígeno nos níveis celulares e humorais (IgE e IgG). Os altos de níveis de imunoglobulinas produzidos por estes animais foi comparável aos níveis observados em pacientes atópicos (KNIPPELS et al, 1999; PILEGAARD & MADSEN, 2004; KNIPPELS et al, 1998).

Além dos ratos, a utilização de camundongos no estudo da alergia alimentar é extremamente comum. Existem similaridades importantes entre as espécies murina e os humanos que fazem que com que os primeiros sejam excelentes modelos para o estudo da alergia alimentar. Ambas as espécies produzem IgE que se liga com alta afinidade ao receptor na superfície de mastócitos e basófilos. Além disto, os mastócitos tanto de camundongos como de humanos secretam histamina e PAF, substâncias que

contribuem para o aumento da permeabilidade vascular nos quadros alérgicos (FINKELMAN et al, 2005).

A administração oral de proteínas alimentares juntamente com um adjuvante capaz de romper a função de barreira da mucosa é um protocolo aplicado em vários destes estudos. Recentemente, este protocolo foi utilizado para avaliar o potencial alergênico da soja geneticamente modificada. Camundongos BALB/c foram sensibilizados com extrato da soja transgênica que apresenta epitopos comuns com a planta selvagem. Nestes animais sensibilizados, o desafio oral com soja selvagem ou transgênica desencadeou um quadro característico de alergia alimentar. Foi observada uma resposta imune do tipo Th2, com aumento de IgE e IgG1 específicos para a soja além de aumento da produção de IL-4 e IL-5 pelas células do baço (GIZZARELLI et al, 2006).

Em trabalhos desenvolvido pelo nosso grupo, observamos que na ausência de outra opção líquida, a ingestão de clara de ovo pelos camundongos sensibilizados foi capaz de aumentar a produção de IgE e IgG1 anti-ovalbumina, gerar edema intestinal nas primeiras 24 horas e infiltrado de eosinófilos de 48 horas a 14 dias na mucosa intestinal. Esse quadro fundamentou o modelo utilizado neste estudo como o de uma alergia alimentar por reproduzir vários parâmetros encontrados na doença espontânea (SALDANHA et al., 2004). No entanto, não houve nenhuma alteração morfológica aos 21 dias de ingestão contínua de clara de ovo, sugerindo um forte controle anti-inflamatório presente na mucosa digestiva. Apesar desse controle morfológico, foi observado que a ingestão do antígeno era capaz de gerar outras conseqüências, como um acentuado emagrecimento e uma mudança na susceptibilidade/resistência a doenças (CARMO-PINTO, 2000; SALDANHA, 2002; GARGIULO;2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação das citocinas IL-4, IL-12, IFN-γ e IL-10 na aversão à ingestão de antígenos e na alergia alimentar induzida à ovalbumina (OVA).

3.2 Objetivos Específicos

1. Investigar a produção das citocinas TNF-α, IL-10, IFN-γ, IL-4, IL-5 e IL-12 no intestino e baço de camundongos Balb/c sensibilizados com OVA após diversos tempos de ingestão restrita e voluntária de SCO 20%.

2. Avaliar a aversão à ingestão da SCO em camundongos Balb/c e C57BL/6 selvagens e deficientes para as citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ, sensibilizados com OVA.

3. Avaliar a resposta inflamatória (infiltrado de eosinófilos e produção de muco) no intestino de camundongos selvagens (Balb/c e C57BL/6) e deficientes para as citocinas (IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ), sensibilizados com OVA, após 14 dias de ingestão restrita e voluntária de SCO.

4. Avaliar a perda de peso corpóreo e a produção de anticorpos séricos anti-OVA em camundongos selvagens (Balb/c e C57BL/6) e deficientes para as citocinas (IL-4, IL-10, IL-12 e IFN-γ), sensibilizados com OVA, após 14 dias de ingestão restrita e voluntária de SCO.

4) Metodologia

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos de seis a oito semanas de idade, fêmeas, da linhagem C57BL/6 selvagens e deficientes em IL-12, IFNγ e IL-10 e camundongos da linhagem BALB/c selvagens e deficientes em IL-4. Os animais selvagens foram provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais deficientes nas citocinas especificadas foram cedidos pela Profa. Lêda Quercia Vieira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB-UFMG.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Geral, em gaiolas de plástico, contendo o máximo de 6 animais/gaiola. Quando chegaram ao biotério, os animais foram vermifugados (invermectin 2%) e, após uma semana, as gaiolas foram transferidas para as estantes ventiladas (ALESCO).

Os animais receberam, durante todo o experimento, dieta comercial para camundongos (PURINA) "*ad libitum*". Alguns grupos receberam apenas água como fonte líquida, outros receberam solução de clara de ovo a 20% (SCO) e outros receberam as duas opções.

Os procedimentos experimentais realizados nesta dissertação de mestrado foram executados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal –CETEA/UFMG (Protocolo 23/2003).

4.2 Sensibilização e Desafio Alergênico.

Os camundongos foram injetados com OVA (albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), na dose de 10μg, adsorvida em hidróxido de alumínio (1mg) e salina (0.2mL) por via sub-cutânea no dorso (dia 0).

Receberam uma segunda sensibilização 14 dias depois (dia 14) apenas com o antígeno (10μg) diluído em salina.

O grupo controle recebeu apenas o adjuvante diluído em salina no dia zero e apenas salina após 14 dias.

Para o desafio alergênico, camundongos sensibilizados receberam, como única fonte líquida, mamadeira contendo solução de clara de ovo à concentração de 20% a partir do sétimo dia após a segunda sensibilização (dia 21).

O grupo controle permaneceu bebendo água ao longo de todo o experimento (Figura 1).

4.3 Teste de Aversão

Para a realização do teste de aversão, tanto os animais sensibilizados como os animais do grupo controle foram colocados em gaiolas individuais, tendo à sua disposição duas fontes líquidas: água e SCO adocicada com sacarina na concentração de 0.5%. A posição das duas mamadeiras foi alternada a cada dia para que não houvesse interferência de preferência pela posição. O consumo foi avaliado obtendo-se o peso das mamadeiras antes e depois de 24 horas de consumo. Esse teste foi realizado durante três dias, a partir do dia 21. O resultado foi expresso em miligramas de solução ingerida por grama de peso corpóreo, sendo considerada a média de cada um dos grupos.

Durante o restante do experimento, como já descrito no item 4.2, os animais de cada grupo experimental foram reunidos e foi ofertada água para o grupo controle e SCO para o grupo sensibilizado como únicas opções líquidas.

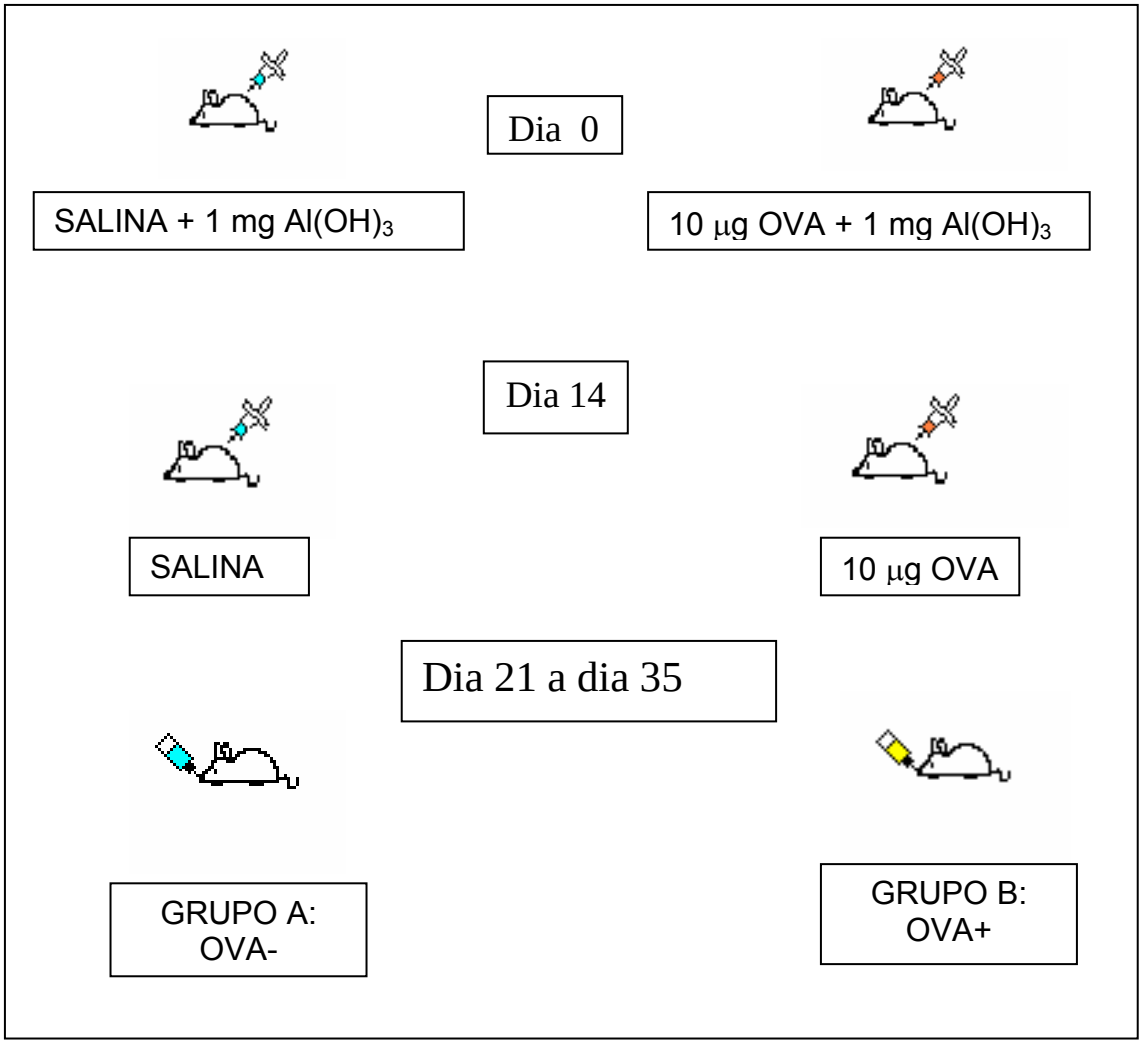


Figura 1: Protocolo Experimental de Indução da Alergia – O trabalho foi realizado com dois grupos experimentais, contendo quatro ou cinco animais em cada. O grupo A (OVA-) recebeu injeção subcutânea de salina + $Al(OH)_3$ no dia 0, e apenas salina no dia 14. O grupo B (OVA+) recebeu injeção subcutânea de 10 μg OVA + 1 mg $Al(OH)_3$ no dia 0, e apenas OVA no dia 14. Sete dias depois, a mamadeira do grupo B (OVA+) contendo água foi trocada por mamadeira contendo solução de clara de ovo 20%, enquanto o grupo A (OVA-) continuou bebendo água até o final do experimento.

4.4 Avaliação do peso corpóreo

O peso corpóreo foi avaliado uma vez por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o final, ou seja, 14 dias após o início da ingestão de SCO (dia 35). O peso corpóreo final de cada grupo foi obtido através da média dos pesos individuais e expresso em gramas.

4.5 Obtenção do Soro

As sangrias foram feitas sete dias após a sensibilização secundária e após 14 dias de ingestão de SCO, através do vaso da cauda e dos vasos axilares, respectivamente, em animais anestesiados com xilazina (20mg/kg) e ketamina (100mg/kg). Após coagulação, o sangue foi centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos. O soro foi então retirado, colocado em tubos individuais e congelado (-20°C) para posterior análise da presença de anticorpos.

4.6 Dosagem sérica dos anticorpos IgG1 anti-ovalbumina

A dosagem de anticorpos foi realizada através do teste de ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay). Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas overnight (4°C), com 2 μg de OVA diluídos em 100μl por poço de tampão carbonato pH=9,6 (Coating Buffer). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA – solução salina Tween) e incubadas, por uma hora, com 200μl de solução de caseína a 25% em PBS (PBS/caseína), por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas, por 1 hora (37°C), com 100 μl por poço de seis diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5, diluições 1:100 a 1:3200). As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1

hora (37°C) com 100 μl por poço de uma solução contendo anticorpos de cabra anti-IgG1 (Goat anti-mouse IgG1, Southern Biothecnology Associates, Birmingham, AL, USA), diluídos a 1:20000. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas por 1h (37°C) com anticorpos de coelho anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (Rabbit anti-goat IgG-HRP, Southern Biothecnology Associates, Birmingham, AL, USA*).* As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100 μl por poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H_2O_2 e ortofenileno-diamino (OPD). Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 μl por poço de H_2SO_4 a 2%. A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA automático (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com filtro de 492 nm. Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (pool de soros de animais sensibilizados), um controle negativo (pool de soros de animais controles), além de um controle da própria placa (branco).

Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo e as amostras na diluição de 1:1600 comparadas a este valor.

4.7 Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-ovalbumina

Os anticorpos IgE anti-ovalbumina foram dosados por ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay), de forma semelhante à descrita no item anterior. Placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, Inc), 50μL/poço, por no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placa foram lavadas e bloqueadas (1hora a temperatura ambiente) com 200μL/poço de PBS/caseína. Foram adicionados 50μL /poço de soro total das amostras de camundongos. Após incubação por 2horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados 50μL da OVA-biotinilada (1mg/mL) por 1hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e incubada, agora, com a estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology,

Birmingham, AL) em uma diluição de 1:5000 (50μL/poço) por mais 45 minutos. Em seguida foi realizada a etapa de revelação com OPD mais H_2O_2 em tampão citrato (100μL/poço) e as amostras foram lidas em 492nm em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Os resultados foram computados através das densidades ópticas e foram expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo e as amostras comparadas a este valor.

4.8 Avaliação da resposta inflamatória da alergia

Após 14 dias de ingestão de SCO, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical.

Foram retirados segmentos do intestino delgado para avaliação da resposta inflamatória desencadeada pela alergia alimentar. Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção foi baseado segundo FERRARIS *et al*.,1992, sendo o intestino lavado com salina fisiológica, para retirada das fezes, e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente.

Essas porções foram então fixadas em formol tamponado a 10%, desidratadas em soluções decrescentes de álcoois, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5μm foram obtidos para posterior avaliação da produção do muco intestinal e do infiltrado de eosinófilos.

4.8.1 Avaliação da presença de muco intestinal

A avaliação da presença de muco intestinal foi feita através do método de coloração por PAS (Periodic Acid Schiff). Neste método, os cortes foram

desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados no Reativo de Schiff durante 10 minutos ou mais, até que atinjam uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes ficaram evidenciadas em um tom rosa escuro.

As lâminas foram montadas e foram capturadas imagens de três campos de cada porção do intestino delgado a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas com a utilização do software KS300 instalado em um analisador de imagens Kontron Eletronic/Carl Zeiss. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subseqüente cálculo da área total. O resultado foi expresso em μm^2 PAS/campo.

4.8.2 Avaliação do número de eosinófilos

Para a identificação e contagem dos eosinófilos, os cortes das porções de jejuno proximal foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E) e as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Olympus B201). Dez campos foram escolhidos ao acaso, em um aumento de 40X (53.333$\mu m^{2/}$campo) para a contagem do número de eosinófilos. O resultado foi expresso em número de eosinófilos/campo.

4.9 Cinética da produção de citocinas no intestino e baço

Para a análise da cinética da produção de citocinas no intestino e baço, camundongos Balb/c selvagens foram sensibilizados com OVA como descrito anteriormente no item 4.2 e desafiados com SCO (20%). Após vários tempos (1dia, 4dias, 4dias, 14dias e 21dias) de ingestão restrita e voluntária de SCO, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Uma porção do jejuno proximal e o baço foram retirados e congelados à -20°C.

Os níveis de citocinas nestes tecidos foram medidos por ELISA (como descrito por REES *et al*., 1999). Cem miligramas de tecido retirados durante a necrópsia e mantidos a temperatura de -20°C foram homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0.1 mM PMSF, 0,1 nM benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween20. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 g, o sobrenadante foi diluído em 1:3 e imediatamente utilizado para o ensaio de ELISA.

Placas de ELISA foram cobertas com anticorpo policlonal anti-IL-4, IL-10, IFN-γ, IL-12, IL-5 e TNF-α de camundongo (1-2 μg/ml) e incubadas a 4^{o}C por 24 horas. As placas foram lavadas três vezes, a reação foi bloqueada com albumina bovina 1% e as placas foram deixadas em agitador horizontal durante 1 hora. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com amostras de um dia para o outro ("overnight"). Os anticorpos policlonais biotinilados foram usados com diluição de 1:1000 ou 1:2000. A detecção foi feita utilizando-se estreptoavidina e OPD como substrato. A curva padrão foi feita utilizando as concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60, 30 e 15 pg/mL. A leitura será realizada a 492 nm e o resultado foi expresso em pg da citocina/mL de amostra.

4.10 Análise Estatística

Foi realizada análise de variância (ANOVA-Tukey ou ANOVA-Mann Withney) para as diferenças na resposta entre grupos diferentes. As análises das diferenças na resposta entre grupos relacionados foi feita utilizando-se TESTE T DE STUDENT. O nível de significância foi considerado quando $P<0.05$.

5. Resultados

5.1 Avaliação da cinética da produção de citocinas no intestino e baço

Camundongos BALB/c selvagens foram sensibilizados com OVA e desafiados com SCO. Após vários tempos (1, 4, 7, 14 e 21 dias) de ingestão restrita de SCO, os animais foram sacrificados e foram coletados o jejuno proximal e baço para análise da produção de citocinas (IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12, TNF-α e IL-5).

A citocina IFN-γ foi reduzida a níveis não detectáveis no baço dos camundongos BALB/c sensibilizados, após 21 dias de desafio antigênico (Figura 2). Em todos os tempos investigados, o IFN-γ não foi detectado no jejuno proximal de animais do grupo controle ou sensibilizados.

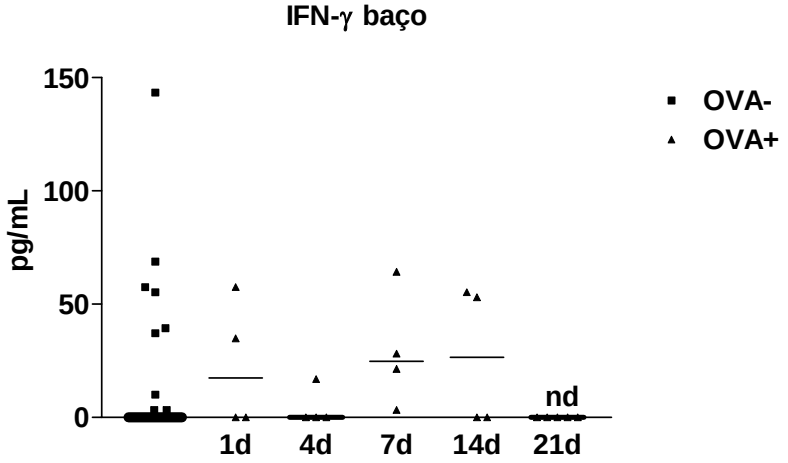


Figura 2: Produção de IFN-γ no tecido. Os níveis de IFN-γ foram dosados no baço dos animais BALB/c selvagens controle (OVA-) e sensibilizados (OVA+). Os camundongos foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Os animais do grupo sensibilizado foram desafiados com solução de clara de ovo (SCO) a 20% por 1, 4, 7, 14 ou 21 dias. Após estes tempos, os animais foram sacrificados e o baço foi analisado quanto à produção de citocinas. As linhas horizontais representam a mediana dos valores encontrados. nd (não detectável).

A ingestão de SCO pelos animais sensibilizados levou a uma diminuição significativa da produção de IL-4 no intestino após 14 dias de desafio antigênico, quando comparados aos níveis basais medidos no grupo controle (Figura 3A). Já no baço, houve uma queda nos níveis dessa citocina a partir de 4 a 7 dias de desafio em relação ao grupo controle (Figura 3B).

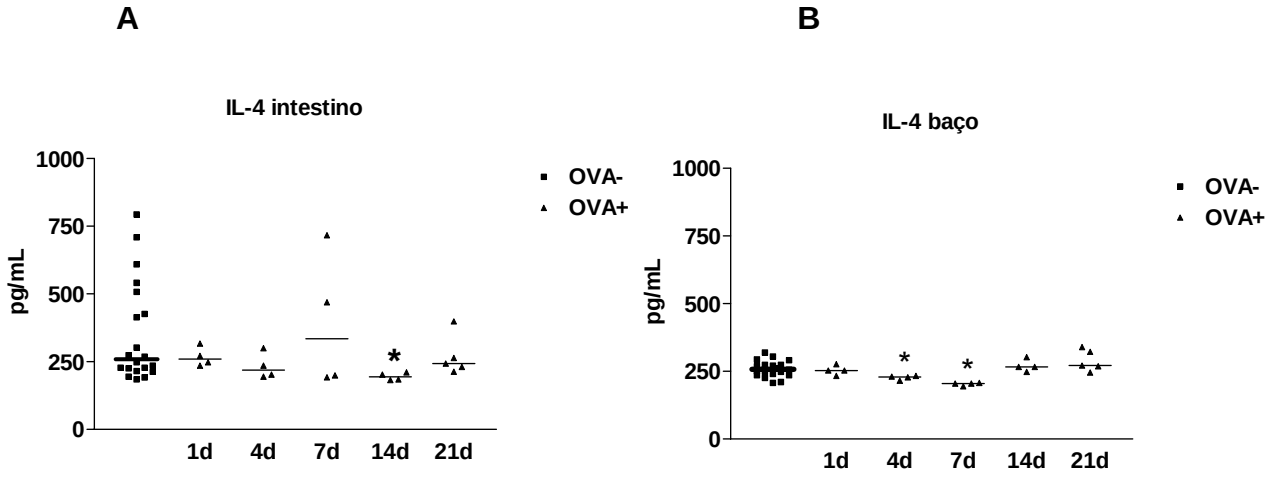


Figura 3: Produção de IL-4 no tecido. Os níveis de IL-4 foram dosados no jejuno proximal (A) e baço (B) dos animais BALB/c selvagens controle (OVA-) e sensibilizados (OVA+). Os camundongos foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Os animais do grupo sensibilizado foram desafiados com solução de clara de ovo (SCO) a 20% por 1, 4, 7, 14 ou 21 dias. Após estes tempos, os animais foram sacrificados e o baço e jejuno proximal foram analisados quanto à produção de citocinas. As linhas horizontais representam a mediana dos valores encontrados. *$p<0.05$ em relação ao controle (OVA-).

A produção basal de TNF-α observada nos animais do grupo controle foi reduzida com o desencadeamento do processo alérgico, atingindo níveis não detectáveis no jejuno proximal de animais sensibilizados após 7 a 14 dias de desafio oral com o antígeno (Figura 4A). No baço desses animais, observou-se a mesma tendência, uma vez que o TNF-α, neste tecido, foi reduzido a níveis não detectáveis após 7 dias de ingestão de SCO (Figura 4B).

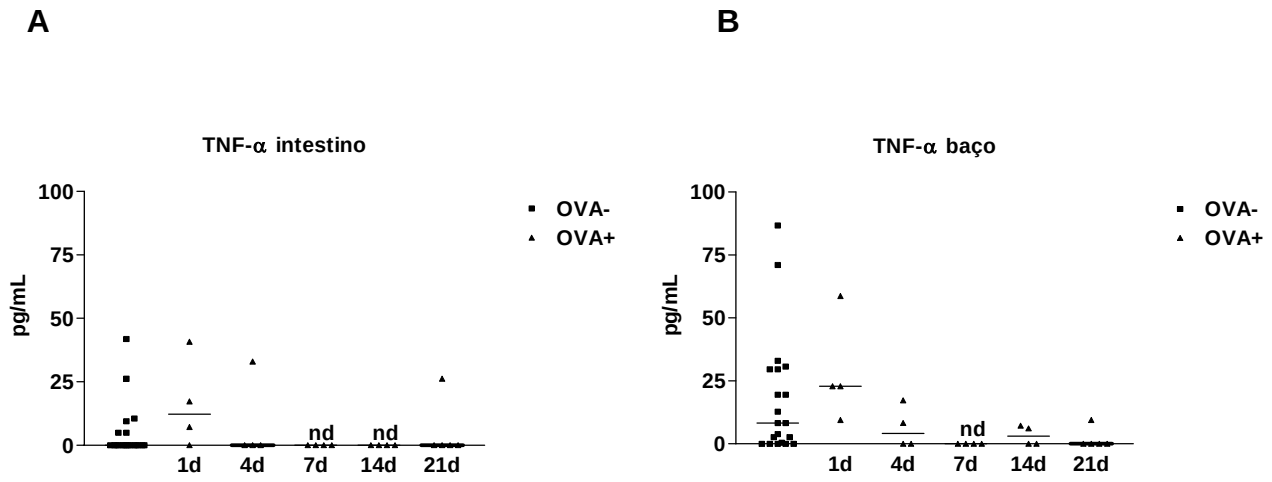


Figura 4: Produção de TNF-α no tecido. Os níveis de TNF-α foram dosados no jejuno proximal (A) e baço (B) dos animais BALB/c selvagens controle (OVA-) e sensibilizados (OVA+). Os camundongos foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Os animais do grupo sensibilizado foram desafiados com solução de clara de ovo (SCO) a 20% por 1, 4, 7, 14 ou 21 dias. Após estes tempos, os animais foram sacrificados e o baço e jejuno proximal foram analisados quanto à produção de citocinas. As linhas horizontais representam a mediana dos valores encontrados. nd (não detectado).

Os níveis de IL-12 no intestino de animais sensibilizados não sofreram alterações significativas após o desafio com SCO (Figura 5A). No baço desses animais, houve uma diminuição significativa da produção de IL-12 após 4 e 7 dias de desafio antigênico em relação aos níveis basais medidos nos animais do grupo controle (Figura 5B).

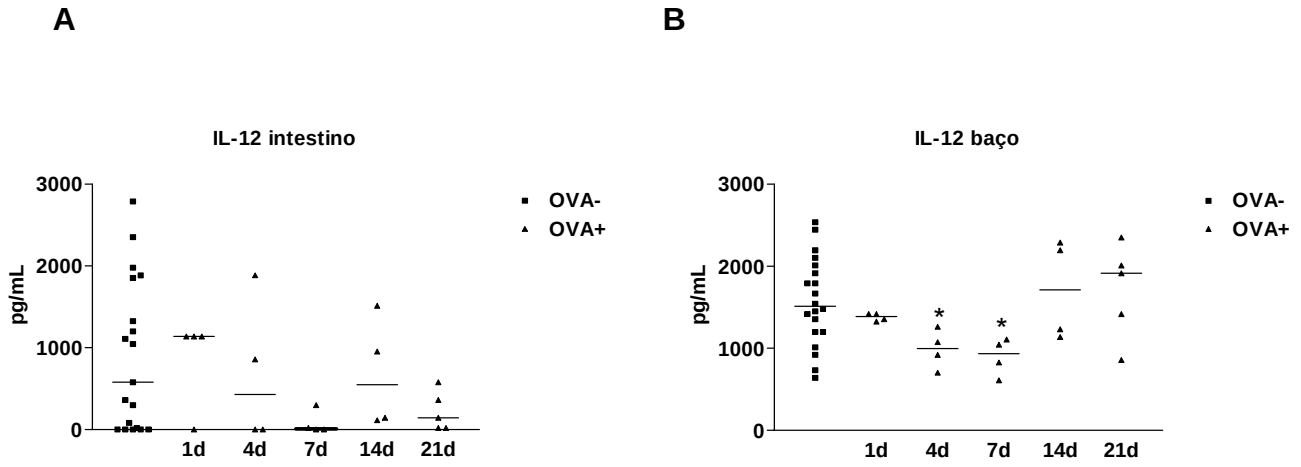


Figura 5: Produção de IL-12 no tecido. Os níveis de IL-12 foram dosados no jejuno proximal (A) e baço (B) dos animais BALB/c selvagens controle (OVA-) e sensibilizados (OVA+). Os camundongos foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Os animais do grupo sensibilizado foram desafiados com solução de clara de ovo (SCO) a 20% por 1, 4, 7, 14 ou 21 dias. Após estes tempos, os animais foram sacrificados e o baço e jejuno proximal foram analisados quanto à produção de citocinas. As linhas horizontais representam a mediana dos valores encontrados. *$p<0.05$ em relação ao controle (OVA-) nd (não detectado).

No decorrer do processo alérgico, os níveis de IL-10 foram reduzidos no intestino de camundongos sensibilizados em relação à produção basal dos animais controle, atingindo níveis não detectáveis após 7 dias de desafio com SCO e níveis significativamente menores que o controle após 21 dias de desafio antigênico (Figura 6 A). No baço destes animais, não houve alteração significativa da produção de IL-10 após sensibilização e ingestão da SCO (Figura 6B).

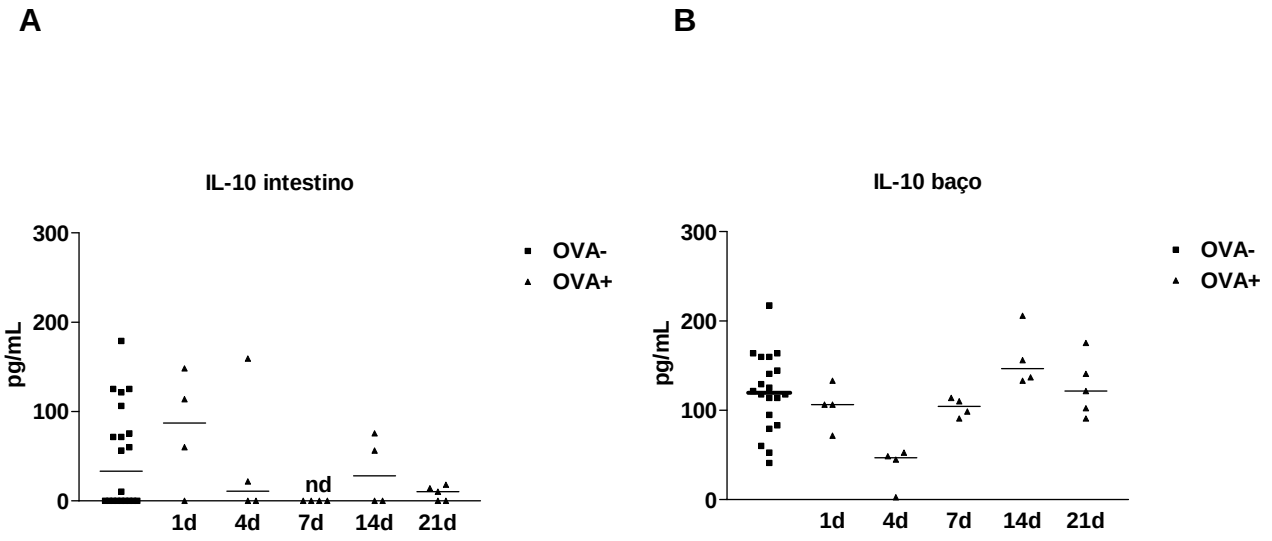


Figura 6: Produção de IL-10 no tecido. Os níveis de IL-10 foram dosados no jejuno proximal (A) e baço (B) dos animais BALB/c selvagens controle (OVA-) e sensibilizados (OVA+). Os camundongos foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Os animais do grupo sensibilizado foram desafiados com solução de clara de ovo (SCO) a 20% por 1, 4, 7, 14 ou 21 dias. Após estes tempos, os animais foram sacrificados e o baço e jejuno proximal foram analisados quanto à produção de citocinas. As linhas horizontais representam a mediana dos valores encontrados. *$p<0.05$ em relação ao controle (OVA-) nd (não detectado).

A produção da citocina IL-5 no intestino foi reduzida a níveis não detectáveis após 7 e 21 dias de ingestão do antígeno pelos animais sensibilizados (Figura 7A). No baço destes animais, entretanto, não houve alterações significativas dessa citocina após ingestão de SCO quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 7B).

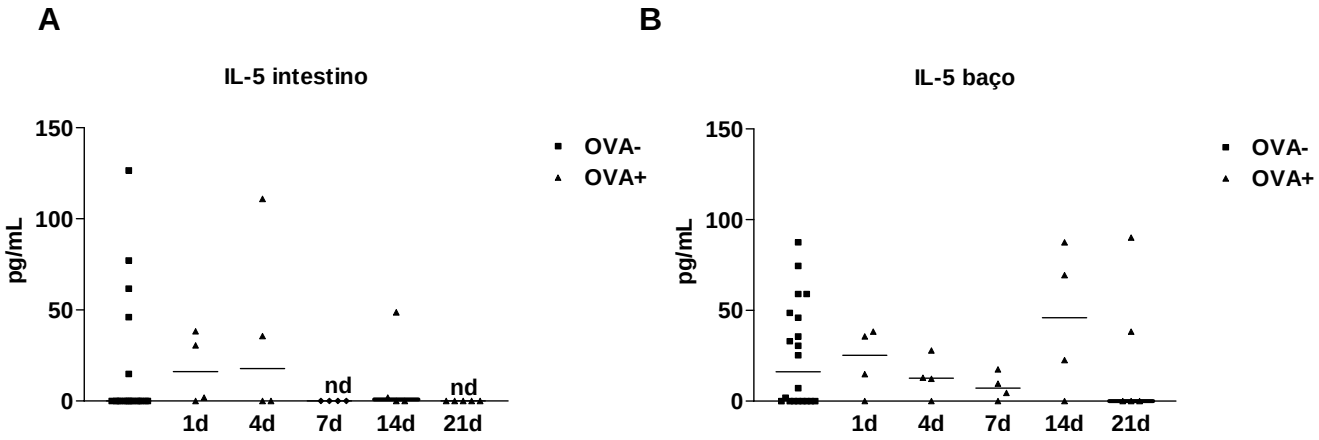


Figura 7: Produção de IL-5 no tecido. Os níveis de IL-5 foram dosados no jejuno proximal (A) e baço (B) dos animais BALB/c selvagens controle (OVA-) e sensibilizados (OVA+). Os camundongos foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Os animais do grupo sensibilizado foram desafiados com solução de clara de ovo (SCO) a 20% por 1, 4, 7, 14 ou 21 dias. Após estes tempos, os animais foram sacrificados e o baço e jejuno proximal foram analisados quanto à produção de citocinas. As linhas horizontais representam a mediana dos valores encontrados. nd (não detectado).

5.2 Teste de aversão à ingestão do antígeno

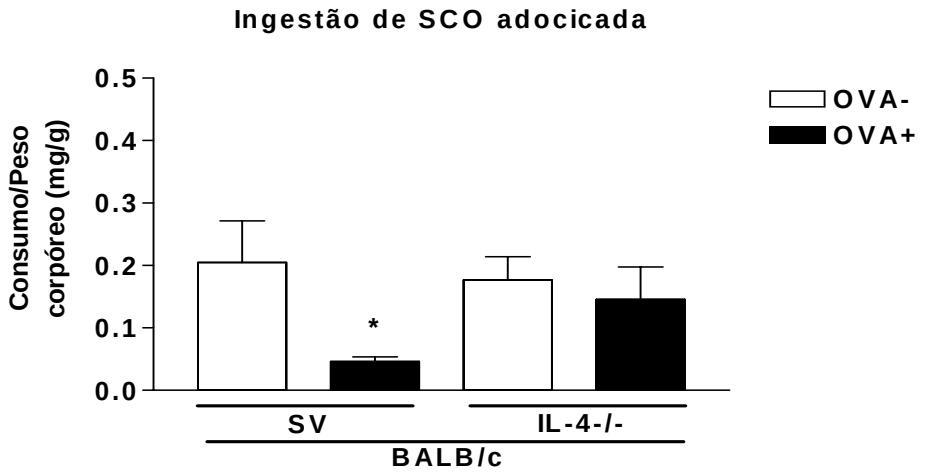
Os camundongos dos grupos controle e sensibilizado foram submetidos ao teste de aversão. Para a realização deste teste, os animais foram colocados em gaiolas individuais e tiveram a opção de ingerir água ou SCO adocicada. O consumo dos conteúdos destas duas mamadeiras foi avaliado a cada 24 horas, por três dias a partir do sétimo dia após a sensibilização secundária.

Apenas camundongos BALB/c selvagens mostraram aversão à ingestão da solução do antígeno (ovalbumina) com o qual tinham sido previamente sensibilizados. Estes animais ingeriram uma quantidade de SCO adocicada aproximadamente quatro vezes menor que os animais do grupo controle. Ao contrário dos animais selvagens, os camundongos deficientes para IL-4 (IL-4-/-), mesmo tendo sido submetidos ao protocolo de sensibilização com a ovalbumina, não evitaram a ingestão da SCO adocicada (Figura 8A).

Os camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes, que foram sensibilizados com a ovalbumina, não demonstraram aversão à ingestão de SCO adocicada quando comparados aos seus controles (Figura 8B).

Não houve diferença significativa no consumo de água dos animais estudados (BALB/c, IL-4-/-, C57BL/6, IL-12-/-, IFN-γ-/- e IL-10-/-) quando comparados os grupos controle e sensibilizado.

A



B

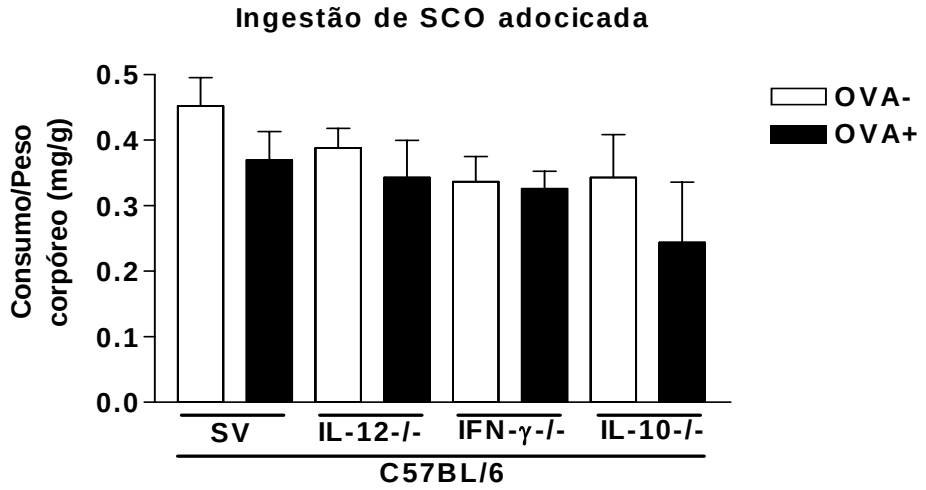


Figura 8: Teste de aversão à ingestão de SCO adocicada. Camundongos BALB/c, IL-4-/-, C57BL/6, IL-12-/- e IFN-γ-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias depois, os animais foram a mantidos em gaiolas individuais por três dias com a opção de ingerir solução de clara de ovo (SCO) adocicada ou água. Cada barra representa a média de consumo de SCO adocicada por peso do camundongo para cada grupo. Foram utilizados 5 animais/grupo. *P<0.05 em relação ao seu grupo controle (OVA-).

5.3 Avaliação da resposta inflamatória no intestino

O intestino delgado foi retirado durante a necropsia (14 dias após o desafio oral com SCO) para a avaliação histológica da resposta inflamatória nos camundongos selvagens (BALB/c e C57BL/6) e deficientes para as citocinas (IL-4-/-, IL-10-/-,IL-12-/- e IFN-γ-/-).

5.3.1 Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal

A contagem dos eosinófilos infiltrados na mucosa do jejuno proximal foi realizada foi realizada através da coloração dos cortes histológicos por Hematoxilina – Eosina (H.E). O número de eosinófilos infiltrados foi contado ao microscópio óptico (40X) em 10 campos. O resultado foi expresso como a média dos eosinófilos do grupo por campo.

A ingestão prolongada de SCO induziu um infiltrado de eosinófilos 3 vezes maior no jejuno proximal de camundongos BALB/c sensibilizados quando comparados aos seus controles. Entretanto, quando camundongos desta mesma linhagem eram deficientes em IL-4, o número de eosinófilos infiltrados foi pequeno, mesmo quando estes animais eram sensibilizados e desafiados com SCO (Figura 9A).

Após o desafio oral com SCO, os camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para as citocinas IFN-γ e IL-10 sensibilizados não apresentaram aumento do infiltrado de eosinófilos em relação aos animais do grupo controle. Entretanto, na ausência da citocina IL-12, a ingestão de SCO pelos animais sensibilizado foi capaz de aumentar de maneira muito significativa o infiltrado de eosinófilos no jejuno proximal destes animais quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 9B).

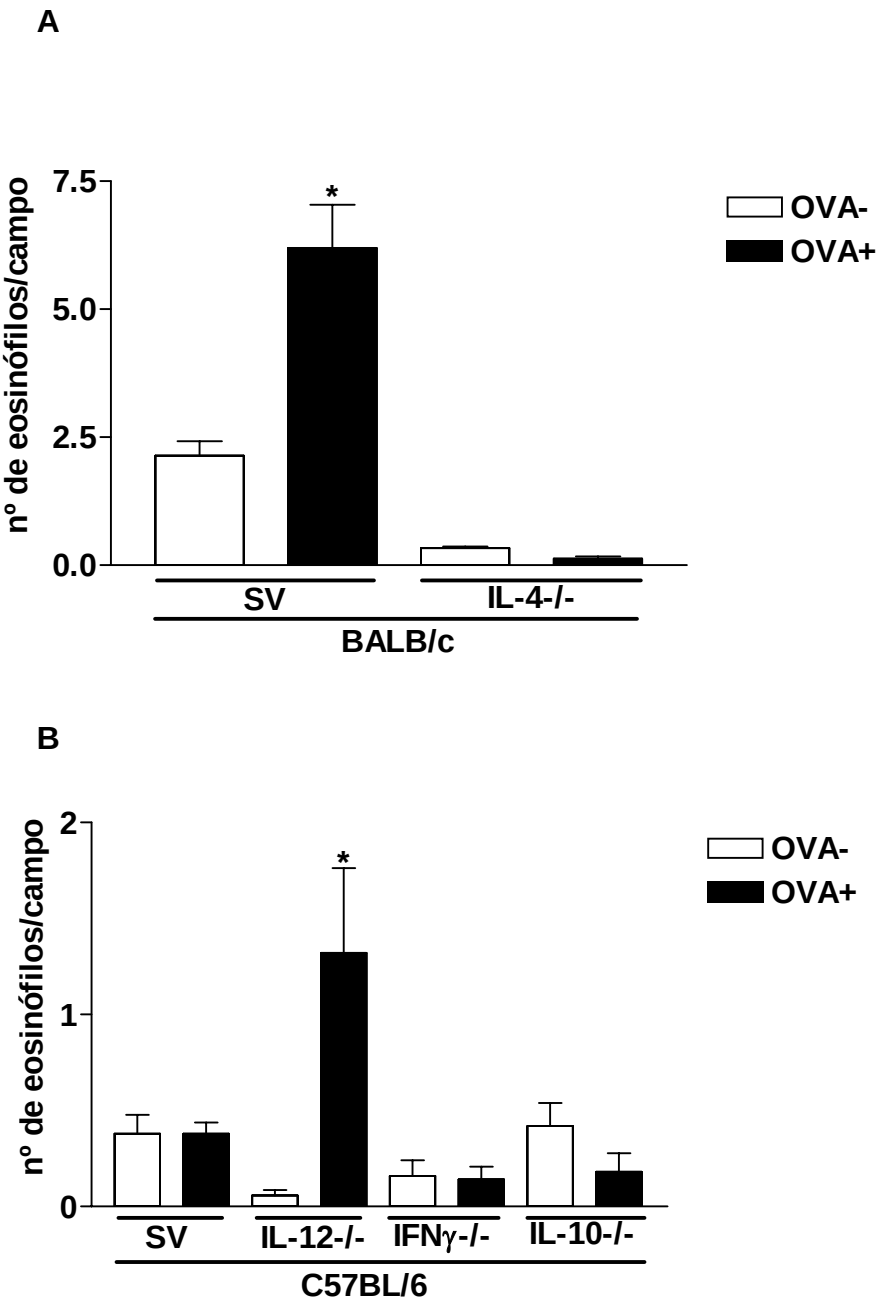


Figura 9: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal. Camundongos BALB/c, IL-4-/-, C57BL/6, IL-12-/- e IFN-γ-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO e os grupos controles permaneceram bebendo água. Após 14 dias, o jejuno proximal foi coletado e os eosinófilos infiltrados na mucosa foram contados em 10 campos. As barras representam a média dos valores de cada grupo. Foram utilizados 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle (OVA-)

5.3.2 Produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

A análise do muco produzido pelas células caliciformes das porções do intestino delgado foi realizada através da coloração dos cortes histológicos por P.A.S. A área das células caliciformes foi determinada através de análise morfométrica.

A ingestão crônica de SCO levou a um aumento significativo na secreção de muco pelas células caliciformes das porções do duodeno, jejuno proximal e jejuno distal em camundongos BABL/c sensibilizados quando comparados aos seus controles. Não houve diferença significativa na produção de muco quando comparadas as porções do íleo destes animais. Em contrapartida, a ingestão do antígeno pelos camundongos da mesma linhagem, porém deficientes em IL-4, não induziu aumento da secreção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado mesmo quando estes animais haviam sido submetidos ao protocolo de sensibilização (Figura 10 e Figura 11).

Após o desafio oral com SCO, os camundongos sensibilizados C57BL/6 selvagens e deficientes para as citocinas IL-12 e IFN-γ não apresentaram aumento na produção de muco no intestino delgado quando comparados aos seus controles (Figura 12 e Figura 13). Entretanto, C57BL/6 deficientes para IL-10, quando sensibilizados e desafiados, tiveram a produção de muco significativamente aumentada no jejuno proximal e mais de duas vezes maior no jejuno distal quando comparados aos seus controles não sensibilizados (Figura 14 e Figura 15).

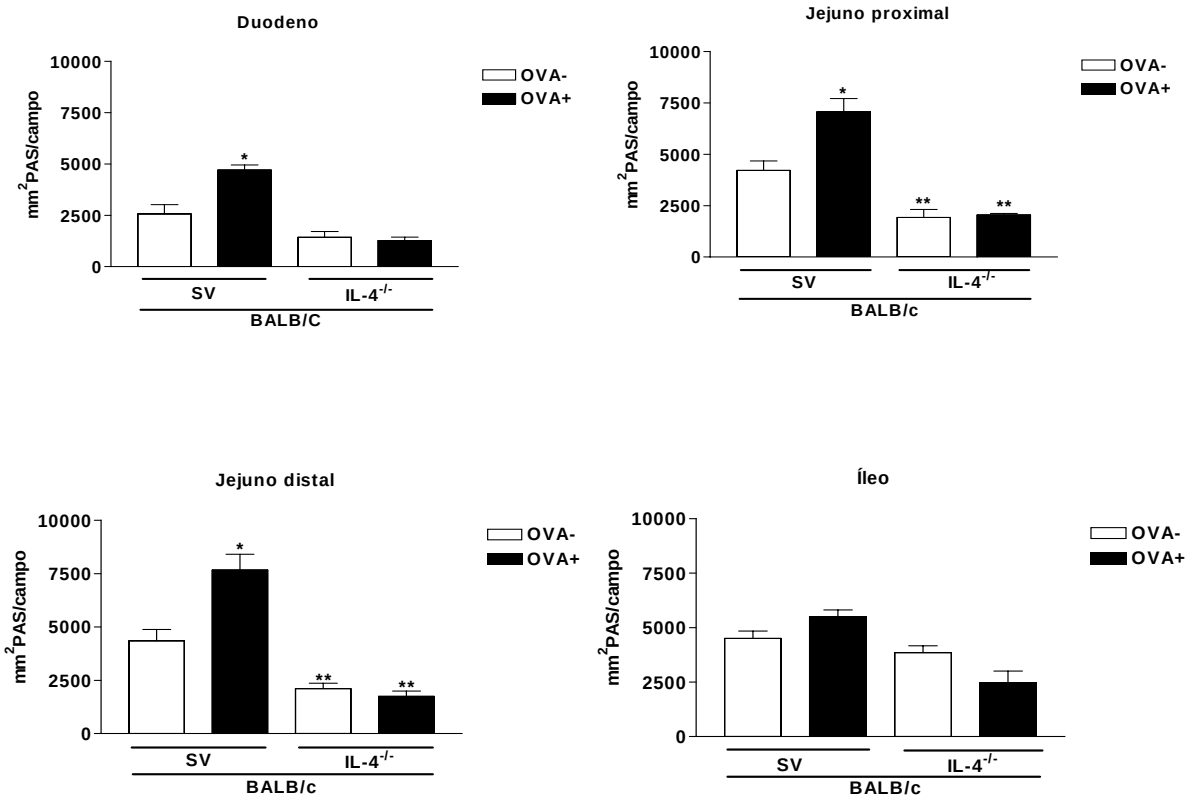


Figura 10: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c selvagens e deficientes para IL-4. Camundongos BALB/c selvagens e IL-4-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. Os grupos controle (OVA-) receberam apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO e os grupos controles permaneceram bebendo água. Após 14 dias, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado. Foram analisados 3 campos de cada porção do intestino. As barras representam a média dos valores de cada grupo. Foram utilizados 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao grupo selvagem controle (OVA-). **P<0,05 em relação ao grupo selvagem controle (OVA-) e sensibilizado (OVA+).

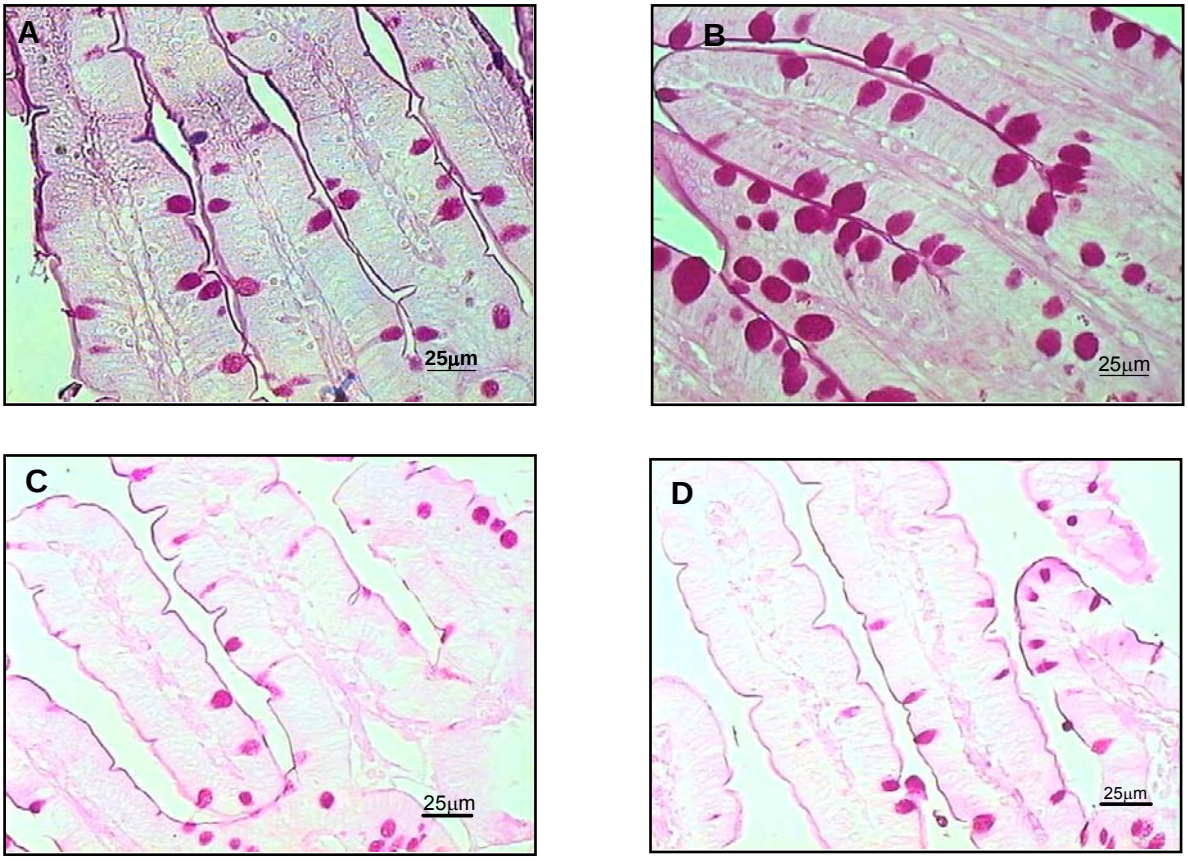


Figura 11: Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos BALB/c selvagens e deficientes para IL-4. Camundongos BALB/c selvagens e IL-4-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg de OVA + 1mg de $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg de OVA no dia 14. Os grupos controle (OVA-) receberam apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO e os grupos controle permaneceram bebendo água. Após 14 dias, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através de coloração por P.A.S. A) Camundongo BALB/c selvagem controle; B) Camundongo BALB/c selvagem sensibilizado; C) Camundongo IL-4-/- controle; D) Camundongo IL-4-/- sensibilizado. Aumento 40X.

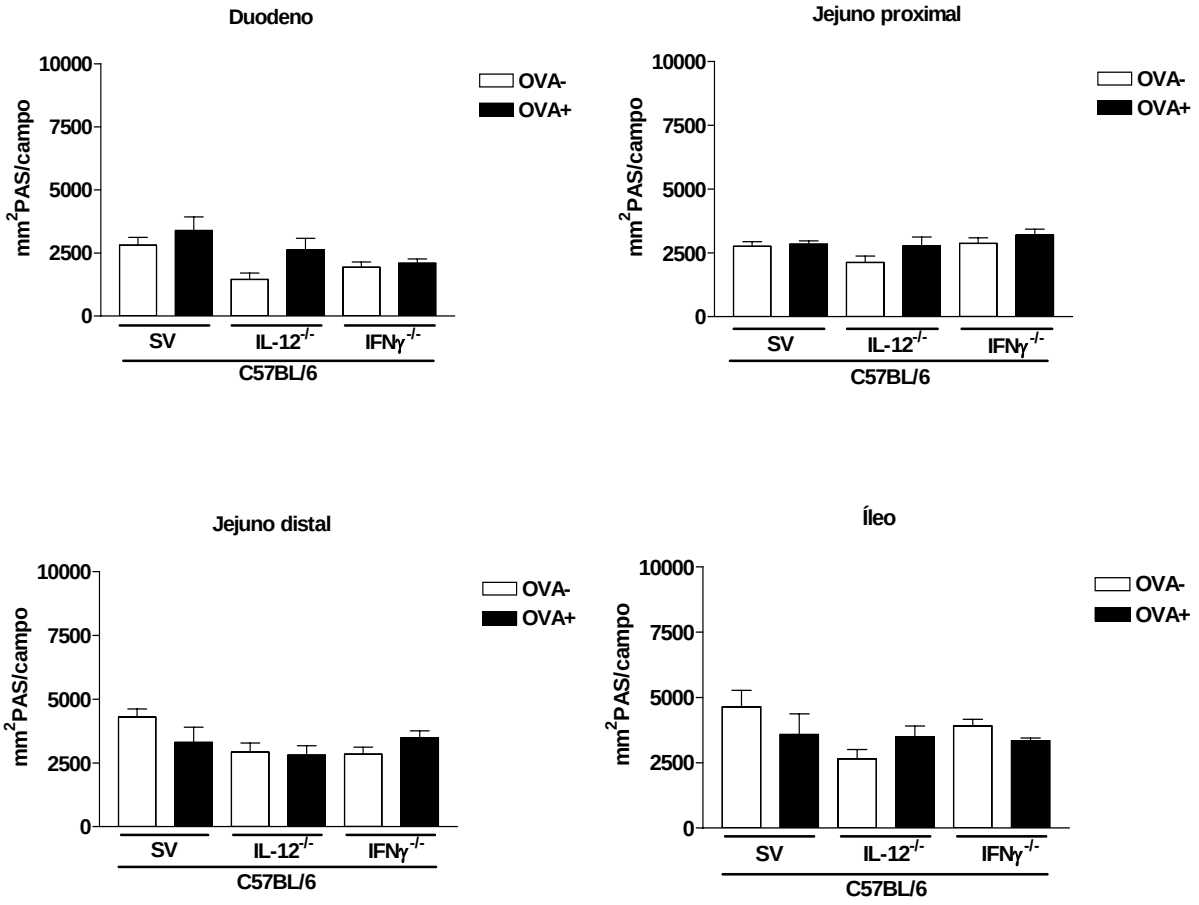


Figura 12: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para as citocinas IL-12 e IFN-γ. Camundongos C57BL/6, IL-12-/- e IFN-γ-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. Os grupos controles (OVA-) receberam apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO e os grupos controles permaneceram bebendo água. Após 14 dias, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado. Foram analisados 3 campos de cada porção do intestino. As barras representam a média dos valores de cada grupo. Foram utilizados 5 animais/grupo.

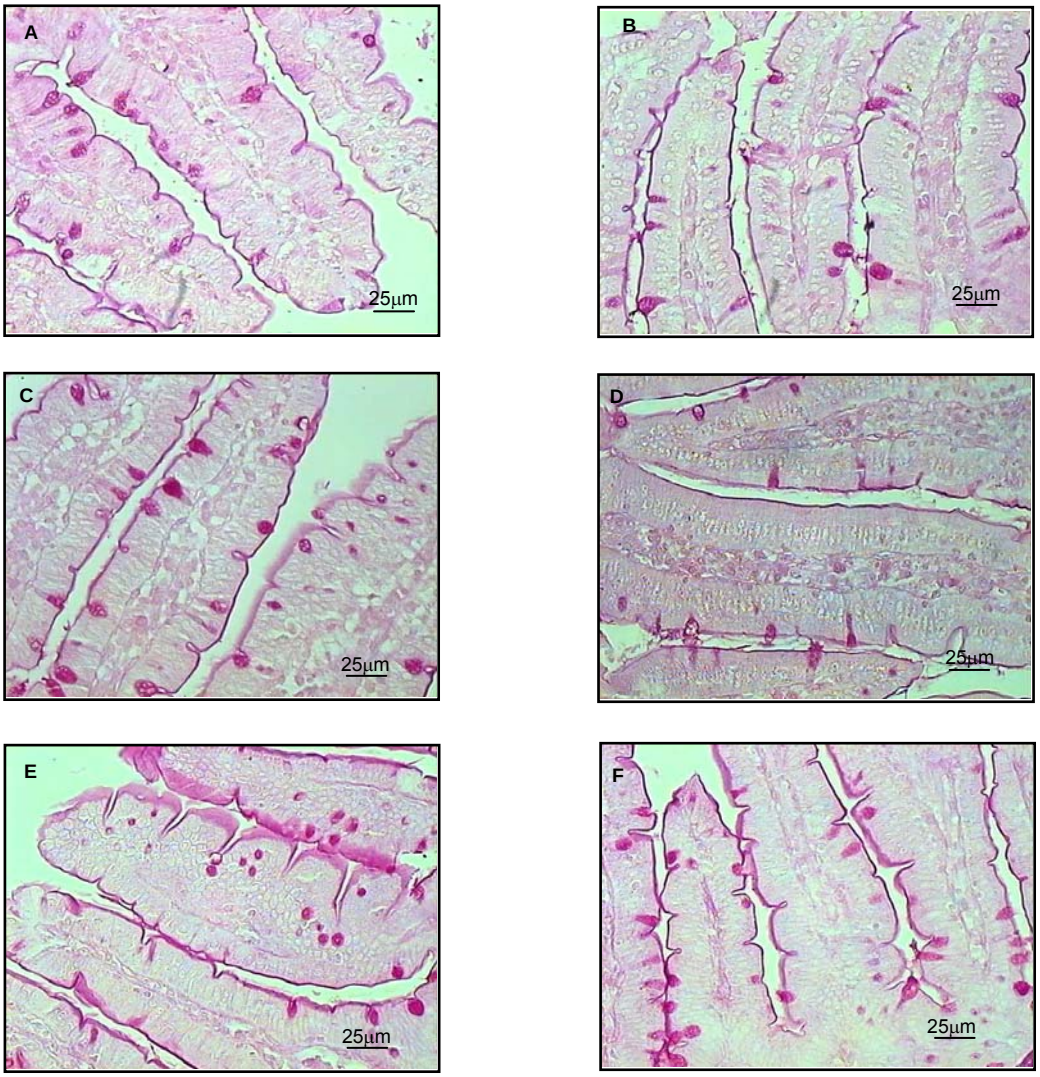


Figura 13: Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para as citocinas IL-12 e IFN. Camundongos C57BL/6 selvagens, IL-12 e IFN-γ-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg de OVA + 1mg de $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg de OVA no dia 14. Os grupos controle (OVA-) receberam apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO e os grupos controle permaneceram bebendo água. Após 14 dias, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através de coloração por P.A.S. A) Camundongo C57BL/6 selvagem controle; B) Camundongo C57BL/6 selvagem sensibilizado; C) Camundongo IL-12-/- controle; D) Camundongo IL-12-/- sensibilizado; E) Camundongo IFN-γ-/- controle; F) Camundongo IFN-γ-/- sensibilizado. Aumento 40X.

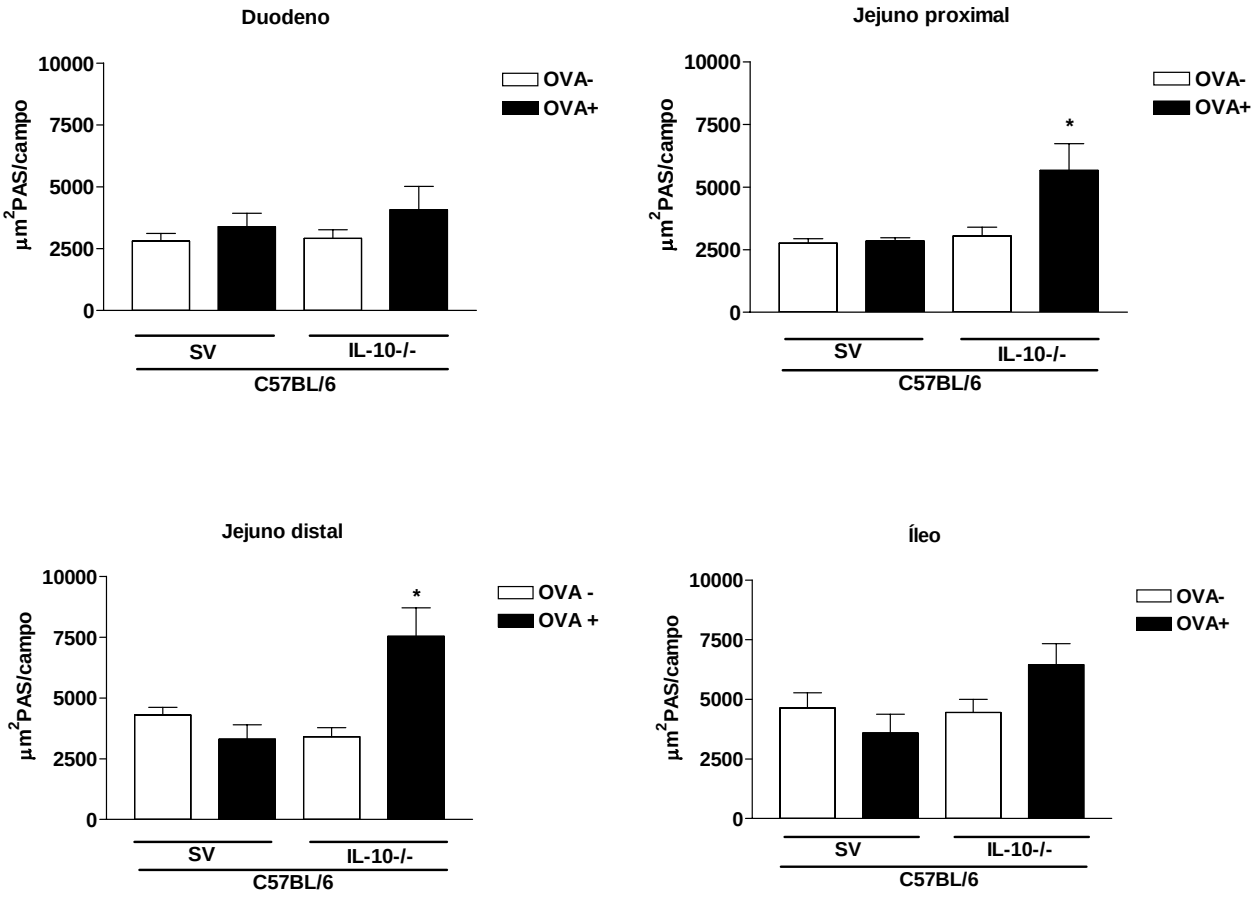


Figura 14: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos C57BL/6 selvagens e deficiente para a citocina IL-10. Camundongos C57BL/6, IL-12-/- e IFNγ-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. Os grupos controles (OVA-) receberam apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO e os grupos controles permaneceram bebendo água. Após 14 dias, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado. Foram anlisados 3 campos de cada porção do intestino. As barras representam a média dos valores de cada grupo. Foram utilizados 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle (OVA-)

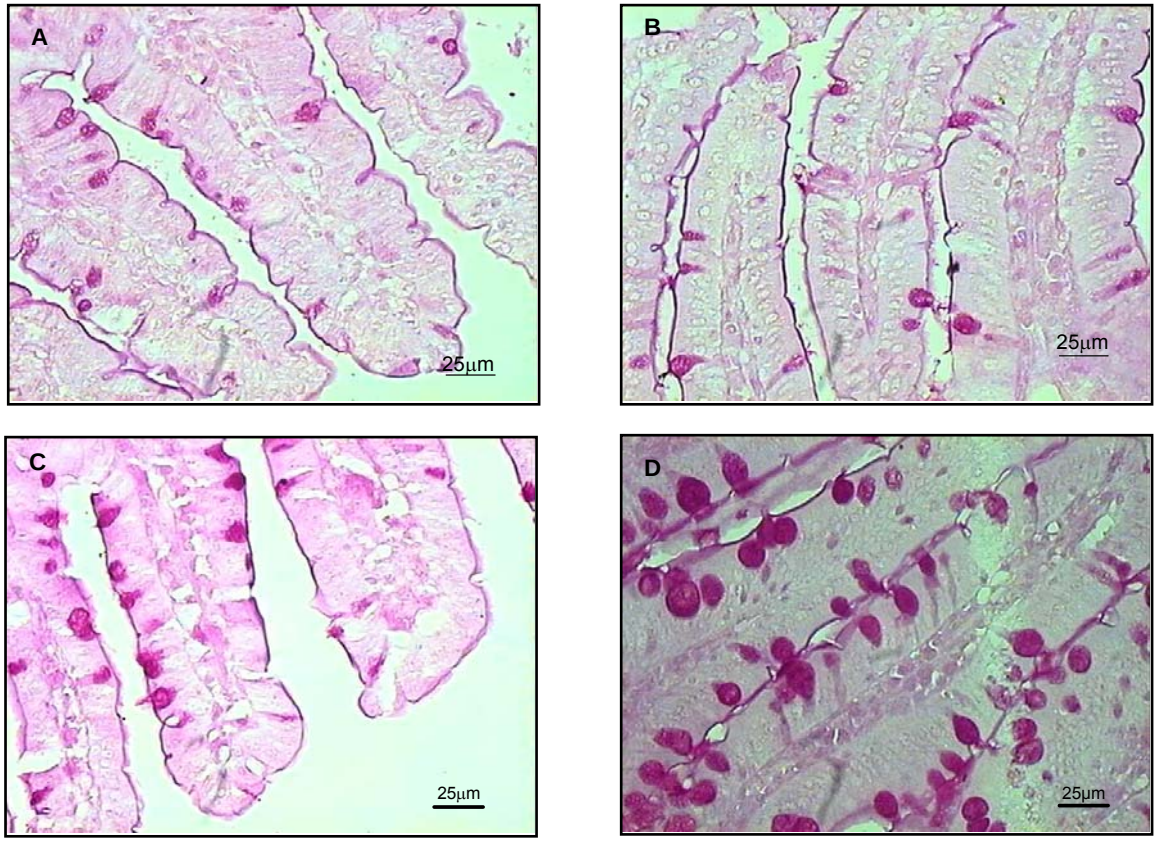


Figura 15: Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para IL-10. Camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes para IL-10 foram sensibilizados (OVA+) com 10μg de OVA + 1mg de $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg de OVA no dia 14. Os grupos controle (OVA-) receberam apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO e os grupos controle permaneceram bebendo água. Após 14 dias, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através de coloração por P.A.S. A) Camundongo C57BL/6 selvagem controle; B) Camundongo C57BL/6 selvagem sensibilizado; C) Camundongo IL-10-/- controle; D) Camundongo IL-10-/- sensibilizado. Aumento 40X.

5.4 Avaliação da perda de peso corpóreo

A Figura 16A mostra que os animais BALB/c selvagens sensibilizados tiveram uma perda de aproximadamente 15% do peso corpóreo após o contato com o antígeno através da ingestão de SCO até o final do experimento.

Entretanto, os camundongos IL-4-/-, mesmo pertencendo à mesma linhagem, não apresentaram perda de peso corpóreo quando submetidos ao protocolo de sensibilização e desafio antigênico (Figura 16B).

Animais C57BL/6 selvagens ou deficientes para as citocinas IL-10, IL-12 e IFN-γ não mostraram perda de peso em momento algum do experimento (Figura 16C, D, E e F).

5.5 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA

5.5.1) Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA antes do desafio com SCO

Sete dias após a sensibilização secundária foi realizada sangria nos animais dos grupos controle (OVA-) e sensibilizados (OVA+). O soro foi coletado para análise dos níveis séricos dos anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA. Com exceção do grupo de camundongos deficientes para IL-4, todos os demais grupos sensibilizados com OVA apresentaram níveis significativamente aumentados de IgE e IgG1 anti-OVA quando comparados aos seus controles (Figura 17).

Após a sensibilização, camundongos BALB/c selvagens apresentaram níveis de IgE mais de 2 vezes maior e níveis de IgG1 mais de 5 vezes maior quando comparados aos níveis destes anticorpos medidos no grupo controle (Figura 17 A e C).

Os camundongos C57BL/6 apresentaram níveis de IgE e IgG1 anti-OVA menores que os animais BALB/c. Entretanto, a sensibilização dos animais C57BL/6 selvagens com o antígeno foi capaz de aumentar em mais de 5 vezes os níveis de IgE e em 4 vezes os níveis de IgG1 anti-OVA em relação aos animais do grupo controle. Entre os animais desta mesma linhagem deficientes para as citocinas (IL-12-/-, IFN-γ-/-

IL-10-/-), os níveis de anticorpos após a sensibilização sofreram grande aumento em relação aos seus controles não sensibilizados (Figura 17 B e D). É importante notar que, após a sensibilização, os animais deficientes para IFN-γ-/- e IL-12-/- apresentaram níveis de IgE e IgG1 anti-OVA significativamente maiores quando comparados aos camundongos selvagens também sensibilizados.

5.5.2) Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA após o desafio com SCO

Sangrias foram realizadas durante a necropsia 14 dias após o desafio com SCO nos animais estudados (BALB/c, IL-4-/-, C57BL/6, IL-12-/-, IFN-γ-/- e IL-10-/-) para análise da produção de anticorpos anti-OVA IgE e IgG1 (Figura 18). A ingestão prolongada da solução contendo o antígeno (ovalbumina) foi capaz de manter ou aumentar os níveis destes anticorpos nos grupos sensibilizados até o final do experimento, com exceção dos animais IL-4-/-.

Os camundongos BALB/c selvagens sensibilizados tiveram seus níveis de IgE aumentados em 37% e os níveis de IgG1 em mais de 2 vezes após a ingestão restrita de SCO (Figura 18 A e C).

Entre os animais C57BL/6 selvagens e deficientes sensibilizados, os níveis significativamente aumentados de IgE e IgG1 anti-OVA foram mantidos após o desafio antigênico (Figura 18 B e D). Foi demonstrado também que após a ingestão de SCO, os camundongos deficientes para as citocinas IL-12 (IL-12-/-) e IFN-γ (IFN-γ-/-) tiveram a produção dos anticorpos aumentadas em relação ao controle selvagem sensibilizado.

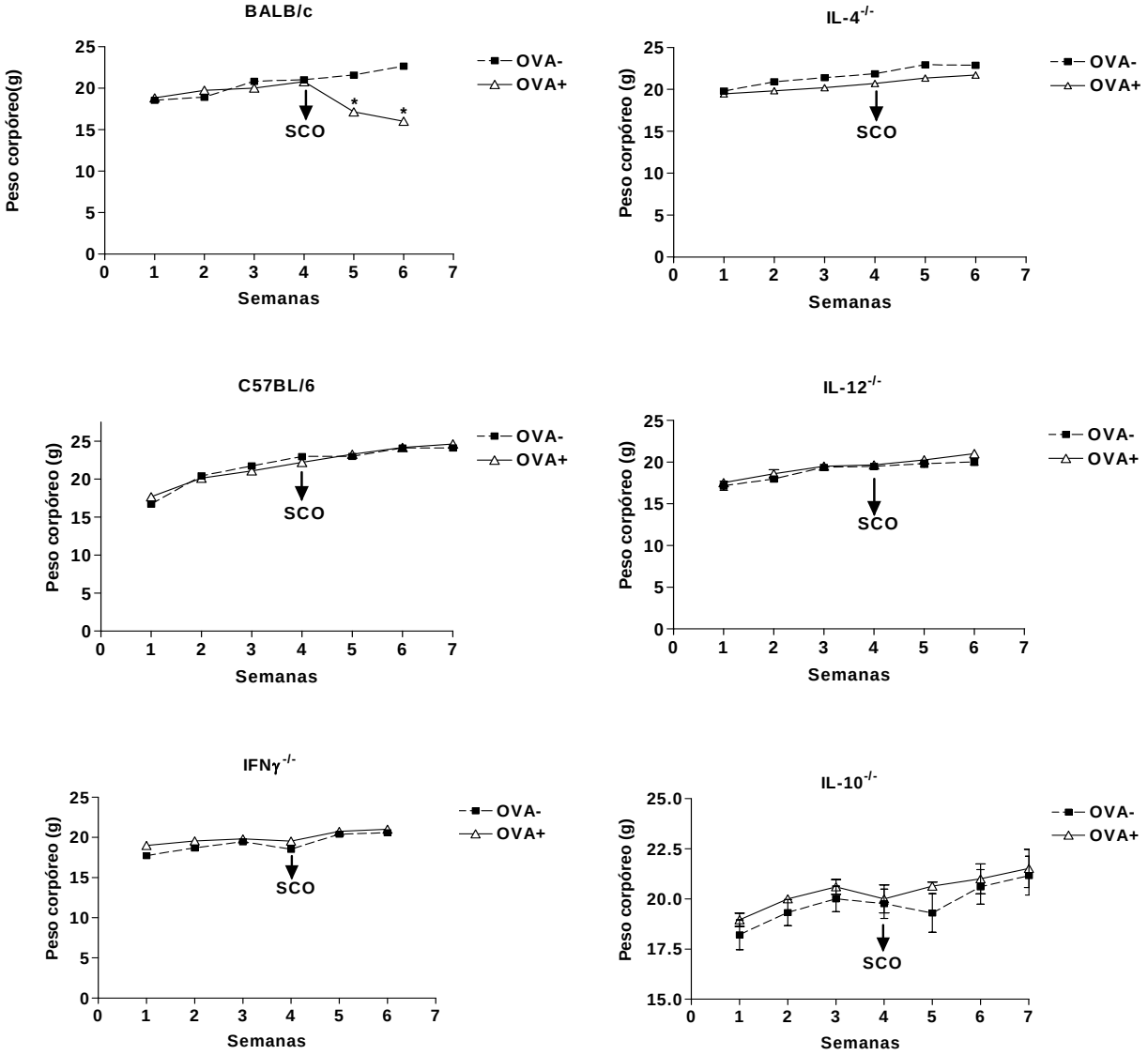


Figura 16: Avaliação do peso corpóreo. Camundongos BALB/c, IL-4-/-, C57BL/6, IL-12-/-, IFN-γ-/- e IL-10-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO, enquanto o grupo controle permaneceu ingerindo água. Os animais foram pesados semanalmente ao longo de todo o experimento. Foram utilizados 5 animais/grupo. *P<0.05 em relação ao seu grupo controle. Solução de clara de ovo a 20% (SCO).

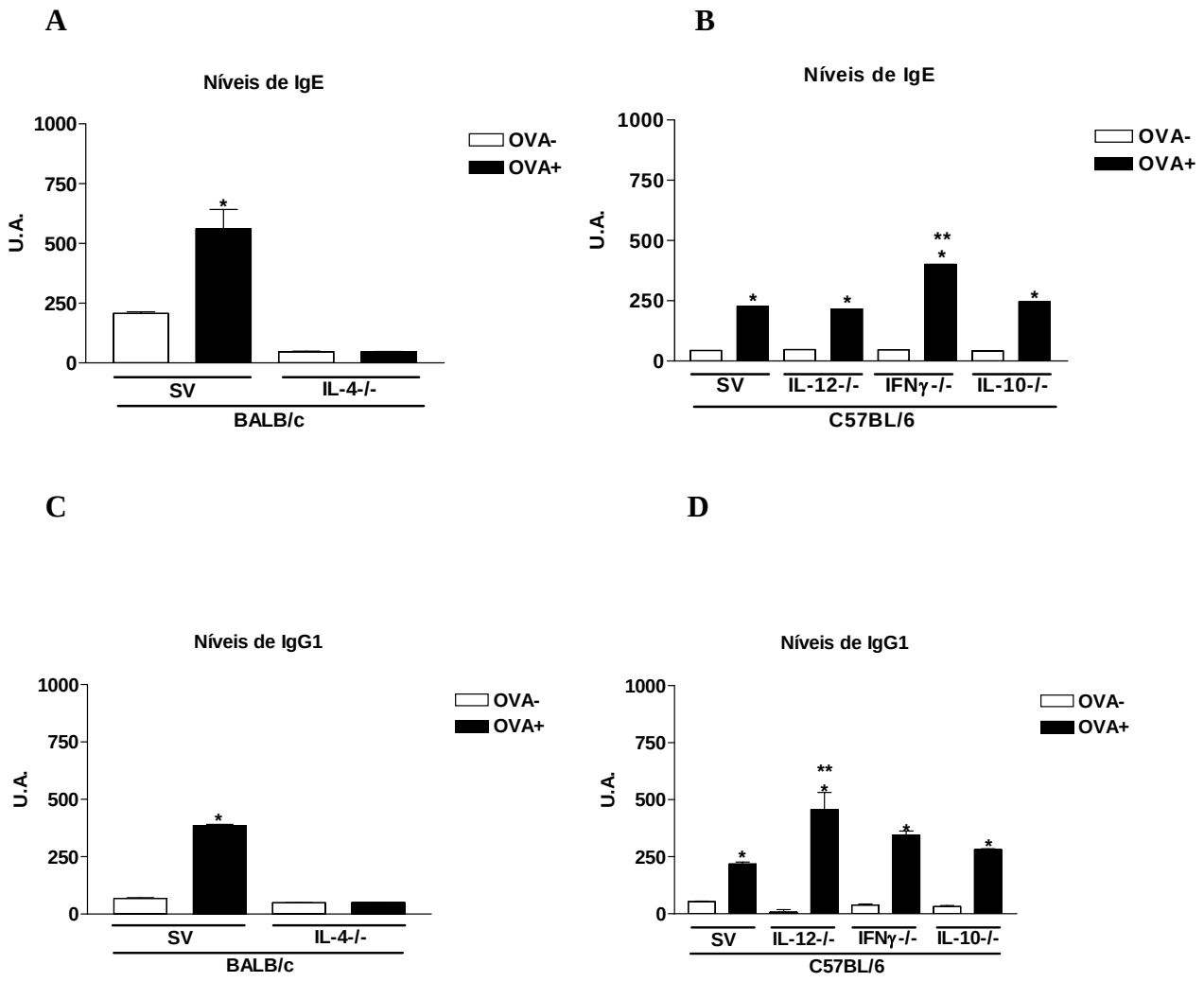


Figura 17: Avaliação dos anticorpos IgE e IgG1 anti-OVA antes do desafio com SCO. Camundongos BALB/c, IL-4-/-, C57BL/6, IL-12-/- e IFN-γ-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Antes de serem desafiados com SCO, foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem das imunoglobulinas IgE e IgG1 anti-OVA. As barras representam a média dos valores de cada grupo obtidos em amostras de soro total para IgE e na diluição 1:1600 para IgG1 comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A). Foram utilizados 5 animais/grupo. *P<0.05 em relação ao seu grupo controle (OVA-). **P<0.05 em relação ao seu grupo controle (OVA-) selvagem (SV).

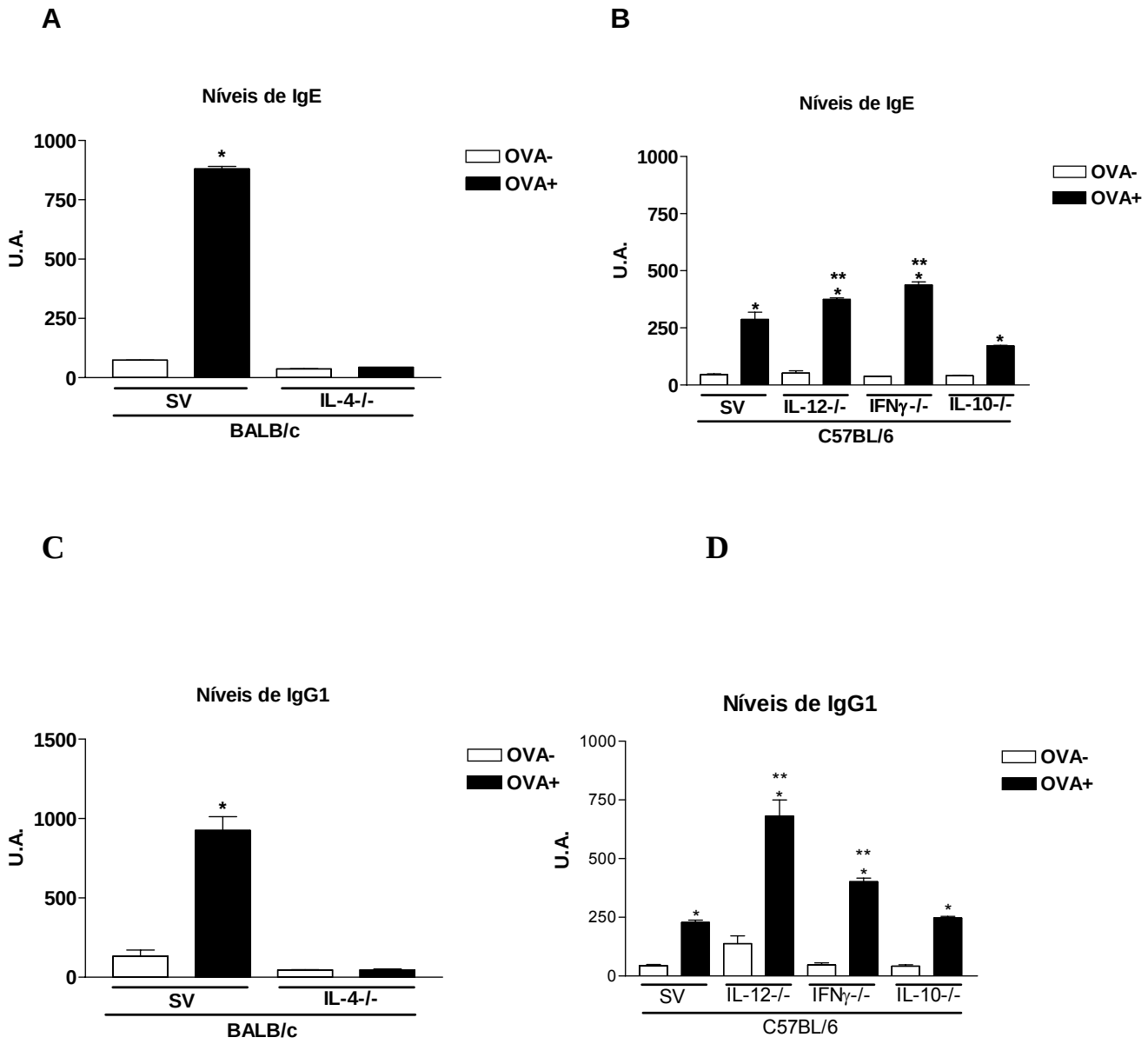


Figura 18: Avaliação dos anticorpos IgE (A e B) e IgG1 (C e D) anti-OVA após o desafio com SCO. Camundongos BALB/c, IL-4-/-, C57BL/6, IL-12-/- e IFN-γ-/- foram sensibilizados (OVA+) com 10μg OVA + 1mg $Al(OH)_3$ no dia 0 e 10μg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas $Al(OH)_3$ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos sensibilizados foram substituídas por SCO. Após 14 dias, foi realizada a necropsia e o soro foi coletado para a dosagem de IgE A e B) e IgG1(C e D) anti-OVA. As barras representam a média dos valores de cada grupo obtidos em amostras de soro total para IgE e na diluição 1:1600 para IgG1 comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A). Foram utilizados 5 animais/grupo. *P<0.05 em relação ao seu grupo controle (OVA-). **P<0.05 em relação ao seu grupo controle selvagem (SV) sensibilizado (OVA+).

6. DISCUSSÃO

A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata do tipo I mediada por IgE. Os mastócitos são as células efetoras destas reações que ocorrem quando indivíduos entram em contato com os antígenos da dieta aos quais foram previamente sensibilizados. Ao realizar ligações cruzadas entre várias moléculas de IgE ligadas aos receptores na superfície dos mastócitos, o antígeno induz a ativação destas células e a liberação de vários mediadores. Entre esses mediadores, muitas citocinas, entre elas a IL-4, IL-5, IL-10 e o TNF-α, são liberadas pelos mastócitos e contribuem para as respostas alérgicas (BENOIST & MATHIS, 2002).

Além dos mastócitos, as células T também participam no desencadeamento das respostas alérgicas. As células T específicas aos antígenos alimentares secretam preferencialmente citocinas de perfil Th2 como IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10 que irão contribuir para o desencadeamento da reação alérgica (ROMAGNANI, 2000). Em contrapartida, as citocinas produzidas pelas células Th1, principalmente o IFN-γ e a IL-12, inibem as respostas das células Th2 nas doenças alérgicas (IWAMOTO *et al*., 1993; COHN *et al.,* 1999).

Sabendo-se a importante participação das citocinas no processo alérgico, decidimos investigar a produção dessas substâncias no intestino e baço dos camundongos BALB/c selvagens sensibilizados com OVA após vários tempos de desafio com solução de clara de ovo.

Os níveis de IL-4 estavam diminuídos no intestino dos animais alérgicos após 14 dias e no baço após 4 a 7dias de ingestão contínua do antígeno em relação aos níveis dessa citocina medidos nos tecidos de animais controle. Nos outros tempos de desafio, não houve alterações significativas da IL-4 no intestino ou baço dos camundongos sensibilizados. Um aumento dos níveis dessa citocina era esperado, uma vez que o hidróxido de alumínio utilizado como adjuvante na sensibilização desses animais induz a produção de IgE e IgG1 através de um mecanismo dependente de IL-4 (FAQUIM-MAURO & MACEDO, 2000). Entretanto, é possível que nas primeiras horas de ingestão da solução de clara de ovo, os níveis de IL-4 estejam aumentados. Em 2004, um estudo demonstrou o aumento da produção de IL-4 pelas células da placa de Peyer e do linfonodo mesentérico de camundongos sensibilizados 30 minutos após gavagem

com o antígeno ao qual haviam sido sensibilizados (FOSSARD *et al*., 2004). Nos tempos de desafio antigênico investigados nesse trabalho, a ingestão crônica do antígeno pode ter contribuído para o consumo de grande parte da IL-4 pelo mecanismo de indução da secreção de anticorpos específicos.

Esperávamos que houvesse um aumento da produção de IL-5 nos tecidos investigados, uma vez que foi sugerido que essa citocina pode induzir a infiltração eosinofílica na mucosa intestinal em modelos murinos de alergia alimentar (BAE *et al*., 1999). Apesar de termos observado, no nosso trabalho, um aumento do número de eosinófilos na mucosa intestinal, a produção da citocina IL-5 foi diminuída com a ingestão prolongada da solução de clara de ovo, atingindo níveis não detectáveis após 21 dias de desafio antigênico tanto no intestino quanto no baço dos animais alérgicos. A secreção da IL-5 *in vitro* por mastócitos após ligação da IgE ao receptor de alta afinidade já foi descrita (BRESSLER *et* al., 1997). Apesar disso, nossos resultados de dosagem de IL-5 em tecidos estão de acordo com um outro estudo no qual essa citocina não foi detectada em dosagem *in vitro* após indução de anafilaxia por injeção intra-peritoneal de OVA em camundongos sensibilizados (OKUNUKI *et al*., 2003).

Ao investigarmos a produção das citocinas de perfil Th1, observamos que os níveis de IL-12 não sofreram alterações significativas no intestino dos animais alérgicos, mas foram diminuídos no baço após 4 a 7 dias de ingestão da solução de clara de ovo em comparação aos níveis basais dos animais do grupo controle. Já o IFN-γ foi diminuído a níveis não detectáveis no baço dos camundongos sensibilizados após 21 dias de ingestão do antígeno, não sendo detectada a produção dessa citocina no intestino dos animais do grupo controle ou alérgicos em nenhum dos tempos investigados. A redução dos níveis dessas citocinas era esperada, uma vez que tanto o IFN-γ como a IL-12 têm sido inversamente correlacionados à progressão dos processos alérgicos. Geralmente, a produção de IFN-γ por células T de pacientes alérgicos é menor quando comparada com pacientes não alérgicos (SCOTT-TAYLOR *et al*., 2005).

A diminuição dos níveis de citocinas do tipo Th1, como já comentado, encontra coerência com um modelo de alergia, no entanto a diminuição, ou simples ausência, das citocinas Th2 é um resultado inesperado. Por um lado pode ser que o estímulo seja proveniente de contato célula-célula, tornando-se difícil a detecção pelos métodos

utilizados. Por outro lado, é possível a diminuição da produção de todas as citocinas seja resultado de uma resposta reguladora da mucosa intestinal. A diminuição da produção de citocinas observada nos tecidos dos camundongos alérgicos pode ser conseqüência de uma regulação da resposta imune desencadeada pelo antígeno fornecido por via oral de forma crônica.

A IL-10 é uma citocina reguladora das funções efetoras tanto das células Th1 quanto Th2 (HAWRYLOWICZ & O´GARRA, 2005). Foi demonstrado que uma baixa produção de IL-10 pelas células da Placa de Peyer favorece o desenvolvimento da alergia alimentar e ao contrário, níveis aumentados dessa citocina seriam capazes de controlar essa patologia (FROSSARD *et al*., 2004). No nosso modelo, esperaríamos, portanto, que a IL-10 estivesse aumentada, já que está havendo diminuição das citocinas com a ingestão prolongada do antígeno. Entretanto, não foram observadas alterações significativas dos níveis da IL-10 no intestino ou no baço dos animais alérgicos na maioria dos tempos de desafio analisados, sendo essa citocina diminuída a níveis não detectáveis no intestino dos animais após 7 dias de ingestão da solução de clara de ovo.

A IL-10 também está relacionada com a proteção da mucosa intestinal. A célula epitelial do intestino, através da ação da IL-10, pode responder às infecções e outras agressões, permitindo que haja uma modulação da resposta imune e da inflamação no trato digestivo (KHUN *et al*, 1993). Essa citocina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células Th1, além de inibir a ativação de células Th2 e a troca de isotipo para IgE nas células B (HAWRYLOWICZ & O´GARRA, 2005). Além disso, estudos demonstram que o receptor da IL-10 está presente nas células epiteliais dos intestinos delgado e grosso de camundongos (DENNING *et al*, 2000).

Além da IL-10, outros fatores também estão envolvidos no controle da inflamação da mucosa intestinal desencadeada pela absorção exacerbada de antígenos da dieta. Entre estes fatores, a produção de muco funciona como barreira à transcitose de antígenos alimentares através do epitélio intestinal, além de ser um reservatório de IgA.

No nosso modelo de alergia alimentar, camundongos BALB/c apresentam aumento da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

(SALDANHA *et al*., 2004). A IL-4 está envolvida na hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes (BLANCHARD *et al*., 2004). A importância da IL-4 para a produção de muco foi confirmada no nosso trabalho quando utilizamos animais deficientes para essa citocina e a produção do muco ficou prejudicada. Outra explicação para a quantidade diminuída de muco no intestino dos animais deficientes para IL-4 é o fato da impossibilidade de sensibilização antigênica desses animais, demonstrada pelos baixos níveis de IgE e IgG1. Portanto, o aumento do muco com a função de barreira à absorção do antígeno não se faz necessária.

Ao contrário dos animais BALB/c, os camundongos C57BL/6 selvagens ou deficientes para as citocinas IL-12 ou IFN-γ não apresentaram aumento da produção de muco no intestino ao serem submetidos ao protocolo de indução da alergia alimentar. É importante lembrar, entretanto, que os animais C57BL/6 sensibilizados produziram níveis de IgE e IgG1 aumentados em relação aos seus controles, mas estes níveis não eram tão elevados quanto os produzidos pelos animais BALB/c sensibilizados. Sendo assim, podemos inferir que a resposta alérgica nos animais C57BL/6, mesmo na ausência de citocinas Th1, é diminuída em relação aos animais BALB/c.

Entretanto, quando animais dessa linhagem eram deficientes para a citocina IL-10, foi observado um aumento significativo do muco em relação aos controles não sensibilizados. Como os animais C57BL/6 selvagens não apresentaram esta alteração após sensibilizados e desafiados com solução de clara de ovo, o aumento da secreção de muco observado nos animais IL-10-/- pode ter atuado como um mecanismo compensatório para a ausência desta citocina antiinflamatória. Nestes animais, o aumento do muco diminuiria a absorção antigênica evitando, assim, a perda de peso corpóreo e a produção de IgE e IgG1 decorrentes da alergia alimentar.

Outra alteração da mucosa intestinal de camundongos BALB/c decorrente da alergia alimentar é o aumento do infiltrado de eosinófilos durante todo período de ingestão do antígeno (SALDANHA *et al*., 2004). Em doenças alérgicas crônicas, os eosinófilos são ativados pela IL-5 e atraídos por quimiocinas para o local da inflamação. Essas células são responsáveis pela fase tardia da reação alérgica imediata, produzindo proteína básica que é tóxica ao epitélio (CARA *et al*., 2000).

Os camundongos deficientes para a IL-4 sensibilizados, assim como seus controles, apresentaram um infiltrado de eosinófilos no jejuno proximal significativamente diminuído em comparação aos animais selvagens, mesmo após a ingestão prolongada da solução de clara de ovo. Este resultado está de acordo com estudos preliminares que demonstraram que a IL-4 regula o recrutamento de eosinófilos induzido pelo antígeno na inflamação alérgica das vias aéreas (BRUSSELLE *et al*., 1994). Em um modelo de asma em camundongos, o tratamento com anticorpos anti-IL-4 foi capaz de diminuir em 10 vezes o infiltrado de eosinófilos no lavado broncoalveolar (LUKACS *et al*., 1994).

O aumento do infiltrado eosinofílico não foi observado em animais C57BL/6 sensibilizados após o desafio antigênico. Apenas quando estes animais eram deficientes para a IL-12 houve um aumento extremamente significativo do número de eosinófilos no jejuno proximal. Esse resultado confirma outros estudos que demonstraram que a IL-12 diminui o infiltrado desses leucócitos em modelos de inflamação alérgica das vias aéreas (WU *et al*., 2006; MATSUSE *et al*., 2003). Nesses modelos, a ação da IL-12 se dá através da inibição da diferenciação dos eosinófilos a partir de seus progenitores da medula óssea, sendo esse efeito mediado pelo IFN-γ (RAIS *et al*., 2002). Sabendo-se a participação do IFN-γ na diminuição do infiltrado de eosinófilos em modelos de inflamação alérgica das vias aéreas, era esperado que os camundongos deficientes para essa citocina, no nosso trabalho, apresentassem aumento do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal. Como não foi observado o aumento dessas células, o recrutamento de eosinófilos para a mucosa intestinal pode envolver um mecanismo diferente daquele que ocorre na mucosa respiratória.

A aversão ao antígeno observada nos animais alérgicos atua como um mecanismo adicional de proteção à entrada de antígenos por via oral, contribuindo dessa forma, para a manutenção da integridade da mucosa intestinal.

Camundongos BALB/c mostraram aversão à ingestão da solução do antígeno com o qual tinham sido previamente sensibilizados. Entretanto, na ausência da citocina IL-4, mesmo tendo sido submetidos ao protocolo de sensibilização com a ovalbumina, esses animais não evitaram a ingestão da SCO adocicada. É importante lembrar que os animais BALB/c selvagens produziram altos níveis de IgE e IgG1 específicas à

ovalbumina após a sensibilização e que estes níveis foram ainda maiores após a ingestão do antígeno. Entretanto, na ausência da IL-4, essa resposta humoral acentuada não ocorreu, uma vez que essa citocina é crucial para a síntese IgE e IgG1 (BACHARIER & GEHA, 2000; FAQUIM-MAURO *et al*., 1999).

A observação de que os animais IL-4-/- produziram níveis extremamente baixos de IgE e IgG1 anti-OVA sugere que o desencadeamento da aversão à ingestão do antígeno é dependente da produção de anticorpos específicos para o antígeno com o qual o animal havia sido sensibilizado. Outros estudos já haviam demonstrado que a produção de IgE é essencial para o desenvolvimento da aversão alimentar (BASSO *et al.*, 2003; ANDRADE, 1999). Em um destes estudos, o tratamento com anticorpos anti-IgE 7 dias antes do desafio oral preveniu a aversão à ingestão de SCO por camundongos sensibilizados com OVA (BASSO *et al*., 2003). Além disso, foi demonstrado que quando esses animais eram submetidos a um protocolo de indução de tolerância oral à ovalbumina, o comportamento de aversão ao antígeno não era mais observado (ANDRADE, 1999).

Os animais da linhagem C57BL/6 selvagens ou deficientes para as citocinas (IL-12-/-, IFN-γ-/- e IL-10-/-) não apresentaram aversão à ingestão de SCO adocicada mesmo quando sensibilizados com OVA. Como estes animais produziram níveis de IgE e IgG1 significativamente elevados em relação aos seus controles, podemos sugerir que a produção de anticorpos específicos é essencial, mas não é o único fator necessário para a ocorrência de aversão à ingestão do antígeno.

Os mesmos animais que demonstraram aversão à ingestão ao antígeno na possibilidade de escolha da fonte líquida, desenvolveram um quadro marcante de alergia alimentar quando foram submetidos à ingestão restrita de SCO. Podemos inferir, portanto, que o mesmo mecanismo que desencadeia o comportamento de aversão ao antígeno nos animais sensibilizados com OVA leva também à ocorrência da alergia alimentar.

Existem evidências que sugerem que a alergia alimentar é capaz de influenciar mudanças de comportamento e de alterar funções cerebrais. Foi demonstrado, por exemplo, que a aversão à ingestão do antígeno por animais sensibilizados está associada a níveis aumentados de ansiedade e aumento da ativação de neurônios de

áreas cerebrais relacionadas à emoção. Tanto o desenvolvimento da aversão alimentar quanto a ativação cerebral parecem ser induzidos pela degranulação de mastócitos dependente de IgE, uma vez que estes eventos não acontecem após o tratamento dos animais com anticorpo anti-IgE (BASSO *et al*, 2003; BASSO *et al*, 2004). Foi demonstrado que um grande número de mastócitos está em contato com as inervações peptidérgicas no intestino de ratos saudáveis e com inflamação intestinal (STEAD *et* al., 1987). Portanto, é provável que a degranulação dos mastócitos induzida pela IgE seja o principal mecanismo de sinalização da alergia alimentar para o sistema nervoso.

Algumas citocinas inibem a ingestão alimentar através da modulação de atividades gastrointestinais como a motilidade e o esvaziamento gástrico. A ação dessas substâncias pode ocorrer de forma direta no trato gastrointestinal ou ser mediada pelo sistema nervoso autônomo. Além disso, algumas citocinas induzem a liberação de hormônios relacionados à saciedade alimentar, como por exemplo o glucagon, a insulina e a leptina (PLATA-SALAMÁN, 2000). Em 2002, um estudo correlacionou a indução da expressão de níveis elevados de TNF e IL-6 no cérebro e a ocorrência de aversão a sabores em camundongos BALB/c (AGNELLO *et al*., 2002).

Um dos sintomas mais significativos apresentados pelos camundongos BALB/c no modelo de alergia alimentar utilizado neste trabalho é a perda de peso corpóreo (SALDANHA *et al*, 2004). Esse emagrecimento não foi associado a um menor consumo líquido, nem a um menor consumo de ração (SALDANHA, 2006). Experimentos anteriores realizados no nosso laboratório demonstraram ainda que a perda de peso corpóreo não tem como causa uma má absorção dos nutrientes provenientes da dieta, uma vez que a mucosa intestinal, analisada morfometricamente, apresentou-se íntegra. Além disso, não houve alteração dos níveis de albumina sérica. A desidratação também foi excluída como possível causa para este emagrecimento, visto que o teste de micro-hematócrito não se mostrou alterado.

A perda de peso, neste caso, pode estar associada a fatores imunológicos dependentes de citocinas Th2, uma vez que os animais BALB/c deficientes para a citocina IL-4, além de não produzirem anticorpos anti-OVA, não perderam peso corpóreo quando submetidos ao protocolo de indução da alergia alimentar. Podemos sugerir, portanto, que o aumento de IgE é necessário para que ocorra o emagrecimento

observado no processo alérgico. Entretanto, apenas níveis elevados desse anticorpo não são suficientes para desencadear a perda de peso, uma vez que os animais C57BL/6 produziram maior quantidade de IgE que os seus controles após sensibilizados e desafiados e, mesmo assim, não emagreceram.

Mesmo na ausência de citocinas Th1, situação na qual foram medidas quantidades elevadas de anticorpos específicos para a ovalbumina em relação aos selvagens, os animais da linhagem C57BL/6 não perderam peso corpóreo. É importante lembrar, entretanto, que os níveis de anticorpos produzidos pelos animais C57BL/6, apesar de elevados, foram aproximadamente 3 vezes menores que aqueles encontrados em camundongos BALB/c selvagens.

Um trabalho desenvolvido no nosso laboratório demonstrou que, após a sensibilização com OVA e desafio com uma dieta balanceada contendo essa proteína, animais BALB/c apresentam perda de peso corpóreo semelhante ao observado no protocolo no qual o antígeno é fornecido na mamadeira contendo SCO. Em contrapartida, animais C57BL/6 continuam não emagrecendo. No entanto, houve alteração em outros parâmetros que não haviam sido analisados como o peso da gordura abdominal e da carcaça antes e após desidratação. Nos camundongos da linhagem C57BL/6, foi observado que o protocolo de indução da alergia alimentar foi capaz de diminuir a quantidade de gordura abdominal tanto nos animais BALB/c quanto nos C57BL/6. A ausência de perda de peso dos animais C57BL/6 pode ser explicada pela maior retenção de líquidos corporais nos tecidos dos animais sensibilizados comparados aos seus controles. Esses achados demonstram que, mesmo sem sinais aparentes, a alergia pode estar desencadeando alterações nestes animais (MOREIRA, 2006).

As alterações associadas à caquexia incluem anorexia, perda de peso corpóreo, perda de massa muscular e lipídica, alterações do metabolismo e anemia (DELANO & MOLDAWER, 2006). Em pacientes portadores de câncer, a caquexia está associada a níveis elevados de TNF-α e IL-6 (CORCOS *et al*., 2003). O aumento destas citocinas leva a um quadro clínico semelhante ao observado no nosso modelo, não apenas pela perda de peso corpóreo, mas também pela aparência debilitada e diminuição do tecido adiposo observadas nos animais alérgicos (DELANO & MOLDAWER, 2006). Com o

intuito de investigar a participação desta citocina no emagrecimento observado nos animais submetidos ao protocolo de alergia, realizamos o teste de ELISA para a dosagem de TNF-α no intestino e baço desses animais. Entretanto, não houve aumento significativo desta citocina após a ingestão do antígeno pelos animais sensibilizados em nenhum dos tempos de desafio investigados.

Em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, tentamos realizar a dosagem de TNF-α no soro desses animais, mas não foi possível a detecção dessa citocina através desse ensaio. Tem sido proposto que as citocinas participam no desenvolvimento e/ou manutenção da caquexia de forma parácrina, autócrina ou intrácrina e, portanto, a atividade dessas substâncias não pode ser detectada na circulação. Alguns estudos demonstram, por exemplo, que as citocinas podem estar envolvidas nos processos de caquexia – anorexia através da produção e ação local destas substâncias em regiões cerebrais específicas. Embora os mecanismos que levam a esse quadro não estejam esclarecidos, existem várias evidências que sugerem o envolvimento de vários fatores neurológicos, metabólicos, imunológicos e endocrinológicos (PLATA-SALAMÁN, 2000).

Uma vez que o mecanismo envolvido na perda de peso corpóreo e de tecido adiposo pelos animais alérgicos ainda não está esclarecido, esse será nosso alvo de investigação no próximo trabalho.

7. CONCLUSÕES

- Há uma correlação direta entre a produção de IgE e IgG1 e o desenvolvimento da aversão à ingestão do antígeno, da perda de peso corpóreo e das alterações morfológicas intestinais observados em camundongos Balb/c.

- Os camundongos que apresentaram perda de peso apresentaram altos níveis se IgE e IgG1 no soro e aumento de infiltrado de eosinófilos. No entanto, essas condições não são suficientes, uma vez que todos os animais C57BL/6 apresentaram aumento dos níveis desses anticorpos, sendo observado, inclusive um aumento do número de eosinófilos nos camundongos IL-12-/-, sem apresentar mudança aparente no peso corpóreo.

- É provável que a aversão à ingestão do antígeno e a alergia alimentar tenham mecanismos imunológicos comuns, uma vez que, as mesmas condições experimentais que levaram o animal à aversão, levaram também à perda de peso e à alterações morfológicas intestinais.

- As citocinas IL-4 e IL-10 desempenha um papel no controle da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado dos camundongos C57BL/6. Quando esses animais eram deficientes em IL-10, o aumento da produção de muco pode ter atuado como um mecanismo compensatório, diminuindo a entrada de antígeno e evitando, assim, a perda de peso e o aumento da produção de IgE decorrentes da indução da alergia alimentar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K. e A. H. Lichtman. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 576 p.

Agnello, D., H. Wang*, et al.* HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. Cytokine, v.18, n.4, May 21, p.231-6. 2002.

Akdis, C. A. e K. Blaser. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. J Allergy Clin Immunol, v.112, n.1, Jul, p.15-22. 2003.

Andrade, M. C. Participação da reação de hipersensibilidade imediata no desencadeamento da aversão à ingestão de clara de ovo em camundongos imunizados com ovalbumina. (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999. 96 p.

Bacharier, L. B. e R. S. Geha. Molecular mechanisms of IgE regulation. J Allergy Clin Immunol, v.105, n.2 Pt 2, Feb, p.S547-58. 2000.

Bae, S. J., Y. Tanaka*, et al.* Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. J Dermatol Sci, v.21, n.1, Sep, p.1-7. 1999.

Basso, A. S., F. A. Costa-Pinto*, et al.* Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. Brain Res, v.1009, n.1-2, May 29, p.181-8. 2004.

Basso, A. S., F. A. Pinto*, et al.* Neural correlates of IgE-mediated food allergy. J Neuroimmunol, v.140, n.1-2, Jul, p.69-77. 2003.

Benoist, C. e D. Mathis. Mast cells in autoimmune disease. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.875-8. 2002.

Bills, C., T. R. Schachtman*, et al.* Effects of metabotropic glutamate receptor 5 on latent inhibition in conditioned taste aversion. Behav Brain Res, v.157, n.1, Feb 10, p.71-8. 2005.

Bingham, C. O., 3rd e K. F. Austen. Mast-cell responses in the development of asthma. J Allergy Clin Immunol, v.105, n.2 Pt 2, Feb, p.S527-34. 2000.

Bischoff, S. C., G. Sellge*, et al.* IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.14, Jul 6, p.8080-5. 1999.

Blanchard, C., S. Durual*, et al.* IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. J Immunol, v.172, n.6, Mar 15, p.3775-83. 2004.

Bogdan, C., Y. Vodovotz*, et al.* Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. J Leukoc Biol, v.55, n.2, Feb, p.227-33. 1994.

Bradley, D. Linking isocyanates and asthma. Anal Chem, v.69, n.11, Jun 1, p.339A. 1997.

Bressler, R. B., J. Lesko*, et al.* Production of IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by naive human mast cells activated by high-affinity IgE receptor ligation. J Allergy Clin Immunol, v.99, n.4, Apr, p.508-14. 1997.

Brusselle, G. G., J. C. Kips*, et al.* Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. Clin Exp Allergy, v.24, n.1, Jan, p.73-80. 1994.

Burd, P. R., W. C. Thompson*, et al.* Activated mast cells produce interleukin 13. J Exp Med, v.181, n.4, Apr 1, p.1373-80. 1995.

Cara, D. C., A. A. Conde*, et al.* Immunological induction of flavor aversion in mice. Braz J Med Biol Res, v.27, n.6, Jun, p.1331-41. 1994.

_____. Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. Scand J Immunol, v.45, n.1, Jan, p.16-20. 1997.

Cara, D. C., D. Negrao-Correa*, et al.* Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. Histol Histopathol, v.15, n.3, Jul, p.899-920. 2000.

Carmo-Pinto, F. Avaliação do crescimento do Tumor de Ehrlich em camundongos com alergia alimentar. (Mestrado). Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000. 83 p.

Choi, I. W., Y. S. Kim*, et al.* Platelet-activating factor-mediated NF-kappaB dependency of a late anaphylactic reaction. J Exp Med, v.198, n.1, Jul 7, p.145-51. 2003.

Cohn, L., C. Herrick*, et al.* IL-4 promotes airway eosinophilia by suppressing IFN-gamma production: defining a novel role for IFN-gamma in the regulation of allergic airway inflammation. J Immunol, v.166, n.4, Feb 15, p.2760-7. 2001.

Cohn, L., R. J. Homer*, et al.* T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. J Exp Med, v.190, n.9, Nov 1, p.1309-18. 1999.

Corcos, M., O. Guilbaud*, et al.* Involvement of cytokines in eating disorders: a critical review of the human literature. Psychoneuroendocrinology, v.28, n.3, Apr, p.229-49. 2003.

Cunningham-Rundles, S., S. Ahrn*, et al.* Development of immunocompetence: role of micronutrients and microorganisms. Nutr Rev, v.60, n.5 Pt 2, May, p.S68-72. 2002.

Delano, M. J. e L. L. Moldawer. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. Nutr Clin Pract, v.21, n.1, Feb, p.68-81. 2006.

Denning, T. L., N. A. Campbell*, et al.* Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. Int Immunol, v.12, n.2, Feb, p.133-9. 2000.

Di Leo, L. Y., V, P. C.; Berin, M. C.; Perdue, M. H. Factors regulating the effect of IL-4 on intestinal epithelial barrier function. Int.Arch.Allergy Immunol, v.129, p.219-227. 2002.

Eastmond, N. C., E. M. Banks*, et al.* Nitric oxide inhibits IgE-mediated degranulation of mast cells and is the principal intermediate in IFN-gamma-induced suppression of exocytosis. J Immunol, v.159, n.3, Aug 1, p.1444-50. 1997.

Eigenmann, P. A. T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells. Pediatr Allergy Immunol, v.13, n.3, Jun, p.162-71. 2002.

Faquim-Mauro, E. L., R. L. Coffman*, et al.* Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. J Immunol, v.163, n.7, Oct 1, p.3572-6. 1999.

Faquim-Mauro, E. L. e M. S. Macedo. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants. Int Immunol, v.12, n.12, Dec, p.1733-40. 2000.

Ferraris, R. P., S. A. Villenas*, et al.* Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. Am J Physiol, v.262, n.6 Pt 1, Jun, p.G1047-59. 1992.

Finkelman, F. D., M. E. Rothenberg*, et al.* Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. J Allergy Clin Immunol, v.115, n.3, Mar, p.449-57; quiz 458. 2005.

Foster, P. S., M. Yang*, et al.* CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma. Lab Invest, v.82, n.4, Apr, p.455-62. 2002.

Frossard, C. P., L. Tropia*, et al.* Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. J Allergy Clin Immunol, v.113, n.5, May, p.958-64. 2004.

Gargiulo, D. L. Avaliação da esquistosomose em camundongos com alergia alimentar. (Mestrado). Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Iniversidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002. 94 p.

Gizzarelli, F., S. Corinti*, et al.* Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. Clin Exp Allergy, v.36, n.2, Feb, p.238-48. 2006.

Hawrylowicz, C. M. e A. O'garra. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol, v.5, n.4, Apr, p.271-83. 2005.

Helm, R. M. e A. W. Burks. Mechanisms of food allergy. Curr Opin Immunol, v.12, n.6, Dec, p.647-53. 2000.

Helm, R. M., R. W. Ermel*, et al.* Nonmurine animal models of food allergy. Environ Health Perspect, v.111, n.2, Feb, p.239-44. 2003.

Helm, R. M., G. T. Furuta*, et al.* A neonatal swine model for peanut allergy. J Allergy Clin Immunol, v.109, n.1, Jan, p.136-42. 2002.

Hogan, S. P., P. S. Foster*, et al.* Experimental analysis of eosinophil-associated gastrointestinal diseases. Curr Opin Allergy Clin Immunol, v.2, n.3, Jun, p.239-48. 2002.

Hogan, S. P., A. Mishra*, et al.* A critical role for eotaxin in experimental oral antigen-induced eosinophilic gastrointestinal allergy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.12, Jun 6, p.6681-6. 2000.

Iwamoto, I., H. Nakajima*, et al.* Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. J Exp Med, v.177, n.2, Feb 1, p.573-6. 1993.

Iwasaki, A. e B. L. Kelsall. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. J Exp Med, v.191, n.8, Apr 17, p.1381-94. 2000.

Janeway, C., P. Travers*, et al.* Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença. São Paulo: Artmed. 2006. 767 p.

Junqueira, L., Carneiro,J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 540 p.

Kelsall, B. L. e W. Strober. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. J Exp Med, v.183, n.1, Jan 1, p.237-47. 1996.

Kemp, S. F. e R. F. Lockey. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. J Allergy Clin Immunol, v.110, n.3, Sep, p.341-8. 2002.

Knippels, L. M., A. H. Penninks*, et al.* Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. Clin Exp Allergy, v.28, n.3, Mar, p.368-75. 1998.

_____. Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. Food Chem Toxicol, v.37, n.8, Aug, p.881-8. 1999.

Kuhn, R., J. Lohler*, et al.* Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell, v.75, n.2, Oct 22, p.263-74. 1993.

Lee, S. Y., C. K. Huang*, et al.* Oral administration of IL-12 suppresses anaphylactic reactions in a murine model of peanut hypersensitivity. Clin Immunol, v.101, n.2, Nov, p.220-8. 2001.

Leung, D. Y. Molecular basis of allergic diseases. Mol Genet Metab, v.63, n.3, Mar, p.157-67. 1998.

Liu, X., T. Beaty*, et al.* Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: The German Multicenter Atopy Study. J Allergy Clin Immunol, v.113, p.489-95. 2004.

Lukacs, N. W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nat Rev Immunol, v.1, n.2, Nov, p.108-16. 2001.

Lukacs, N. W., R. M. Strieter*, et al.* Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. Am J Respir Cell Mol Biol, v.10, n.5, May, p.526-32. 1994.

Matsuse, H., X. Kong*, et al.* Intranasal IL-12 produces discreet pulmonary and systemic effects on allergic inflammation and airway reactivity. Int Immunopharmacol, v.3, n.4, Apr, p.457-68. 2003.

Mayer, L. Mucosal immunity. Pediatrics, v.111, n.6 Pt 3, Jun, p.1595-600. 2003.

Mishra, A., S. P. Hogan*, et al.* Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. J Clin Invest, v.103, n.12, Jun, p.1719-27. 1999.

Moreira, L. F. Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar. (Mestardo). Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 99 p.

Neutra, M. R., N. J. Mantis*, et al.* Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. Nat Immunol, v.2, n.11, Nov, p.1004-9. 2001.

Okunuki, H., R. Teshima*, et al.* Oral sensitization of W/W(v) mice with ovalbumin and possible involvement of the decrease in gammadelta-T cells. Biol Pharm Bull, v.26, n.9, Sep, p.1260-5. 2003.

Osterlund, P. e H. Suomalainen. Low frequency of CD4+, but not CD8+,T cells expressing interferon-c is related to cow's milk allergy in infancy. Pediatr Allergy Immunol, v.13, p.262-68. 2002.

Pilegaard, K. e C. Madsen. An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. Toxicology, v.196, n.3, Mar 15, p.247-57. 2004.

Plata-Salaman, C. R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. Nutrition, v.16, n.10, Oct, p.1009-12. 2000.

Plaut, M. Cytokines and modulation of diseases of immediate hypersensitivity. Ann N Y Acad Sci, v.685, Jun 23, p.512-20. 1993.

Rais, M., J. S. Wild*, et al.* Interleukin-12 inhibits eosinophil differentiation from bone marrow stem cells in an interferon-gamma-dependent manner in a mouse model of asthma. Clin Exp Allergy, v.32, n.4, Apr, p.627-32. 2002.

Rees, G. S., C. K. Gee*, et al.* Rat tumour necrosis factor-alpha: expression in recombinant Pichia pastoris, purification, characterization and development of a novel ELISA. Eur Cytokine Netw, v.10, n.3, Sep, p.383-92. 1999.

Rogers, P. J. e J. E. Blundell. Mechanisms of diet selection: the translation of needs into behaviour. Proc Nutr Soc, v.50, n.1, Mar, p.65-70. 1991.

Romagnani, S. The role of lymphocytes in allergic disease. J Allergy Clin Immunol, v.105, n.3, Mar, p.399-408. 2000.

Rothenberg, M. E. Gastrointestinal eosinophils. Allergy, v.56 Suppl 67, p.21-2. 2001.

Rothenberg, M. E. e S. P. Hogan. The eosinophil. Annu Rev Immunol, v.24, p.147-74. 2006.

Rozin, P. e J. W. Kalat. Specific hungers and poison avoidance as adaptive specializations of learning. Psychol Rev, v.78, n.6, Nov, p.459-86. 1971.

Saldanha, J. C. S. Avaliação da resposta inflamatória à leishmania sp em camundongos com alergia alimentar. (Mestrado). Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002. 85 p.

Saldanha, J. C., D. L. Gargiulo*, et al.* A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. Braz J Med Biol Res, v.37, n.6, Jun, p.809-16. 2004.

Saldanha, J. C. D. S. Estudo dos mecanismos envolvidos na mudança de condição de suceptibilidade à *Leishmania (Leishmania)major* em camundongos com alergia alimentar. (Doutorado). Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 91 p.

Sampson, H. A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. J Allergy Clin Immunol, v.103, n.5 Pt 1, May, p.717-28. 1999.

Schöll, I., E. Untersmayr*, et al.* Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. Am J Clin Nutr, v.81, p.154-60. 2005.

Schwab, D., S. Muller*, et al.* Functional and morphologic characterization of eosinophils in the lower intestinal mucosa of patients with food allergy. Am J Gastroenterol, v.98, n.7, Jul, p.1525-34. 2003.

Scott-Taylor, T. H., J. B. Hourihane*, et al.* Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. Clin Exp Allergy, v.35, n.11, Nov, p.1473-80. 2005.

Seibold, F. Food-induced immune responses as origin of bowel disease? Digestion, v.71, n.4, p.251-60. 2005.

Shi, H. Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. J Leukoc Biol, v.76, n.3, Sep, p.520-7. 2004.

Shimoda, K., J. Van Deursen*, et al.* Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. Nature, v.380, n.6575, Apr 18, p.630-3. 1996.

Sicherer, S. H. Food allergy. Lancet, v.360, n.9334, Aug 31, p.701-10. 2002.

Spencer, D. M., G. M. Veldman*, et al.* Distinct inflammatory mechanisms mediate early versus late colitis in mice. Gastroenterology, v.122, n.1, Jan, p.94-105. 2002.

Stead, R. H., M. Tomioka*, et al.* Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.9, May, p.2975-9. 1987.

Teixeira, L. K., B. P. Fonseca*, et al.* The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.100 Suppl 1, Mar, p.137-44. 2005.

Teuber, S. S., G. Del Val*, et al.* The atopic dog as a model of peanut and tree nut food allergy. J Allergy Clin Immunol, v.110, n.6, Dec, p.921-7. 2002.

Untersmayr, E. e E. Jensen-Jarolim. Mechanisms of type I food allergy. Pharmacol Ther, Jul 27. 2006.

Wasserman, S. I. Mediators of immediate hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol, v.72, n.2, Aug, p.101-19. 1983.

Wu, C., G. Yang*, et al.* Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by Lactococcus lactis on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. Int Immunopharmacol, v.6, n.4, p.610-5. 2006.

Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner*, et al.* Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science, v.296, n.5567, Apr 19, p.490-4. 2002.

Xu, J., D. S. Postma*, et al.* Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. Am J Hum Genet, v.67, n.5, Nov, p.1163-73. 2000.