

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Marcos Felipe Andrade de Oliveira

NOVO MODELO MURINHO DE ALERGIA ALIMENTAR AO AMENDOIM

Belo Horizonte
2021

Marcos Felipe Andrade de Oliveira

NOVO MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR AO AMENDOIM

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria
Coorientadora: Dra. Denise Carmona Cara

Belo Horizonte
2021

- 043 Oliveira, Marcos Felipe Andrade de.
Novo modelo murino de alergia alimentar ao amendoim [manuscrito] / Marcos Felipe Andrade de Oliveira. – 2021.
57 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria. Coorientadora: Dra. Denise Carmona Cara.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Hipersensibilidade Alimentar. 3. Amendoim. 4. Mucosa Intestinal. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Cara, Denise Carmona. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



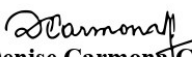
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARCOS FELIPE ANDRADE DE OLIVEIRA. Aos dezenove dias do mês de abril de 2021 às 09:00 horas, reuniu-se, de forma “on line” pela plataforma <http://meet.google.com>, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Novo modelo murino de alergia alimentar ao amendoim", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Denise Carmona Cara – Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

☒ APROVADO
☐ REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de abril de 2021.


 Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)


 Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)


 Dra. Denise Carmona Cara (UFMG)


 Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)


 Profa. Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só pôde ser concretizado porque, de forma direta ou indireta, tive ajuda de muitas pessoas. E aqui vai meu agradecimento a todas elas:

À Dra. Ana Caetano pelo amparo durante a orientação do mestrado, pela oportunidade de desenvolver essa dissertação no seu laboratório, pela sabedoria que me inspira, pelo conhecimento compartilhado, pela disponibilidade em ouvir minhas inúmeras perguntas e, acima de tudo, pela empatia e paciência no momento em que eu mais precisei. Tenho muita gratidão por ela!

À Dra. Denise Carmona pela grande contribuição nas análises da histologia do intestino e do teste de preferência, pela prontidão em acompanhar de perto os passos do projeto como co-orientadora, pelas ricas discussões sobre os achados do estudo e pela sensibilidade em me e acalmar nos momentos de insegurança.

Àqueles que, comigo, colocaram a mão na massa durante os experimentos: Sara, Lucas, Helder, Mariana, Amanda, Rafael, Juliana, Catarina e Leandro. Ao grupo da alergia pelas ideias e discussões durante as reuniões sobre os projetos de alergia alimentar. A todos os demais integrantes do Laboratório de Imunobiologia (LIB) pelo esforço em manter o bom funcionamento do laboratório e, assim, permitir que diversos projetos de pesquisa sejam executados ao mesmo tempo. Sem todos eles esse sonho não teria sido possível.

Aos relacionamentos que ultrapassaram as barreiras profissionais e se tornaram laços de amizade, tornando essa jornada menos árdua e ainda mais prazerosa! Gratidão!

Aos laboratórios das Dras. Leda Vieira, Liza Felicori e Jacqueline Leite, assim como do Dr. Carlos Chavez, pela ajuda em todos os momentos que precisei. Ao Jamil Oliveira pela ajuda na padronização do extrato proteico de amendoim. À Ilda, ao Hermes e à Ilma pelo cuidado com os animais e o biotério do LIB.

À Universidade Federal de Minas Gerais por, através do Instituto de Ciências Biológicas e do Departamento de Bioquímica e Imunologia, abrir as portas para alunos que, como eu, sonham em se tornar grandes cientistas. Da mesma forma, às agências de fomento que disponibilizam verba para realização de projetos como esse.

À Tia Lis, ao Tio Edson e ao Samuel por me acolherem em Belo Horizonte durante os anos do mestrado. Muito obrigado pela paciência e perseverança no momento em que eu estava sem chão, por acreditarem na minha recuperação e por sempre apoiarem esse sonho. À minha avó Edna pelo carinho e pelas constantes orações.

Ao psicólogo José Wneiviton e ao psiquiatra André Teixeira pelo cuidado profissional com minha mente no momento em que pensei ter perdido a sanidade. Obrigado por me enxergarem além do que eu via, por se esforçarem no meu tratamento e, assim, oferecer a mim a oportunidade de me reerguer e seguir em frente, rumo à concretização desse sonho.

À minha família nuclear que eu tanto amo. Mãe, Pai, Jack, Mateus e Pedro são o meu maior tesouro e a maior força motriz que me impulsiona para frente. Obrigado pelo amor, pelo cuidado e pela torcida. Apesar da distância, um laço forte nos une!

Àquele que era, que é e para sempre será, fica aqui minha eterna gratidão!

RESUMO

A prevalência de alergias alimentares tem aumentado nas duas últimas décadas. Dentre os alimentos relacionados a essa doença, o ovo, o leite e o amendoim são os mais frequentes. A alergia ao amendoim diferencia-se das alergias ao ovo e ao leite em relação a gravidade das reações alérgicas e a frequência de dessensibilização ao alimento, mostrando que cada tipo de alergia alimentar possui sua singularidade. Por isso, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunobiologia (LIB) e colaboradores tem desenvolvido modelos padrões de alergia alimentar para o estudo dos diferentes tipos dessa doença. Atualmente encontram-se padronizados os modelos de alergia à ovalbulina, do ovo, e à betalactoglobulina do leite. Assim, para abranger as três alergias alimentares mais frequentes, o presente trabalho teve o objetivo de padronizar um modelo de alergia alimentar ao amendoim semelhante aos demais modelos já estabelecidos no laboratório para facilitar o estudo comparativo entre eles. Primeiramente, testou-se a dose ótima de sensibilização em camundongos BALB/c com um extrato proteico de amendoim (EPA). No dia 0, os camundongos foram imunizados com 8µg, 40µg ou 80µg de EPA adsorvidos em 3mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃). Após 14 dias, os animais receberam as mesmas doses de EPA, na ausência de Al(OH)₃. Após 7 dias, iniciou-se o desafio oral, quando os animais consumiram o extrato de amendoim diluído na mamadeira por 14 dias. Como resultado, as doses de 8µg e 40µg resultaram na maior produção de IgG anti-EPA do que a dose de 80µg. Além disso, a sensibilização com 40µg de EPA levou à perda de peso e alterou o padrão de consumo dos animais alérgicos. Assim, 40µg de EPA foi a dose de sensibilização usada nos demais experimentos. Em seguida, testou-se o novo modelo na linhagem C57BL/6. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados duas vezes com 40µg de EPA adsorvidos em 3mg de Al(OH)₃ e desafiados com extrato de amendoim. Apesar da linhagem C57BL/6 ter sido mais responsiva à sensibilização com EPA, o protocolo funcionou em ambas as linhagens, fato evidenciado pelo aumento na produção de IgE total e IgG anti-EPA, assim como pelas alterações inflamatórias no intestino delgado dos animais. Por último, aplicou-se o teste de preferência alimentar nos camundongos alérgicos de ambas as linhagens para investigação do fenômeno da aversão ao consumo do alérgeno, comum na alergia alimentar a ovalbumina. Os grupos alérgico e controle de ambas as linhagens preferiram beber o extrato de amendoim à água, sem que houvesse diferença na quantidade de extrato de amendoim ingerida entre os grupos alérgico e controle, indicando ausência de aversão no presente modelo. Assim, o presente estudo foi eficaz em padronizar um novo modelo de alergia alimentar ao amendoim que fosse compatível com os demais modelos desenvolvidos pelo laboratório.

Palavras-chaves: alergia alimentar; amendoim; mucosa intestinal; aversão.

ABSTRACT

The prevalence of food allergy has increased in the last two decades. Egg, milk and peanut are the main foods related to this disease. Peanut allergy differs from egg and milk allergy in terms of severity and rates of desensitization, which suggests that each type of food allergy has its own singularities. Thus, the research group from the Immunobiology Laboratory (LIB) and collaborators have developed standardized models of food allergy to study the different types of this disease. There are currently standardized models of food allergy to two antigens: ovalbumin, from eggs, and beta- lactoglobulin from milk. In order to complete the top three food allergies, this study aimed to standardize a model of food allergy to peanut according to the laboratory standards in order to allow comparative studies. Firstly, the optimal dose of sensitization to peanut protein extract (PPE) was tested in BALB/c mice. On day 0, mice were immunized with 8µg, 40µg or 80µg of PPE in 3mg of aluminium hydroxide (Al(OH)₃). After 14 days, the mice received the same doses of PPE without Al(OH)₃. After 7 days, the mice were orally challenged by drinking peanut extract for 14 days. As a result, sensitization with 8µg and 40µg of PPE led to a higher production of anti-PPE IgG than the highest dose (80µg). Furthermore, sensitization with 40µg of PPE led to weight loss and alterations in the eating patterns of allergic mice. Thus, 40µg of PPE was chosen as the dose of sensitization in the following experiments. Next, the new peanut allergy model was tested in C57BL/6 mice. BALB/c and C57BL/6 mice were immunized twice with 40µg of PPE in 3mg of Al(OH)₃ and challenged with peanut extract. Although C57BL/6 mice was more responsive to the immunization with PPE than BALB/c mice, the protocol worked in both strains. This was evidenced by an increase in the production of total IgE and anti-PPE IgG, as well as by inflammatory alterations in the small intestine. Lastly, the allergic mice underwent a preference test in order to investigate the aversion phenomenon. The allergic and control groups of both strains preferred drinking peanut extract over water, with no difference in the amount of peanut extract ingestion between groups. This suggests there is no aversion in the current model of peanut allergy. Thus, this study was able to standardize a new model of peanut allergy according to the standards of our laboratory.

Keywords: food allergy; peanut; intestinal mucosa; aversion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Mecanismos da alergia alimentar	11
1.2 A alergia alimentar ao amendoim	14
1.3 Modelos experimentais de alergia alimentar do Laboratório de Imunobiologia	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 Extrato Proteico de Amendoim.....	21
3.2 Determinação da concentração proteica do Extrato Proteico de Amendoim.....	21
3.3 Extrato de Amendoim	22
3.4 SDS-Page	22
3.5 Animais	23
3.6 Protocolos Experimentais	23
3.6.1 Protocolo 1	23
3.6.2 Protocolo 2.....	24
3.7 Obtenção do Soro.....	25
3.8 Avaliação das imunoglobulinas séricas	25
3.8.1 Determinação dos níveis séricos de IgG anti-EPA	25
3.8.2 Determinação dos níveis séricos de IgE total	26
3.8.3 Western Blot IgG1 anti-EPA	26
3.9 Análise Morfométrica da Mucosa Intestinal.....	27
3.10 Variação de Peso.....	28
3.11 Consumo de Ração e Ingestão do Extrato de Amendoim.....	29
3.12 Teste de Preferência	29
3.13 Análise Estatística.....	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Obtenção do extrato proteico de amendoim	31
4.2 Doses menores do extrato proteico de amendoim são mais eficazes em sensibilizar os camundongos BALB/c	32
4.3 Os camundongos BALB/c sensibilizados com 40µg de EPA apresentaram perda de peso, alteração no consumo de ração e na ingestão do extrato de amendoim durante o desafio oral.....	33
4.4 Os camundongos da linhagem BALB/c produzem menos IgG anti-EPA em resposta à	

sensibilização e ao desafio oral do que os camundongos da linhagem C57BL/6	35
4.5 Os camundongos da linhagem BALB/c não diferem dos camundongos da linhagem C57BL/6 na produção de IgE total após o desafio oral	37
4.6 A mucosa intestinal dos camundongos alérgicos BALB/c e C57BL/6 apresentou alterações condizentes com a alergia alimentar	38
4.7 Camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados não apresentaram perda de peso durante o desafio oral, nem alterações significativas no consumo de ração e na ingestão do extrato de amendoim.....	40
4.8 Os camundongos alérgicos das linhagens BALB/c e C57BL/6 não apresentam aversão ao consumo do extrato de amendoim.	41
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Reações adversas mediante a ingestão de alguns alimentos têm sido relatadas há séculos a.C. Hipócrates (460 – 377 a.C) foi um dos primeiros filósofos a dissertar sobre o assunto, descrevendo a presença de um “humor hostil” em indivíduos que sofriam após a ingestão de queijo, o que poderia, ou não, ter um cunho alérgico. Desde então, relatos como este continuaram a ser documentados ao longo dos séculos, ganhando maior representatividade na literatura médica a partir do século 17, quando a publicação Oriatrike, do médico belga Jean van Helmont, trazia casos de ataque asmático após a ingestão de peixe. No século 18, o médico Robert Willian publicou a primeira classificação taxonômica de doenças da pele (Treatise on Dermatology), as quais incluíam a urticária ligada a alimentos como amêndoas, cogumelos, arenques e frutos do mar. No entanto, esses relatos ainda se encontravam no âmbito observacional, muitas vezes chamando as doenças descritas de “idiossincrasia alimentar”, sem explicações científicas (COHEN; DWORETZKY, 2002).

Os mistérios por trás das reações adversas ligadas a alimentos específicos começaram a ser desvendados com as experimentações do início do século 20. Em 1902, Richet e Portier descreveram a anafilaxia e, cerca de 20 anos depois, Prausnitz e Kustner mostraram que a hipersensibilidade a um alimento específico poderia ser transferida de um indivíduo alérgico para um indivíduo não-alérgico através de um “fator” plasmático. Esse “fator”, primeiramente denominado reagin, só foi descrito como a imunoglobulina E (IgE) em 1967, pelo Dr. Kimishige Ishizaka (COHEN; DWORETZKY, 2002; SAMPSON, 2016). Apesar dos avanços científicos no entendimento das alergias alimentares, a prevalência dessa doença ainda era baixa ao longo do século 20. As atenções estavam voltadas para os crescentes casos de rinite alérgica na primeira metade do século, seguidos pela epidemia de asma que começa a ganhar forma na década de 1960 e atinge seu ápice nos anos 2000 (PLATTS-MILLS, 2015; PRESCOTT; ALLEN, 2011). Nesse cenário, o interesse médico-científico pelas alergias alimentares estava ofuscado pela demanda das alergias respiratórias.

No entanto, por trás do platô das alergias respiratórias na virada do século 21, começa a surgir uma segunda onda de manifestações alérgicas: as alergias alimentares. Nos Estados Unidos, em uma janela de aproximadamente 30 anos, a prevalência de alergias alimentares saiu de menos de 1% para 3,5% a 5% na população geral (SAMPSON, 2016). Concomitantemente, os casos de anafilaxia e hospitalizações decorrentes de alergias alimentares cresceram significativamente em países como a Austrália, o Reino Unido e os Estados Unidos

(CAMPBELL; MEHR, 2015; PRESCOTT; ALLEN, 2011). Esses números continuaram a crescer e, atualmente, acredita-se que a prevalência de alergia alimentar em crianças tenha atingido a marca de 10% em países desenvolvidos (PETERS et al., 2017; SICHERER; SAMPSON, 2018). Além disso, à medida que países em desenvolvimento começaram a adotar um estilo de vida ocidental, as alergias alimentares se apresentam como um problema emergente nessas nações (CAMPBELL; MEHR, 2015).

Em vista da atual importância epidemiológica das alergias alimentares, se em algum momento da história as pesquisas em torno dessa doença foram negligenciadas ao ponto de não serem vistas como “ciência de verdade” (SAMPSON, 2016), hoje o cenário aponta para o lado oposto: a necessidade de investigações científicas para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na patologia das alergias alimentares.

1.1 Mecanismos da alergia alimentar

O corpo humano está em constante exposição a antígenos através das superfícies de mucosa, como o trato gastrointestinal (TGI), respiratório e geniturinário. Dentre eles, o TGI constitui a maior área de contato com o meio externo, com aproximadamente 32m² em indivíduos adultos (HELANDER; FÄNDRICKS, 2014), o que o torna exposto a uma alta carga antigênica. A mucosa intestinal conta com a presença de estruturas linfóides denominadas GALT (do inglês, gut-associated lymphoid tissue) e MLNs (do inglês, mesenteric lymph nodes) que promovem o equilíbrio entre a proteção contra microrganismos patogênicos e a tolerância para bactérias comensais e proteínas da dieta (FARIA et al., 2013; FARIA; WEINER, 2005). Nesse sentido, após a ingestão de alimentos, as proteínas são captadas por células dendríticas CD103⁺ residentes na mucosa do intestino delgado, as quais migram para os MLNs proximais para induzir linfócitos T reguladores (Treg) específicos para as proteínas da dieta, gerando um estado de tolerância (ESTERHÁZY et al., 2019). Quando esse mecanismo é quebrado, a geração de tolerância dá lugar ao estabelecimento da sensibilização, o primeiro passo em direção à alergia alimentar.

Na sensibilização, ao invés de gerar linfócitos Treg, as células dendríticas induzem a diferenciação de linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2) específicas para as proteínas da dieta. Os mecanismos que iniciam esse desvio em direção a uma resposta efetora são pouco entendidos, mas dados sugerem que alterações na função das células dendríticas contribuem

para esse processo. O contato dessas células com alarminas, adjuvantes e alérgenos que se ligam a receptores de lectina do tipo C leva à maior expressão de MHC II, proteínas co-estimuladoras e ligante de OX40 (OX40L), o que habilita as células dendríticas a induzir a diferenciação de linfócitos Th2 (BLÁZQUEZ; BERIN, 2008; CHU et al., 2013; SHREFFLER et al., 2006). Dentre essas moléculas, o OX40L tem papel importante, visto que o tratamento com anticorpo anti-OX40L inibe a indução de células Th2 por células dendríticas *in vitro* e *in vivo* (BLÁZQUEZ; BERIN, 2008; CHU et al., 2013, 2014).

A indução de uma resposta Th2 durante a sensibilização está intimamente ligada à geração de linfócitos B produtores de IgE. Nos linfonodos, um dos principais eventos para a produção dessa imunoglobulina é a sinalização da citocina IL-4, a qual é produzida por linfócitos Th2. Em um modelo experimental de alergia ao amendoim, Chu et al. (2014) sugeriram que os linfócitos Th2 são a principal fonte de IL-4 para a indução das respostas humorais associadas à alergia. Além disso, Kobayashi et al. (2017) mostraram que a transferência de linfócitos Th2 de camundongos alérgicos à ovalbumina (OVA) para camundongos naïve e deficientes em linfócitos T, mas não em linfócitos B, é capaz de levar à produção de IgE anti-OVA. No entanto, um dos principais achados desse estudo foi que linfócitos T auxiliares foliculares (Tfh, do inglês T follicular helper) produtoras de IL-4 são mais eficientes em induzir a produção de IgE anti-OVA do que os linfócitos Th2. Em sinergia com esses resultados, Gowthaman et al. (2019) descreveram uma subpopulação de linfócitos Tfh que, além de IL-4, produzem IL-13 e sustentam a produção de IgE de alta afinidade em modelos de alergia. Sendo assim, ambos os linfócitos Th2 e Tfh contribuem para a produção de IgE durante a sensibilização por alérgenos.

É importante ressaltar que, além de IgE, a sensibilização a alérgenos também leva à produção de IgG1. Os linfócitos B produtores de IgG1 desenvolvem papel indispensável na manutenção dos linfócitos B produtores de IgE. Em uma sequência de estudos com um modelo transgênico de alergia à OVA, o grupo de pesquisa da Dra. Maria Curotto de Lafaille mostrou que, após sofrerem troca de classe de anticorpo e maturação de afinidade, alguns linfócitos B IgG1+ transformam-se em linfócitos B produtores de IgE, um processo chamado de troca de classe sequencial (XIONG et al., 2012). Ou seja, a alta afinidade de anticorpos da classe IgE é herdada da maturação adquirida pelos anticorpos do tipo IgG1. Curiosamente, os poucos linfócitos B IgE+ que surgem sem passar pela troca de classe sequencial produzem anticorpos de baixa afinidade e são incapazes de se diferenciar em plasmócitos ou células de memória (HE et al., 2017), o que reforça a importância dos linfócitos B IgG1+ para as respostas alérgicas

mediadas por IgE. Além disso, apesar de não serem protagonistas, os anticorpos do tipo IgG1 também podem interagir com células da imunidade inata e, assim, contribuir para os processos inflamatórios relacionados à alergia alimentar mediada por IgE (FINKELMAN; KHODOUN; STRAIT, 2016; KHODOUN et al., 2011).

Uma vez que a ativação de respostas Th2 culmina na produção de IgE, esse anticorpo se liga aos receptores FcεRI de alta afinidade expressos na superfície de mastócitos, fechando o ciclo de eventos que levam à sensibilização. Essa interação IgE- FcεRI emite sinais anti-apoptóticos para os mastócitos e induz o deslocamento de novos receptores FcεRI do citoplasma para a superfície celular (ASAI et al., 2001; KUBO et al., 2001), efeitos sinérgicos à ação da IL-4 nessas células (BURTON et al., 2013). Com sinais que aumentam a sobrevivência e a capacidade de interação com a IgE, os mastócitos se encontram habilitados a reagir ao alérgeno para o qual foram sensibilizados, levando à manifestação da alergia alimentar. Mediante a interação do alérgeno com mais de uma molécula de IgE ao mesmo tempo (ligação cruzada), diversas quinases são ativadas, como PLC, ERK, JNK e PKC, culminando no aumento de cálcio intracelular e na translocação de fatores de transcrição para o núcleo, como o NFκB e o NFAT. O resultado dessa sinalização intracelular é a translocação dos grânulos citoplasmáticos para a membrana plasmática (degranulação) e a produção de citocinas (TNF, IL-4, IL-6, etc.) (SIRAGANIAN et al., 2010). Esses grânulos possuem diversos mediadores inflamatórios, como histamina, prostaglandinas e etc, os quais, de maneira geral, aumentam o calibre e a permeabilidade dos vasos, assim como a contração da musculatura lisa local. Essas alterações levam aos variados sintomas da alergia alimentar, que vão desde desconforto abdominal, coceira, tosse e espirro (sintomas leves), até diarreia, vômito, dispneia e taquicardia (sintomas graves) (RENZ et al., 2018).

É importante ressaltar que nem toda proteína alimentar tem potencial alergênico. As tentativas de investigar os aspectos que conferem alergenidade a proteínas alimentares revelaram, no mínimo, três características: alta representatividade no alimento, múltiplos epitopos lineares capazes de ligar a anticorpos do tipo IgE, e resistência à degradação por ação química e enzimática (BANNON, 2004). Além disso, análises *in silico* sugerem que proteínas alergênicas tendem a apresentar baixa homologia com proteínas de helmintos, protozoários, fungos e humanos, o que leva à hipótese de que a individualidade de algumas proteínas alimentares se associa a seu potencial alergênico (SANTIAGO et al., 2012).

Por fim, como exposto previamente, a maioria dos indivíduos tendem a gerar tolerância imunológica a essas proteínas com potencial alergênico. No entanto, aqueles que possuem fatores intrínsecos que conferem predisposição e são expostos a fatores de risco extrínsecos, tendem a desenvolver alergia alimentar (RENZ et al., 2018). Alterações genéticas que perturbam a barreira da pele, por exemplo, favorecem a exposição ao alérgeno nesse local, aumentando a ocorrência de sensibilização cutânea. A qualidade da microbiota que coloniza o recém-nascido também está associada à predisposição ao desenvolvimento de alergias alimentares. No que tange fatores externos, segundo a teoria da higiene, a falta de exposição a microrganismos e infecções na infância leva a modulações no sistema imune que comprometem a sua capacidade de tolerar proteínas da dieta. Além disso, a baixa exposição ao sol, e consequentemente os baixos níveis de vitamina D, está associada à prevalência de alergias alimentares em crianças. Logo, o processo de sensibilização e posterior reação inflamatória à proteínas da dieta provavelmente resulta da soma de fatores de risco internos e externos.

1.2 A alergia alimentar ao amendoim

O amendoim, juntamente com o leite e o ovo, é um dos três alimentos mais relacionados às alergias alimentares. A maioria dos casos de alergia ao amendoim tem início nos primeiros anos de vida e, apesar da doença manifestar-se a partir do contato do alimento com o trato gastrointestinal, há evidências de que a sensibilização ao amendoim possa ocorrer pela pele. Disfunção na barreira epitelial nos primeiros meses de vida está intimamente ligada ao desenvolvimento de alergias alimentares aos dois anos de idade (KELLEHER et al., 2016). Brown et al. (2011) mostraram que mutações no gene da filagrina, proteína chave na estrutura do epitélio, estão associadas à alergia alimentar ao amendoim, na presença ou não de dermatite atópica. No entanto, quando essa inflamação na pele está presente em crianças, a exposição às proteínas do amendoim mascaradas na poeira do ambiente leva a um aumento no risco de desenvolver alergia a esse alimento (BROUGH et al., 2015). Ou seja, um aumento na permeabilidade da pele, ligado ou não a processos inflamatórios, pode predispor à sensibilização ao amendoim pela via cutânea. Por isso, contrário ao que se acreditava, a introdução de amendoim na alimentação de bebês tem mostrado papel protetor no desenvolvimento de alergia alimentar ao amendoim, pois favorece a indução de tolerância oral em detrimento da sensibilização cutânea (DU TOIT et al., 2008, 2015).

Uma vez que a alergia ao amendoim se torna uma realidade, as crianças portadoras dessa doença e seus familiares enfrentam prejuízos na qualidade de vida pela constante preocupação com exposições indesejadas ao alimento; e como forma de lidar com essa insegurança, muitos se equipam com injeções de epinefrina. (AVERY et al., 2003; KING; KNIBB; HOURIHANE, 2009). Isso porque, comparado à alergia ao leite e ao ovo, por exemplo, a alergia ao amendoim tem grande relação com reações anafiláticas. Nos Estados Unidos, em cerca de trinta casos fatais de anafilaxia alimentar entre 1994 e 1999, mais de 60% foram decorrentes da ingestão de amendoim (BOCK; MUOZ-FURLONG; SAMPSON, 2001). Ao comparar as hospitalizações por reações anafiláticas (ligadas ou não a alimentos) entre os anos 1999 e 2009, Ma et al. (2014) relataram que a alergia ao amendoim foi responsável por 4% e 7% dos casos, respectivamente, mostrando um aumento de quase 100% em uma década. Nesse estudo, a alergia ao leite foi responsável por apenas 1% das hospitalizações nos dois anos analisados, enquanto não foram descritos casos em relação à alergia ao ovo. Logo, reações anafiláticas são comuns na alergia ao amendoim, o que demonstra a gravidade desse tipo de alergia alimentar e explica o medo da ingestão indesejável desse alimento por indivíduos alérgicos.

Outra característica intrigante da alergia ao amendoim é a dificuldade de dessensibilizar para esse alimento. Com o intuito de investigar a história natural da doença em crianças australianas, Peters et al. (2015) mostraram que de 103 crianças diagnosticadas com alergia ao amendoim, por desafio oral, no primeiro ano de vida, apenas 21% toleraram a ingestão de amendoim aos 4 anos de idade. Enquanto isso, 76% delas ainda apresentavam reações alérgicas como vômito, angioedema e urticária em resposta ao mesmo estímulo. Em um outro trabalho publicado pelo mesmo grupo de pesquisa, os autores incluíram dados de mais de 5000 crianças que apresentavam, ou não, diagnóstico positivo de alergias alimentares no primeiro ano de vida. Dentro dessa população, a alergia ao ovo era a mais prevalente (9,5%), seguida pela alergia ao amendoim (3,1%). Curiosamente, ao reavaliar essas crianças aos 4 anos de idade, observou-se que a prevalência da alergia ao ovo e ao amendoim reduziram para 1,2% e 1,9%, respectivamente (PETERS et al., 2017). Ou seja, enquanto houve uma redução de 87,3% na prevalência de alergia ao ovo ao longo de três anos, uma redução de apenas 38,7% foi observada na alergia ao amendoim. Além disso, uma alta taxa de dessensibilização para alimentos como o leite e o ovo também foi observada em estudos prospectivos com crianças da Europa e América do Norte (SAVAGE; SICHERER; WOOD, 2016). Sendo assim, é possível perceber que, entre as alergias alimentares mais prevalentes, a alergia ao amendoim possui a maior probabilidade de persistir ao longo da vida.

Um dos aspectos que podem explicar as peculiaridades que circundam a alergia ao amendoim são as características intrínsecas desse alimento. Apesar de ser rico do ponto de vista nutricional, o amendoim tem um alto potencial alergênico. Até o presente, já foram descritas 17 proteínas alergênicas no amendoim, as quais são nomeadas Ara h (do nome científico *Arachis hypogea*), seguido pelos números 1 a 17 (PALLADINO; BREITENEDER, 2018). Dentre elas, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 e Ara h 6 parecem ser as proteínas mais importantes no contexto da alergia ao amendoim, pois são frequentemente reconhecidas pelas imunoglobulinas do tipo IgE do soro de indivíduos alérgicos (KOPPELMAN et al., 2004; KUKKONEN et al., 2015; PALLADINO; BREITENEDER, 2018). No entanto, diversos estudos apontam o Ara h 2 e o Ara h 6 como os alérgenos mais potentes. Em reação alérgica cutânea após exposição a proteínas do amendoim, doses cem vezes menores de Ara h 2 são necessárias para desencadear os mesmos efeitos do Ara h 1 e Ara h 3 (KOPPELMAN et al., 2004). Em ensaios de degranulação de basófilos sensibilizados com IgE de indivíduos alérgicos, a exposição ao extrato proteico de amendoim deficiente em Ara h 2 e Ara h 6 diminui significativamente a ativação dessas células (CHEN et al., 2011; PORTERFIELD et al., 2009). Além disso, em um estudo com indivíduos alérgicos que foram desafiados com amendoim por via oral, todos aqueles que apresentaram reações moderadas à severas possuíam IgE anti-Ara h 2, anti-Ara h 6 ou ambos (KUKKONEN et al., 2015). Esses dados mostram a importância dessas duas proteínas para a gravidade da alergia ao amendoim. Apesar disso, outros alérgenos do amendoim, do Ara h 10 ao Ara h 15, também têm sido relacionados a reações alérgicas graves (PETERSEN et al., 2015; SCHWAGER et al., 2017).

Além de estarem presentes em alta quantidade e diversidade no amendoim, as proteínas alergênicas desse alimento possuem algumas características que favorecem sua imunogenicidade. Os alérgenos Ara h 2 e Ara h 6, por exemplo, não são completamente processados por enzimas gástricas e intestinais. Assim, os fragmentos que restam após o processo digestivo ainda podem interagir com anticorpos do tipo IgE, uma característica comum entre proteínas alergênicas (APOSTOLOVIC et al., 2016; CHIN; VICKERY, 2012). Apesar de não apresentar a mesma resistência à ação de proteases, o Ara h 1 é capaz de interagir com células dendríticas via receptor DC-SIGN e, assim, levá-las a induzir respostas Th2 (SHREFFLER et al., 2006). Além disso, o extrato proteico de amendoim é capaz de aumentar a expressão de MHC II, CD83, CD86, CD40 e OX40L em células dendríticas, o que está intimamente ligado à ativação dessas células (CHU et al., 2013; SHREFFLER et al., 2006). Apesar desses ensaios terem sido feitos *in vitro*, é possível vislumbrar os efeitos adjuvantes das

proteínas do amendoim *in vivo*, contribuindo para a sensibilização a esse alimento. Por último, a porção lipídica do amendoim pode desenvolver papel importante na modulação da resposta imune às proteínas desse alimento, constituindo mais um provável fator intrinsecamente adjuvante do amendoim (PALLADINO et al., 2018; VAN WIJK et al., 2005).

Levando em consideração o risco de reações anafiláticas e a dificuldade de dessensibilização, a alergia ao amendoim parece ser mais grave do que outras alergias alimentares comuns, como ao leite e ao ovo. Essas diferenças podem estar relacionadas às características intrínsecas de cada alimento e seus respectivos alérgenos. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias para estudar as peculiaridades de cada tipo de alergia alimentar.

1.3 Modelos experimentais de alergia alimentar do Laboratório de Imunobiologia

Estudos que visam entender a patologia das alergias alimentares em humanos não são simples. A exposição oral ao alimento alergênico, para que a doença se manifeste e seja estudada, pode gerar reações graves nos voluntários. Quando esses estudos se tornam viáveis, os pesquisadores devem contar com uma equipe médica habilitada a monitorar os voluntários durante e após a exposição ao alérgeno, o que não está facilmente disponível a qualquer grupo de pesquisa. Além disso, é difícil controlar as inúmeras variáveis do estilo de vida humano sobre o objeto da pesquisa. Logo, os estudos sobre alergias alimentares em humanos são arriscados e logisticamente desafiadores.

Nesse sentido, a experimentação em camundongos se tornou uma boa alternativa para esse campo de pesquisa. Inúmeros modelos murinos de alergia alimentar já foram descritos na literatura, para os quais a indução de alergia é dividida em duas etapas: sensibilização (exposição ao alérgeno, geralmente na presença de um adjuvante, para indução de uma resposta imune celular e humoral efetora) e desafio oral (ingestão do alérgeno para a manifestação da doença) (KANAGARATHAM; SALLIS; FIEBIGER, 2018; LIU; NAVARRO; LOPATA, 2016). No processo de elaboração desses modelos, deve-se levar em consideração diversos parâmetros que incluem, mas não se limitam a, linhagem e sexo dos camundongos, via de sensibilização, adjuvante (quando necessário) e alérgeno. Dentro de cada uma dessas categorias, existe uma gama de opções a serem escolhidas. Como resultado, os modelos murinos de alergia alimentar presentes na literatura são muito heterogêneos. Isso é bom, pois

permite aos pesquisadores desenvolverem o modelo experimental que mais se adeque à pergunta da pesquisa. No entanto, quando a intenção é comparar diferentes tipos de alergia alimentar disponíveis na literatura, essa grande variação se torna um problema. Logo, com o objetivo de estudar as diferenças entre os tipos de alergias alimentares, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunobiologia (LIB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), juntamente com seus colaboradores, tem desenvolvido modelos experimentais de alergia alimentar padronizados, que variam apenas em relação ao alérgeno.

A padronização desses modelos se constitui da seguinte maneira: utiliza-se o BALB/c como a linhagem de camundongos; a via subcutânea ou intraperitoneal como áreas de exposição inicial ao antígeno; e o hidróxido de alumínio como adjuvante para indução de uma resposta efetora ao invés de tolerante ao antígeno de interesse. Com esses parâmetros fixos, a única variável se torna o alérgeno, o que permite o estudo de diferenças e semelhanças entre alergias alimentares a alérgenos distintos. Sendo assim, no dia 0, os camundongos são imunizados, por via subcutânea ou intraperitoneal, com o alérgeno de interesse na presença de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$). No dia 14, os camundongos são inoculados com o alérgeno na ausência (booster) ou não (segunda imunização) do $\text{Al}(\text{OH})_3$, o que finaliza a etapa de sensibilização. Após uma semana, no dia 21, inicia-se a etapa do desafio oral, onde oferta-se aos camundongos, diariamente, mamadeiras contendo o alérgeno diluído em água. O tempo mínimo de desafio oral é de 7 dias, mas pode ser estendido para 14 à 21 dias, dependendo do objetivo do experimento.

Até o presente momento, existem dois modelos de alergia alimentar padronizados com a estrutura apresentada anteriormente: alergia à ovalbumina (OVA), proteína constituinte da clara do ovo, e alergia à betalactoglobulina (BLG), proteína constituinte do soro do leite de vaca. Na alergia alimentar à OVA, após o desafio oral, os camundongos alérgicos apresentam altos níveis séricos de IgE e IgG1 anti-OVA, além de diversas alterações na mucosa intestinal: aumento na infiltração de eosinófilos e mastócitos, alta produção de muco, e edema na região proximal do intestino delgado (SALDANHA et al., 2004). Outra característica desse modelo é a perda de peso durante o desafio oral. Nesse período, o tecido adiposo dos animais alérgicos apresenta redução no estoque de lipídeos, aumento no número de mastócitos e macrófagos, assim como alta produção de citocinas pró-inflamatórias (DOURADO et al., 2011).

Além dessas alterações, os camundongos alérgicos à OVA evitam o consumo do antígeno para o qual foram sensibilizados, um fenômeno denominado aversão ao sabor (do inglês, flavour aversion). Mediante a opção de ingerir água ou solução de clara de ovo (20%)

adocicada com sacarina (0,1%), os camundongos sensíveis à OVA preferem ingerir água, evitando o contato com a clara de ovo, ainda que na presença de sacarina. Por outro lado, os camundongos não sensibilizados preferem ingerir a solução adocicada, ainda que contenha clara de ovo, ao invés da água (CARA; CONDE; VAZ, 1994). Logo após descreverem esse fenômeno, os autores desse estudo mostraram que a aversão pode ser transferida para camundongos naïve através do soro ou dos esplenócitos de animais sensibilizados (CARA; CONDE; VAZ, 1997). Em estudos subsequentes, foi observado que a aversão nesse modelo experimental é dependente da ação de duas moléculas chaves e interdependentes na alergia alimentar: IgE e IL-4 (BASSO et al., 2003; DOURADO et al., 2010).

Na alergia alimentar à BLG, após o desafio oral, os camundongos alérgicos também apresentam altos níveis séricos de IgE-anti BLG, além de alterações na mucosa intestinal, evidenciadas pelo aumento na secreção de SIgA (IgA secretória) e no número de eosinófilos, assim como uma diminuição no tamanho dos vilos em detrimento do aumento na profundidade das criptas (GOMES-SANTOS et al., 2015). Semelhante à alergia à OVA, os animais alérgicos à BLG também apresentam perda de peso durante o desafio oral, o que é explicado por uma redução na porcentagem de gordura corporal. No entanto, os camundongos sensibilizados à BLG apresentam apenas uma aversão parcial à solução de whey protein (20%), o que parece estar relacionado a um efeito recompensatório (medido pela ativação de áreas cerebrais ligadas ao sistema de recompensa) desencadeado pelo consumo da proteína (SANTOS, 2018). A partir disso, é possível perceber que, apesar de semelhantes, cada tipo de alergia alimentar possui suas peculiaridades.

Com isso, os modelos experimentais de alergia alimentar desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LIB em associação com seus colaboradores são eficientes em gerar respostas imunológicas coerentes com processos alérgicos. Portanto, são bons modelos para explorar os mecanismos da alergia alimentar, incluindo fenômenos pouco estudados como a aversão. Uma vez que os modelos de alergia a componentes do ovo e do leite já estão padronizados, o próximo passo será padronizar um modelo experimental de alergia ao amendoim, com a mesma estrutura, para abranger os três tipos de alergia alimentar de maior importância epidemiológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Padronizar um novo modelo murino de alergia alimentar ao amendoim comparável aos outros modelos de alergia alimentar desenvolvidos pelo LIB e colaboradores.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar o extrato proteico de amendoim (EPA);
- Definir a dose ótima de proteínas do EPA para sensibilização dos camundongos;
- Testar o novo modelo de alergia alimentar ao amendoim em duas linhagens de camundongo: BALB/c e C57BL/6;
- Avaliar a resposta humoral dos animais mediante a sensibilização e o desafio oral através dos níveis de IgE total e IgG anti-EPA;
- Fazer a análise morfométrica da mucosa intestinal após o desafio oral;
- Avaliar a ingestão do extrato de amendoim e o consumo de ração dos camundongos durante o desafio oral;
- Avaliar o possível comportamento aversivo dos camundongos alérgicos ao extrato de amendoim através do teste de preferência.

3 METODOLOGIA

3.1 Extrato Proteico de Amendoim

O extrato proteico de amendoim (EPA) foi preparado conforme descrito por Walczyk et al. (2017), com algumas adaptações. O amendoim branco (marca comercial Yoki, com o selo Pró-Amendoim da Associação Brasileira da Indústria de Chocolates Amendoim e Balas) foi descascado e triturado até formar-se uma farinha. Numa capela de exaustão, o amendoim foi tratado com hexano (1:3) três vezes para retirada da porção lipídica. Em cada tratamento, o hexano era misturado ao amendoim e desprezado logo que o amendoim precipitasse. Após o terceiro tratamento, o amendoim ficou na capela de exaustão durante a noite para que todo o hexano evaporasse.

Após essa etapa, o amendoim foi diluído em Tampão Tris 20mM pH 8,5 (1:30). Essa solução foi homogeneizada no agitador magnético por 30 minutos para extração das proteínas do amendoim. Em seguida, a solução foi filtrada em uma peneira, dividida em alíquotas de 10ml e centrifugada a 100.000g, 4°C, por 1 hora. Ao final da centrifugação, o que restou de lipídeo ficou no sobrenadante, as partículas não dissolvidas descenderam para o fundo do tubo e o extrato proteico permaneceu no infranadante, com aspecto translúcido. O extrato proteico foi cuidadosamente retirado, dividido em alíquotas colocadas em tubos Eppendorf de 500ul, e estocados a -80°C.

3.2 Determinação da concentração proteica do Extrato Proteico de Amendoim

A concentração proteica do EPA foi determinada através do Método de Lowry. Primeiramente, foi feita uma diluição seriada de albumina (1mg/ml) em uma placa de 96 poços para montagem da curva padrão. Em seguida, adicionou-se à placa o EPA em duas diluições (1:10 e 1:20, volume final de 30µl). A todos os poços foram adicionados o Reagente A (25µl) e o Reagente B (200µl) do kit para dosagem de proteína da BIORAD. Após 30 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a placa foi lida em um comprimento de onda de 655nm. A partir dos valores de absorbância da curva padrão e de suas respectivas concentrações, foi criado um gráfico de dispersão com linha de tendência no Microsoft Excel.

Com este gráfico, foi possível determinar a equação da curva padrão e, conseqüentemente, a concentração proteica do EPA a partir da absorbância das duas diluições. A média da concentração proteica equivalente às duas diluições correspondeu à quantidade de proteína em mg/ml.

3.3 Extrato de Amendoim

Para a preparação da solução a ser utilizada na etapa de desafio oral prevista no protocolo experimental de alergia alimentar, o amendoim foi triturado e diluído em água (pH 8,5) na mesma proporção que o EPA (1:30), sem passar pelo processo de retirada da porção lipídica. O extrato foi homogeneizado em agitador magnético por 30 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada em uma peneira, obtendo-se assim o extrato de amendoim que foi ofertado em mamadeiras de 60ml para os grupos experimentais durante o desafio oral, como descrito na Seção 3.6.

3.4 SDS-Page

O gel de eletroforese foi feito para análise das proteínas obtidas no preparo do EPA e do extrato de amendoim feito em duas condições: em água sem controle do pH e em água com pH 8,5. 10µl de cada amostra foram diluídos em 10µl de azul de bromofenol 0,2% na presença de β-mercaptoetanol (em condição de redução). As amostras foram fervidas por cinco minutos e, em seguida, 2µl de cada amostra (aproximadamente 10µg de proteína) foram corridos em gel de acrilamida 15% a 150V por 2 horas. Juntamente com a amostra, correu-se também o padrão com proteínas de peso molecular conhecido (10kDa a 250kDa). O gel contendo as proteínas separadas foi corado com azul de Coomassie para ser fotografado.

Após determinado o peso molecular das proteínas do EPA e dos extratos de amendoim, os alérgenos presentes nas amostras foram identificados com base no peso molecular dessas proteínas previamente descrito por Walczyk et al. (2013).

3.5 Animais

No presente estudo, foram utilizados camundongos machos das linhagens BALB/c e C57BL/6 provenientes do Biotério do Laboratório de Imunobiologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas abertas e receberam água e dieta comercial ad libitum, salvo o período do desafio oral, quando os animais ingeriram o extrato de amendoim ao invés da água. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - protocolo 339/2019.

3.6 Protocolos Experimentais

3.6.1 Protocolo 1

Este protocolo teve como objetivo determinar a dose de sensibilização dos animais. Sendo assim, 15 machos BALB/c foram divididos em 3 grupos experimentais: Alérgico 8µg (n=5), Alérgico 40µg (n=5) e Alérgico 80µg (n=5). No dia 0, os animais foram imunizados por via subcutânea com 8µg, 40µg ou 80µg de proteínas do EPA, juntamente com 3mg Al(OH)₃ diluído em salina (volume final de 200µl). No dia 14, os animais foram inoculados por via subcutânea com a mesma dose de proteínas do EPA em salina (volume final de 200µl), na ausência de Al(OH)₃ (booster). No dia 21, iniciou-se o desafio oral, quando os animais receberam o extrato de amendoim ao invés da água. O desafio oral durou 14 dias e, portanto, no dia 35, os animais foram anestesiados com 100µl de Ketamina e Xilazina diluídos salina (1:1:2) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical.

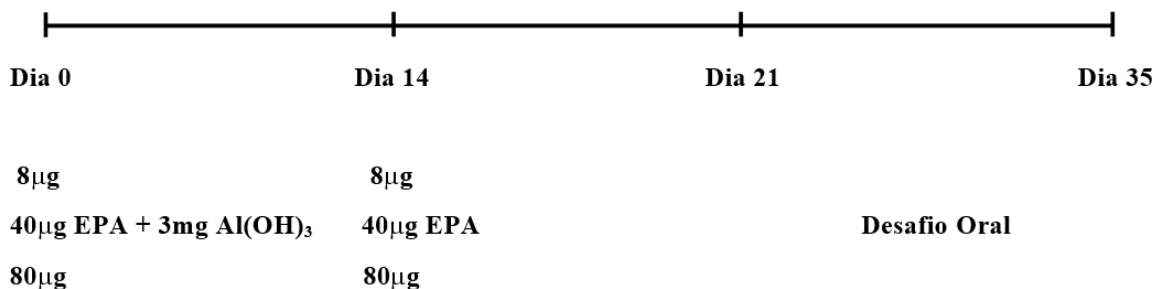


Figura 1. Protocolo experimental 1. Desenho do primeiro protocolo experimental que teve como objetivo determinar a dose ótima de sensibilização dos camundongos, como parte do processo de padronização do novo modelo murino de alergia alimentar ao amendoim.

3.6.2 Protocolo 2

Este protocolo teve como objetivo otimizar a sensibilização dos animais e testar o novo modelo de alergia alimentar ao amendoim em outra linhagem de camundongos. Nesse sentido, 11 camundongos machos BALB/c e 9 camundongos machos C57BL/6 foram divididos em 4 grupos experimentais: Controle BALB/c (n=5), Alérgico BALB/c (n=6), Controle C57BL/6 (n=4) e Alérgico C57BL/6 (n=5). No dia 0, os animais dos grupos alérgicos foram imunizados por via subcutânea com 40µg de proteínas do EPA, juntamente com 3mg de Al(OH)₃ diluído em salina (volume final de 200µl). No dia 14, os animais dos grupos alérgicos foram inoculados por via subcutânea com 40µg de proteínas do EPA, ainda na presença de 3mg de Al(OH)₃ para otimizar a sensibilização. No dia 21, iniciou-se o desafio oral, quando os grupos Controle e Alérgico de ambas as linhagens passaram a receber o extrato de amendoim ao invés da água. O desafio oral durou 14 dias e, portanto, no dia 35, os animais foram anestesiados com 100µl de Ketamina e Xilazina diluídos salina (1:1:2) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical.

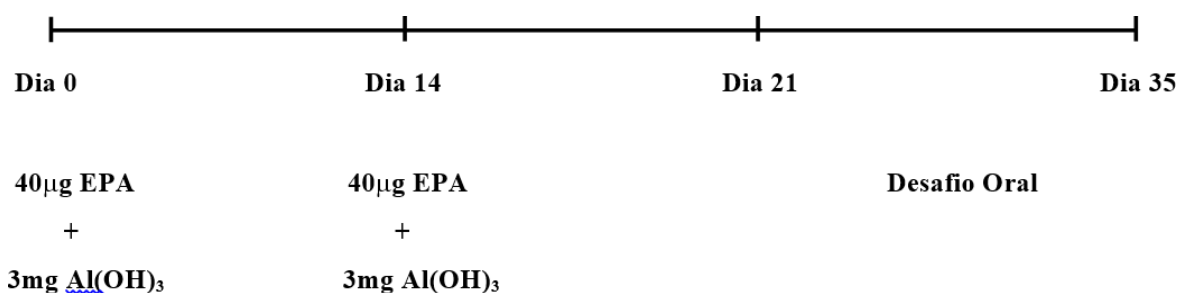


Figura 2. Protocolo experimental 2. Desenho do segundo protocolo experimental que teve como objetivo otimizar a sensibilização dos camundongos e testar o novo modelo de alergia alimentar ao amendoim em duas linhagens de camundongos: BALB/c e C57BL/6.

3.7 Obtenção do Soro

No dia 21 dos protocolos experimentais 1 e 2, o sangue dos animais foi coletado através de um pequeno furo na região submandibular com o auxílio de uma lanceta estéril de 4mm, conforme descrito por Golde et al. (2005). No dia 35 de ambos os protocolos experimentais, os animais foram anestesiados (como descrito na Seção 3.6) e tiveram o sangue coletado através de uma incisão cardíaca com o auxílio de uma seringa de 1ml. Em ambas as coletas, o sangue foi colocado em tubos Eppendorf de 1,5ml e centrifugado a 10.000xg, temperatura ambiente, por 10 minutos para separação do soro. Após coletado, o soro foi estocado a -20°C.

3.8 Avaliação das imunoglobulinas séricas

3.8.1 Determinação dos níveis séricos de IgG anti-EPA

Os níveis séricos de IgG anti-EPA foram mensurados nos dias 21 e 35 dos protocolos experimentais pelo método ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). Placas de 96 poços de poliestireno (Sarstedt) foram sensibilizadas com 2µg de proteínas do EPA/poço, diluídas em tampão carbonato pH9,6 (100µl/poço). As placas foram incubadas em câmara fria a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina-tween 0,05% e, em seguida, bloqueadas com 200µl/poço de PBS Caseína 0,25% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com salina-tween 0,05%, a primeira fileira das placas recebeu as amostras de soro dos camundongos diluídas em PBS Caseína 0,25% (1:100) e, em seguida, foi feita uma diluição seriada (1:2) das amostras para o restante das fileiras da placa. Após incubação por 1 hora à 37°C, as placas foram lavadas com salina-tween 0,05% e adicionadas com 100µl/poço de anticorpo anti-IgG HRP (CAT A9044) diluído em PBS Caseína 0,25% (1:3000). As placas foram, novamente, incubadas por 1 hora à 37°C e, em seguida, lavadas com salina tween 0,05%. Para a revelação do ensaio, foi adicionado às placas ABTS diluído em tampão citrato pH 5,0 (1:2) na presença de peróxido de hidrogênio (1µl de H₂O₂ 30% para cada 1ml de tampão citrato pH 5,0). Após 20-30 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com SDS 1% (20µl/poço). Em seguida, as placas

foram lidas em leitor de ELISA (Bio-RadiMark™ Microplate Reader) com o filtro de 415nm para determinação da absorbância das amostras.

3.8.2 Determinação dos níveis séricos de IgE total

Os níveis séricos de IgE total foram mensurados no dia 35 do protocolo experimental 2 pelo método ELISA. Uma placa de 96 poços de poliestireno (NUNC) foi sensibilizada com 50µl/poço de anticorpo purificado anti-IgE diluído em tampão carbonato pH9,6 (1:500). A placa foi incubada em câmara fria a 4°C durante a noite. No dia seguinte, a placa foi lavada com salina-tween 0,05% e, em seguida, bloqueada com 200µl/poço de PBS Caseína 0,25% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com salina-tween 0,05%, 50µl de soro de cada animal foi colocado na placa, a qual foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada com salina tween 0,05% e adicionada com 50µl/poço de anticorpo anti-IgE biotinilado (CAT 1130-08) diluído em PBS Caseína 0,25% (1:100). Após incubação à temperatura ambiente por 1 hora, a placa foi lavada com salina-tween 0,05% e adicionada com 50µl/poço de estreptavidina ligada à peroxidase (CAT 7100-05) diluída em PBS Caseína 0,25% (1:5000). Após 50-60 minutos de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada com salina-tween 0,05%. Para a revelação do ensaio, foi adicionado à placa ABTS diluído em tampão citrato pH 5,0 (1:2) na presença de peróxido de hidrogênio (1µl de H₂O₂ 30% para cada 1ml de tampão citrato pH 5,0). Após 20-30 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com SDS 1% (20µl/poço). Em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA (Bio-RadiMark™ Microplate Reader) com o filtro de 415nm para determinação da absorbância das amostras.

3.8.3 Western Blot IgG1 anti-EPA

Neste ensaio, 4 colunas de proteínas do EPA foram aplicadas para corrida em gel de acrilamida como descrito anteriormente (Seção 3.4) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Esse processo foi realizado em cuba transparente contendo tampão de transferência, carregado overnight com 24V e uma hora antes da finalização do processo com

48V. Para certificar a eficácia da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com reagente de Panceau para visualização das bandas de proteína.

A membrana foi bloqueada com PBS-Tween 0,3% por 1 hora no agitador. Em seguida, ela foi lavada com PBS-Tween 0,05% por 3 vezes (em cada uma delas, a membrana ficou 5 minutos no agitador). As quatro bandas de proteínas foram separadas e colocadas em tubos Falcon de 15ml contendo o pool de soro dos animais de cada grupo experimental do protocolo 2 (diluído 16 vezes em PBS-Tween 0,3%). As membranas foram incubadas com os soros por 1 hora no agitador. Em seguida, elas foram lavadas 3 vezes e incubadas por 1 hora com anticorpo anti-IgG HRP (CAT A9044) diluído em PBS-Tween 0,3% (1:3000). Após lavagem das membranas com PBS 0,05% por 3 vezes, a reação foi revelada com Luminol e observada em um transiluminador.

3.9 Análise Morfométrica da Mucosa Intestinal

No dia 35 do protocolo 2, os animais foram eutanasiados e a porção proximal do intestino (duodeno e jejuno proximal) foi coletada para análise histológica. Os intestinos foram esticados verticalmente e cortados de forma longitudinal. Em seguida, eles foram enrolados da base até o topo e colocados em cassetes, os quais foram embebidos em formaldeído 10% por cerca de 96 horas para fixação dos tecidos. As amostras foram encaminhadas para o Celulavet - Centro de Diagnóstico Veterinário para confecção das lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE). Uma vez confeccionadas, as lâminas foram escaneadas pelo Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) da UFMG para, então, serem analisadas com o software CaseViewer 2.4. Três campos no aumento de 20x foram analisados para determinar a média dos parâmetros a seguir: altura dos vilos e profundidade das criptas (Figura 3A, colchetes vermelho e verde, respectivamente), número de células caliciformes (Figura 3A, seta preta) e número de eosinófilos (Figura 3B, seta branca) na mucosa intestinal, e número de linfócitos intraepiteliais a cada cem enterócitos (Figura 3C, seta amarela).

Por último, através do programa ImageJ 1.53a, foi realizada a análise morfométrica das células de Paneth. Primeiramente, determinou-se a área de cada cripta presente nos três campos avaliados por animal. Em cada cripta, determinou-se a área ocupada pelas células de Paneth. Em seguida, dividiu-se o valor da área das células de Paneth pelo valor da área da cripta que as

abrigavam (Figura 3D). Esse valor foi transformado em porcentagem e, para cada animal, fez-se a média da porcentagem da área das criptas ocupada pelas células de Paneth.

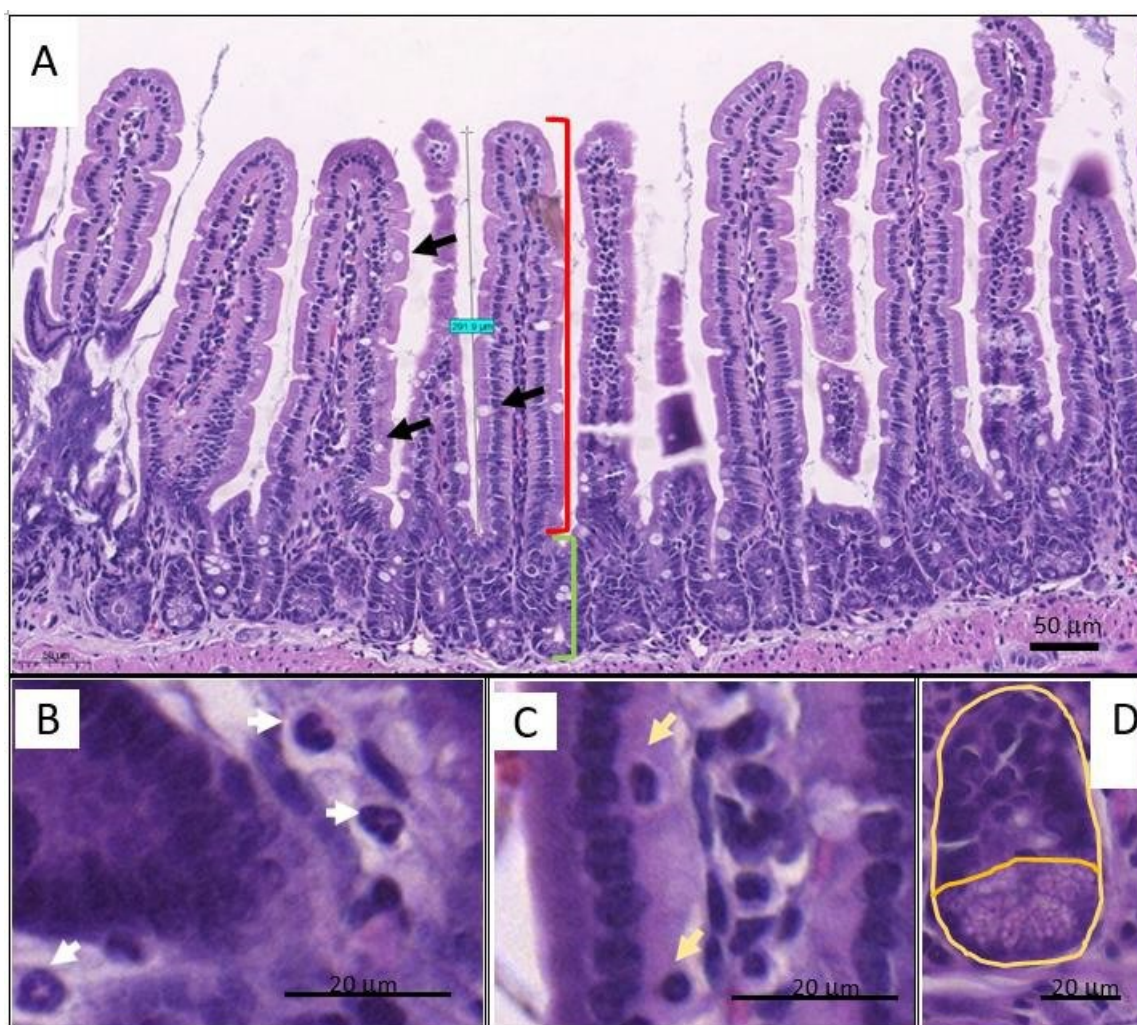


Figura 3. Ilustração dos parâmetros investigados na análise morfométrica da mucosa intestinal. (A) Altura dos vilos (chave vermelha), profundidade das criptas (chave verde) e células caliciformes (seta preta). (B) Eosinófilos (seta branca). (C) Linfócitos intraepiteliais (seta amarela). (D) Área das criptas ocupada pelas células de Paneth.

3.10 Variação de Peso

O peso dos animais foi monitorado em intervalos de dois dias (protocolo 1) ou diariamente (protocolo 2) durante o desafio oral. A variação do peso dos camundongos ao longo desses dias foi determinada a partir da subtração do peso atual (de cada dia do desafio oral) pelo peso inicial (equivalente ao peso do dia 21).

3.11 Consumo de Ração e Ingestão do Extrato de Amendoim

O consumo de ração e a ingestão do extrato de amendoim foram monitorados em intervalos de dois dias (protocolo 1) ou diariamente (protocolo 2) durante o desafio oral. A quantidade de ração consumida foi determinada pela subtração do peso ofertado pelo peso remanescente após um ou dois dias. Da mesma maneira, a quantidade de extrato de amendoim ingerido foi determinada pela subtração do volume ofertado pelo volume remanescente após um ou dois dias. O valor obtido a partir dessas subtrações foi dividido pelo número de camundongos em cada gaiola para determinar a média do consumo de ração e extrato de amendoim por animal.

3.12 Teste de Preferência

O teste de preferência foi executado para investigar se os animais sensibilizados ao amendoim apresentam aversão ao consumo da solução contendo o antígeno, como visto na alergia à OVA e à BLG. Para isso, 16 camundongos machos (8 BALB/c e 8 C57BL/6), entre 8 e 10 semanas de idade, foram divididos em 4 grupos: BALB/c Controle, BALB/c Alérgico, C57BL/6 Controle e C57BL/6 Alérgico. Os animais do grupo alérgico foram imunizados duas vezes (dias 0 e 14) com 40µg de proteínas do EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃, como descrito anteriormente (Seção 3.6.2). Durante esse período, os animais do grupo controle não receberam tratamento algum. No dia 20, 4 animais de cada grupo foram divididos em gaiolas individuais, contendo duas mamadeiras preenchidas com água. No dia seguinte, uma das mamadeiras contendo água foi substituída por uma mamadeira contendo o extrato de amendoim, de forma que os camundongos poderiam escolher, entre as duas opções, o que beber. A ingestão de água e extrato de amendoim foi determinada em intervalos de 24h, 48h e 72h. O peso de todas as mamadeiras era aferido antes da oferta e após 24 horas de consumo. A quantidade de água e extrato de amendoim ingeridos por cada camundongo foi determinada pela subtração desses dois valores, e expressa em mg/g de peso corporal. A cada 24h, o conteúdo das mamadeiras era renovado e a posição da água e do extrato de amendoim era invertida para evitar preferência pela posição das mamadeiras.

3.13 Análise Estatística

O programa GraphPad Prism® Versão 8.1.1 foi utilizado para realização das análises estatísticas e confecção dos gráficos. De acordo com o teste de Shapiro-Wilk, os dados apresentaram distribuição normal. Portanto, aplicou-se o teste One Way ANOVA para identificar diferença estatística entre os grupos experimentais para cada parâmetro analisado. Quando havia diferença estatística, essa análise era seguida pelo Teste de Tukey para identificar quais grupos diferenciaram entre si. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com valor de $p < 0,05$. Os dados estão representados em média $\pm$ desvio padrão.

Para a análise estatística do Teste de Preferência, utilizou-se o Teste t não pareado para comparar a média da ingestão de extrato de amendoim entre os grupos controle e alérgico de cada linhagem. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com valor de $p < 0,05$. Os dados estão representados em média $\pm$ desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção do extrato proteico de amendoim

O processo de extração das proteínas do amendoim em tampão Tris 20mM (pH 8,5) gerou um extrato proteico de concentração equivalente a 10mg/ml. Ao realizar a corrida do EPA em gel de acrilamida (Figura 4), observou-se a presença de proteínas que variam entre 100 kDa e 15 kDa. De acordo com estudos que descreveram o perfil proteico de extratos de amendoim (WALCZYK et al., 2013; WALCZYK et al., 2017), foi possível obter, com base no peso molecular, pelo menos três das principais proteínas alergênicas desse alimento: Arah1 (bandas por volta de 100kDa e entre 50 kDa e 75 kDa), Arah2 (banda por volta de 15 kDa); e Arah3 (bandas entre 20 kDa e 37 kDa, banda entre 50 kDa e 75 kDa) (Figura 4). A provável ocorrência de Ara h 1 e Ara h 3 em bandas de diferente peso molecular deve-se a alterações pós-translacionais ou a dissociação de subunidades das proteínas em sua estrutura quaternária (Walczyk et al., 2013). Sendo assim, esse extrato foi utilizado nos protocolos experimentais de alergia alimentar ao amendoim para sensibilizar os camundongos.

Pelo fato do tampão Tris ser inadequado para consumo pelos animais, decidiu-se fazer um extrato de amendoim em água potável para que os camundongos pudessem ingeri-lo durante o protocolo experimental. Como descrito por Walczyk et al. (2017), diferentes soluções de extração podem alterar o perfil proteico do extrato de amendoim. Logo, analisou-se o perfil proteico do extrato de amendoim em água potável, mediante ajuste, ou não, do pH da água (pH 8,5), para compará-los ao EPA em tampão Tris. Nesse sentido, foi possível observar grande similaridade no perfil proteico entre as diferentes condições de extração das proteínas do amendoim. Como as bandas das proteínas extraídas em água (pH 8,5) apresentaram espessura mais próxima àsquelas observadas mediante extração em tampão Tris, decidiu-se usar a água potável com pH 8,5 para confecção do extrato de amendoim ofertado aos camundongos.

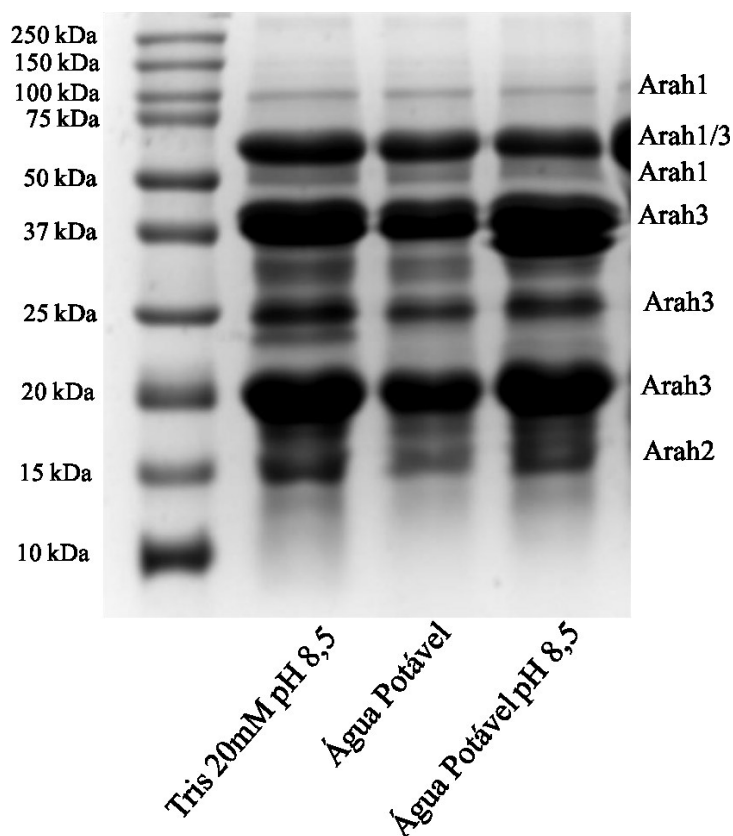


Figura 4. Gel do EPA e dos extratos de amendoim com ou sem o ajuste do pH. Volumes iguais das três amostras foram aplicadas para corrida, em condição de redução, em gel de acrilamida a 150V por 2 horas. As proteínas alergênicas foram identificadas com base no peso molecular descrito por Walczyk et al. (2013).

4.2 Doses menores do extrato proteico de amendoim são mais eficazes em sensibilizar os camundongos BALB/c

Os camundongos foram sensibilizados pela via subcutânea mediante uma imunização, no dia 0, com diferentes doses do EPA (8 μ g, 40 μ g e 80 μ g) na presença de 3mg de Al(OH)₃, seguido por uma segunda exposição, no dia 14, às mesmas doses de EPA sem o adjuvante (booster). A partir do dia 21, iniciou-se o desafio oral, onde os camundongos ingeriram um extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). Antes e após o desafio oral, os níveis séricos de IgG anti-EPA foram mensurados. Como resultado, observou-se que a sensibilização com as doses de 8 μ g e 40 μ g levaram a uma maior produção de IgG-anti EPA do que a dose de 80 μ g (Figura 5). Essa diferença se manteve ao final dos 14 dias de desafio oral. Em nenhum dos pontos de análise (dia 21 ou 35), foi observada diferença estatística entre os grupos sensibilizados com 8 μ g e 40 μ g de EPA.

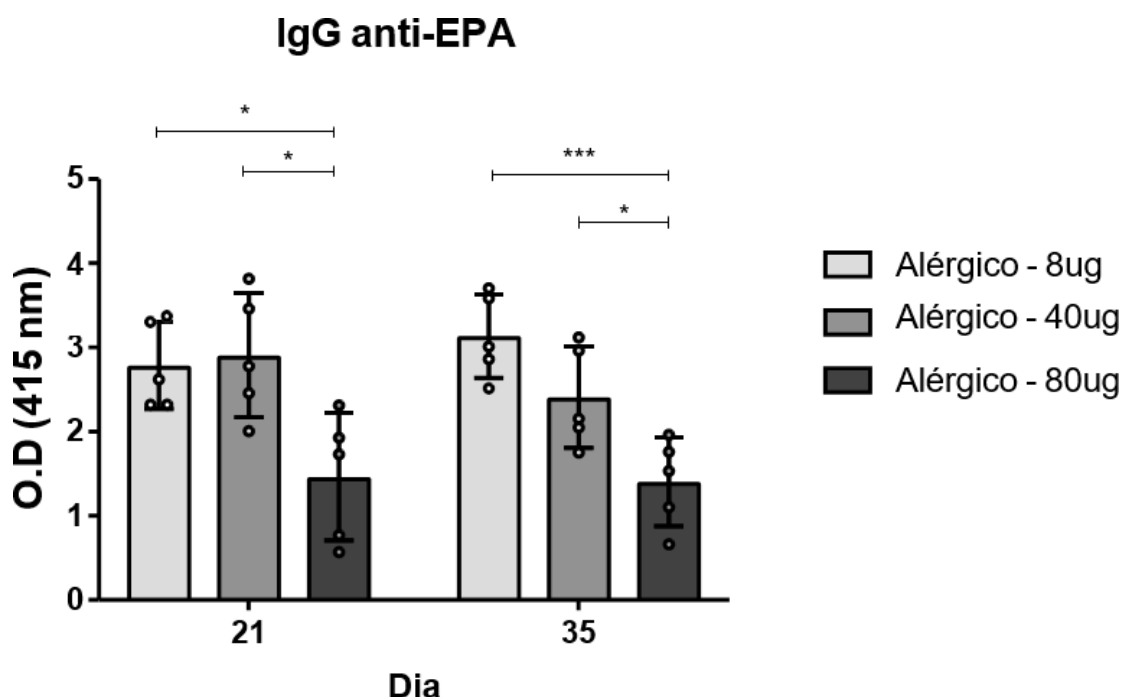


Figura 5. Níveis séricos de IgG anti-EPA antes e após o desafio oral. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com três doses diferentes de EPA (8 μ g, 40 μ g e 80 μ g) na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais foram inoculados com as mesmas doses de EPA na ausência de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). O sangue dos animais foi coletado antes e após o desafio oral para mensuração dos níveis séricos de IgG anti-EPA por ELISA. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.3 Os camundongos BALB/c sensibilizados com 40 μ g de EPA apresentaram perda de peso, alteração no consumo de ração e na ingestão do extrato de amendoim durante o desafio oral

Nos modelos experimentais de alergia alimentar à OVA e à BLG metodologicamente semelhantes ao presente estudo, um dos sinais clínicos observados é a perda de peso durante o desafio oral nos animais que manifestam a doença (GOMES-SANTOS et al., 2015; SALDANHA et al., 2004). Durante a ingestão do extrato de amendoim, apenas os camundongos sensibilizados com 40 μ g de EPA apresentaram perda de peso, a qual se iniciou no segundo dia do desafio oral e permaneceu até o décimo dia (Figura 6). A partir do décimo segundo dia, os camundongos recuperaram o peso perdido, o que se manteve até o final do protocolo experimental. Esse período de recuperação do peso corporal foi acompanhado por um aumento no consumo de ração e na ingestão de extrato de amendoim (Figura 7). Os camundongos sensibilizados com 8 μ g ou 80 μ g de EPA não apresentaram diminuição do peso

corporal, nem alteração no consumo de ração ou na ingestão do extrato de amendoim ao longo do desafio oral.

Com base na produção elevada de anticorpos do tipo IgG anti-EPA (Figura 5) e nas alterações de peso e consumo dos camundongos sensibilizados com 40µg de EPA, esta foi a dose escolhida para sensibilizar os camundongos neste novo modelo de alergia alimentar ao amendoim.

Variação de peso durante o desafio oral

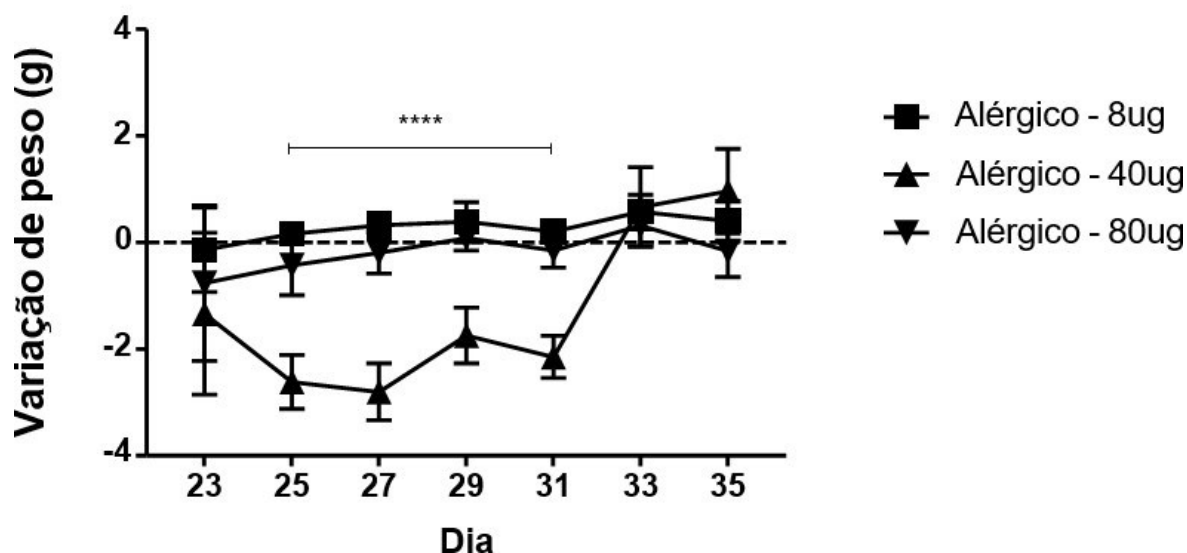


Figura 6. Variação de peso dos animais durante o desafio oral. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com três doses diferentes de EPA (8µg, 40µg e 80µg) na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais foram inoculados com as mesmas doses de EPA na ausência de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). O peso de cada camundongo foi monitorado em intervalos de dois dias e subtraído pelo seu peso inicial (equivalente ao peso do primeiro dia de desafio oral). ****p<0,0001.

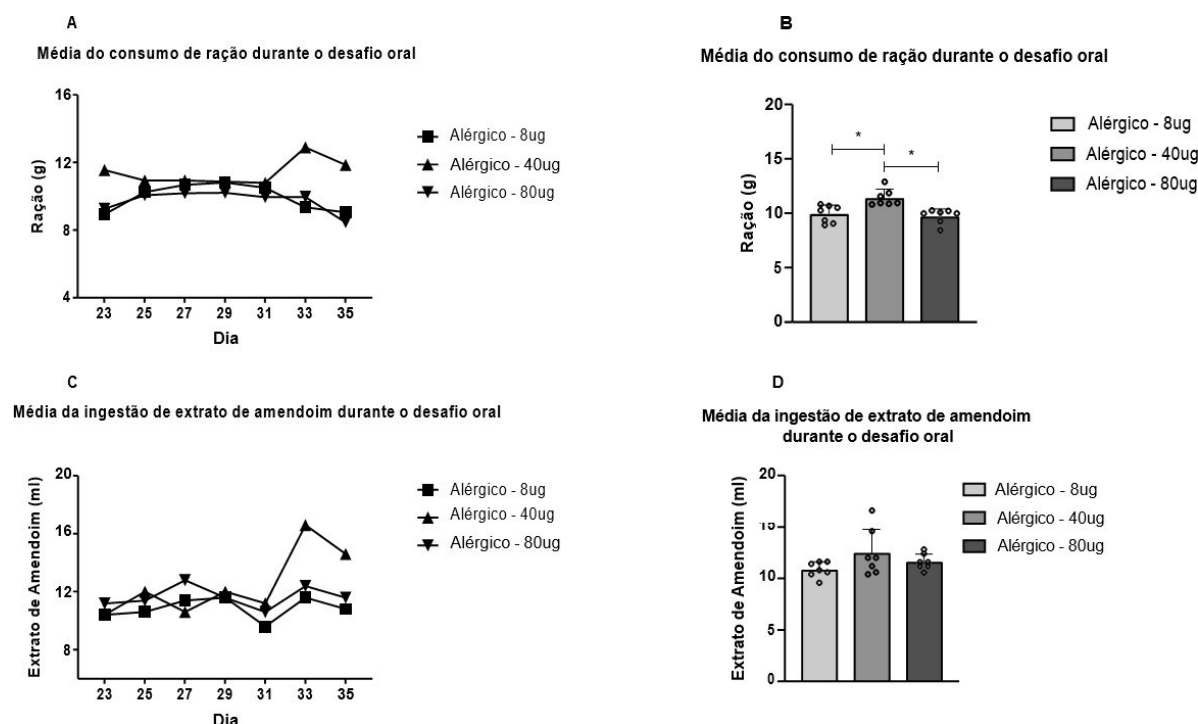


Figura 7. Média do consumo de ração e da ingestão de extrato de amendoim durante o desafio oral. Camundongos BALB/c foram imunizados por via subcutânea com três doses diferentes de EPA (8µg, 40µg e 80µg) na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais foram inoculados com as mesmas doses de EPA na ausência de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). O consumo de ração e a ingestão de extrato de amendoim foram monitorados, para cada grupo, em intervalos de dois dias. Com base nos valores obtidos por grupo, foi feita a média de consumo por animal. (A) Análise cinética da média do consumo de ração por animal durante o desafio oral. (B) Média do consumo de ração por animal durante o desafio oral. (C) Análise cinética da média de ingestão do extrato de amendoim por animal durante o desafio oral. (D) Média da ingestão de extrato de amendoim por animal durante o desafio oral. *p<0,05.

4.4 Os camundongos da linhagem BALB/c produzem menos IgG anti-EPA em resposta à sensibilização e ao desafio oral do que os camundongos da linhagem C57BL/6

No modelo de alergia alimentar à OVA equivalente ao modelo apresentado neste estudo, os camundongos alérgicos aumentam a produção de IgG1 anti-OVA durante a ingestão de clara de ovo em comparação com os níveis produzidos em resposta à sensibilização. No protocolo 1, os camundongos sensibilizados com 40µg de EPA mostraram uma pequena, porém não estatisticamente significativa, redução nos níveis séricos de IgG anti-EPA ao final do desafio oral. Logo, na tentativa de prevenir essa diminuição ou induzir um aumento na produção de IgG anti-EPA em resposta à ingestão do extrato de amendoim, decidiu-se otimizar a sensibilização dos animais no protocolo 2. Para isso, utilizou-se 3mg de Al(OH)₃ em ambas as

administrações do antígeno (40 μ g de EPA nos dias 0 e 14), caracterizando duas imunizações ao invés de uma imunização seguida de um booster.

Além disso, estudos sugerem que a linhagem BALB/c é resistente à alergia alimentar ao amendoim. Em um esquema de sensibilização semelhante ao apresentado aqui, Teixeira (1995) demonstrou que camundongos C57BL/6 sensibilizados para as proteínas do amendoim produzem níveis mais altos IgG específica do que camundongos da linhagem BALB/c. No entanto, essa comparação não foi realizada após o desafio oral, quando os animais apresentam-se alérgicos. Logo, decidiu-se incluir neste protocolo os grupos controle e alérgico da linhagem C57BL/6 para compará-los aos camundongos BALB/c.

Como resultado, foi possível observar que, para ambas as linhagens, a presença do Al(OH)₃ na segunda imunização não resultou em aumento da produção de IgG anti- EPA ao final do desafio oral em comparação com os níveis produzidos na sensibilização (Figura 8A). Porém, foi possível observar que, nos dois pontos de análise (dias 21 e 35), os camundongos C57BL/6 apresentaram níveis séricos de IgG anti-EPA maiores do que os camundongos BALB/c (Figura 8A e B). Não foi observada a presença de IgG anti- EPA no soro dos grupos controle das linhagens BALB/c e C57BL/6 após a ingestão de extrato de amendoim.

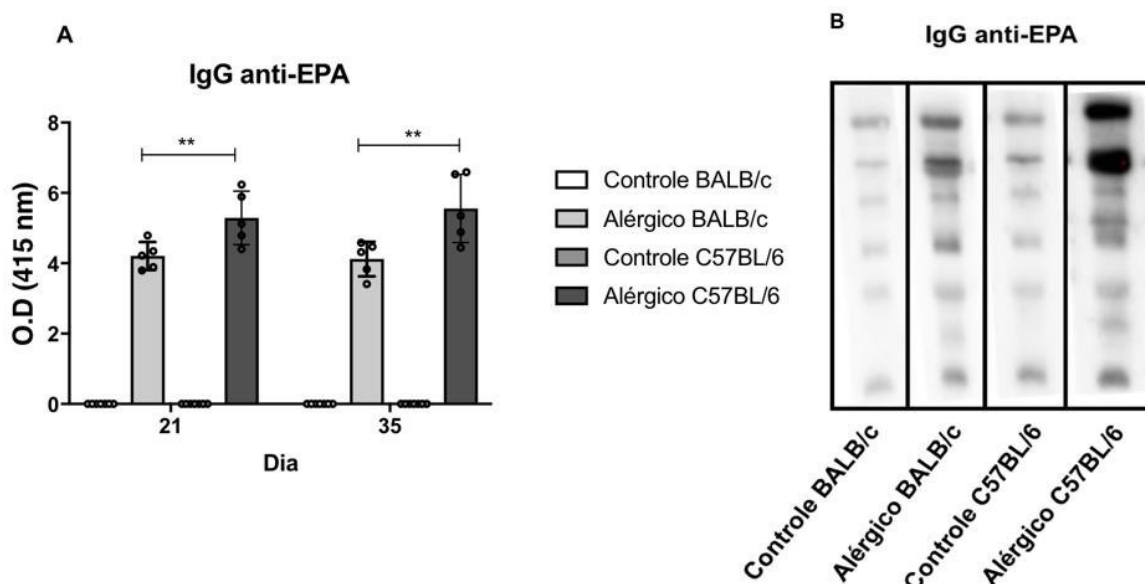


Figura 8. Níveis séricos de IgG anti-EPA antes e após o desafio oral. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais receberam uma segunda imunização com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). Os grupos controles não foram imunizados e ingeriram o extrato de amendoim durante o desafio oral. (A) O sangue dos

animais foi coletado antes e após o desafio oral para mensuração dos níveis séricos de IgG anti-EPA por ELISA. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,005$. (B) Foi feito um pool do soro dos animais de cada grupo, coletado ao final do desafio oral, para avaliação da interação entre as IgG séricas e as diferentes proteínas do EPA por Western Blot.

4.5 Os camundongos da linhagem BALB/c não diferem dos camundongos da linhagem C57BL/6 na produção de IgE total após o desafio oral

No presente estudo, os níveis séricos de IgE total foram mensurados apenas no dia 35 do protocolo experimental, após o período de ingestão do extrato de amendoim. Os resultados mostraram que os camundongos alérgicos da linhagem BALB/c possuíam altos níveis de IgE total em comparação aos camundongos do grupo controle (Figura 9). Esse resultado não foi reproduzido na linhagem C57BL/6, visto que os camundongos do grupo controle também apresentaram altos níveis de IgE total após os 14 dias de ingestão do extrato de amendoim. Ao comparar os grupos alérgicos de ambas as linhagens, não foi possível identificar diferenças nos níveis séricos de IgE total.

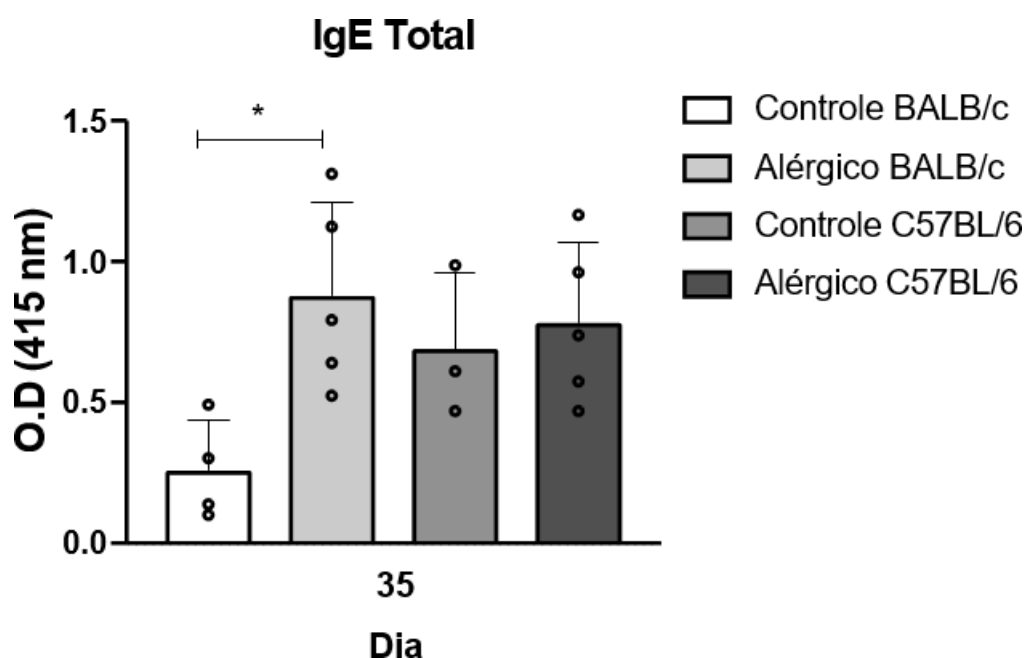


Figura 9. Níveis séricos de IgE total após o desafio oral. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais receberam uma segunda imunização com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). Os grupos controles não foram

imunizados e ingeriram o extrato de amendoim durante o desafio oral. O sangue dos animais foi coletado ao final do desafio oral para mensuração dos níveis séricos de IgE total. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$.

4.6 A mucosa intestinal dos camundongos alérgicos BALB/c e C57BL/6 apresentou alterações condizentes com a alergia alimentar

Nos modelos experimentais de alergia alimentar à OVA e à BLG metodologicamente semelhantes ao presente estudo, o intestino delgado dos animais alérgicos apresenta diminuição do tamanho dos vilos, aumento da profundidade das criptas e maior frequência de células caliciformes, linfócitos intraepiteliais e eosinófilos (GOMES-SANTOS et al., 2015; SALDANHA et al., 2004). Para avaliar se as mesmas alterações ocorriam no modelo de alergia alimentar ao amendoim, após o desafio oral, a porção proximal do intestino delgado (duodeno e jejuno proximal) dos grupos controle e alérgico de ambas linhagens foi coletada para a análise dos parâmetros citados acima.

Em nenhuma das duas linhagens houve diferença estatística quanto ao tamanho dos vilos entre os grupos controle e alérgico (Figura 10A). No entanto, o grupo alérgico da linhagem C57BL/6 apresentou maior profundidade das criptas em relação ao grupo controle (Figura 10A). Não foi observada diferença entre os grupos alérgicos para nenhum desses parâmetros.

Quanto ao número de células caliciformes, apenas o grupo alérgico da linhagem BALB/c apresentou maior número dessas células quando comparado ao seu grupo controle (Figura 10B). No entanto, ao comparar os grupos alérgicos de ambas linhagens, os camundongos C57BL/6 apresentaram maior número de células caliciformes do que os camundongos BALB/c. Essa diferença também foi observada quando o grupo controle C57BL/6 foi comparado ao grupo controle BALB/c.

Em relação ao número de linfócitos intraepiteliais e eosinófilos, os animais alérgicos BALB/c e C57BL/6 apresentaram maior número dessas células na mucosa intestinal quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Figura 10C e D). Não houve diferença entre os grupos alérgicos ou controles quando as linhagens foram comparadas.

Outro tipo celular presente no compartimento epitelial da mucosa intestinal que parece exercer papel importante na alergia alimentar é a célula de Paneth, a qual está presente nas criptas intestinais. Mediante primeira observação da mucosa intestinal dos animais alérgicos,

identificou-se um possível aumento na atividade desse tipo celular. Na tentativa de quantificar esse aumento, decidiu-se mensurar a porcentagem da área das criptas ocupada pelas células de Paneth. Ao comparar os valores dos grupos alérgicos BALB/c e C57BL/6 com seus respectivos controles, não foi possível observar uma maior ocupação espacial das células de Paneth nas criptas intestinais em resposta à alergia alimentar (Figura 10E).

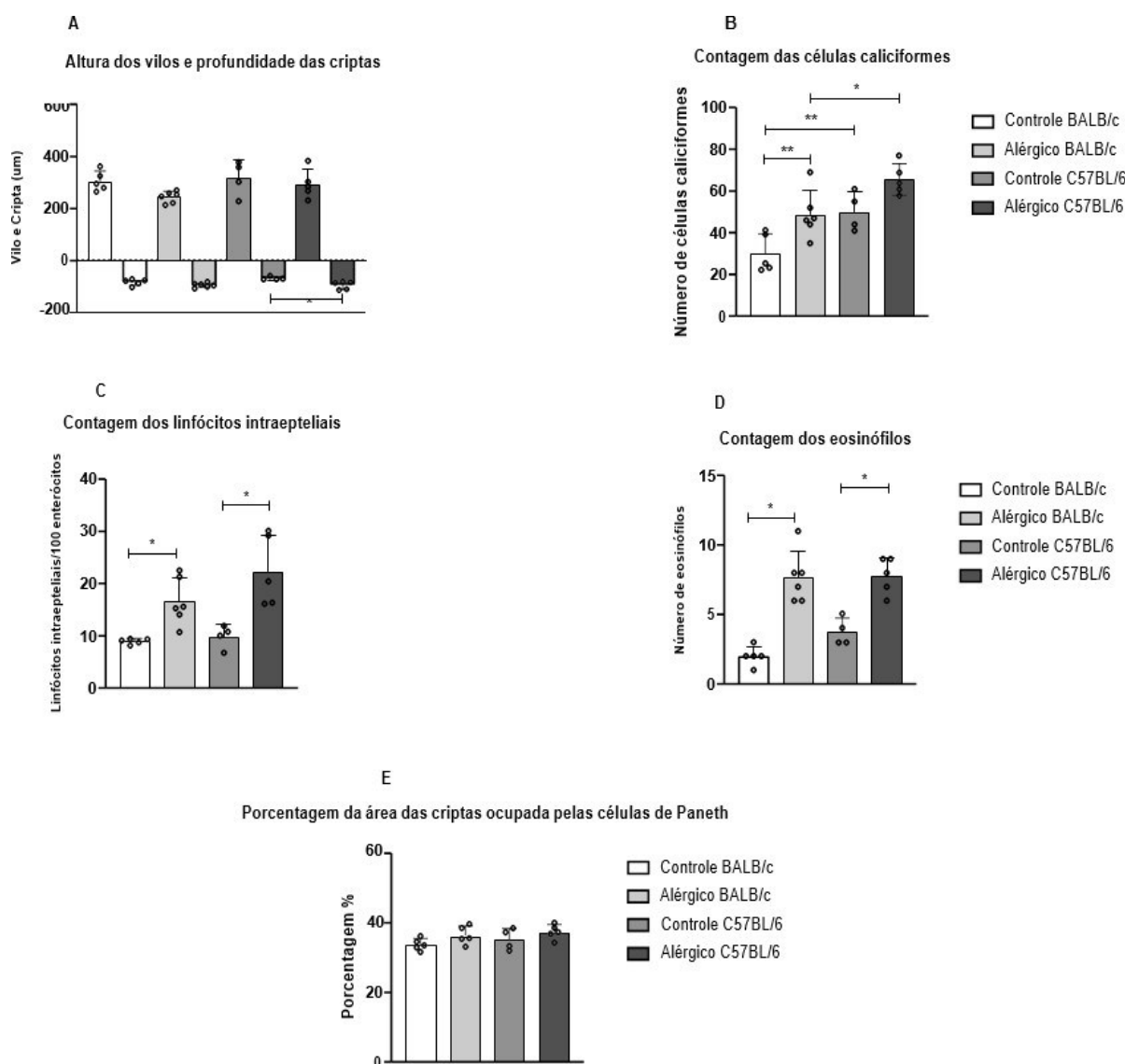


Figura 10. Morfometria da mucosa intestinal dos camundongos após o desafio oral. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 40µg de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais receberam uma segunda imunização com 40µg de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). Os grupos controles não foram imunizados e ingeriram o extrato de amendoim durante o desafio oral. Ao final do protocolo experimental, os animais foram sacrificados, e a região proximal do intestino (duodeno e jejuno proximal) foi coletada para as análises morfométricas. Para cada animal, foram analisados três campos no aumento de 20x para os seguintes parâmetros: (A) Média da altura dos vilos (barras para cima) e da profundidade das criptas (barras para baixo). (B) Número de células caliciformes. (C) Número de eosinófilos. (D) Número de linfócitos

intraepiteliais a cada 100 enterócitos. (E) Média da porcentagem da área das criptas ocupada pelas células de Paneth. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

4.7 Camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados não apresentaram perda de peso durante o desafio oral, nem alterações significativas no consumo de ração e na ingestão do extrato de amendoim

No presente protocolo, os camundongos do grupo alérgico de nenhuma das linhagens perderam peso durante o desafio oral (Figura 11). No entanto, os camundongos dos grupos controle e alérgico da linhagem BALB/c ganharam peso durante o desafio oral em comparação com os grupos controle e alérgico da linhagem C57BL/6, respectivamente. Esse ganho de peso foi acompanhado por um maior consumo de ração durante o desafio oral (Figura 12A e B). Os grupos experimentais não se diferenciaram com relação ao consumo da solução contendo extrato de amendoim (Figura 12C e D).

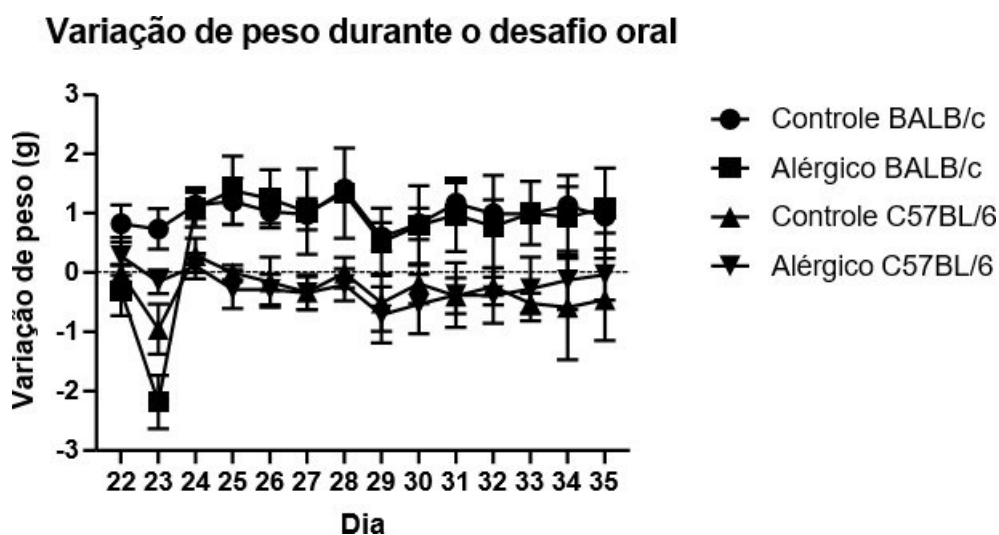


Figura 11. Variação de peso dos animais durante o desafio oral. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais receberam uma segunda imunização com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). Os grupos controles não foram imunizados e ingeriram o extrato de amendoim durante o desafio oral. O peso de cada camundongo foi monitorado diariamente e subtraído pelo seu peso inicial (equivalente ao peso do primeiro dia de desafio oral).

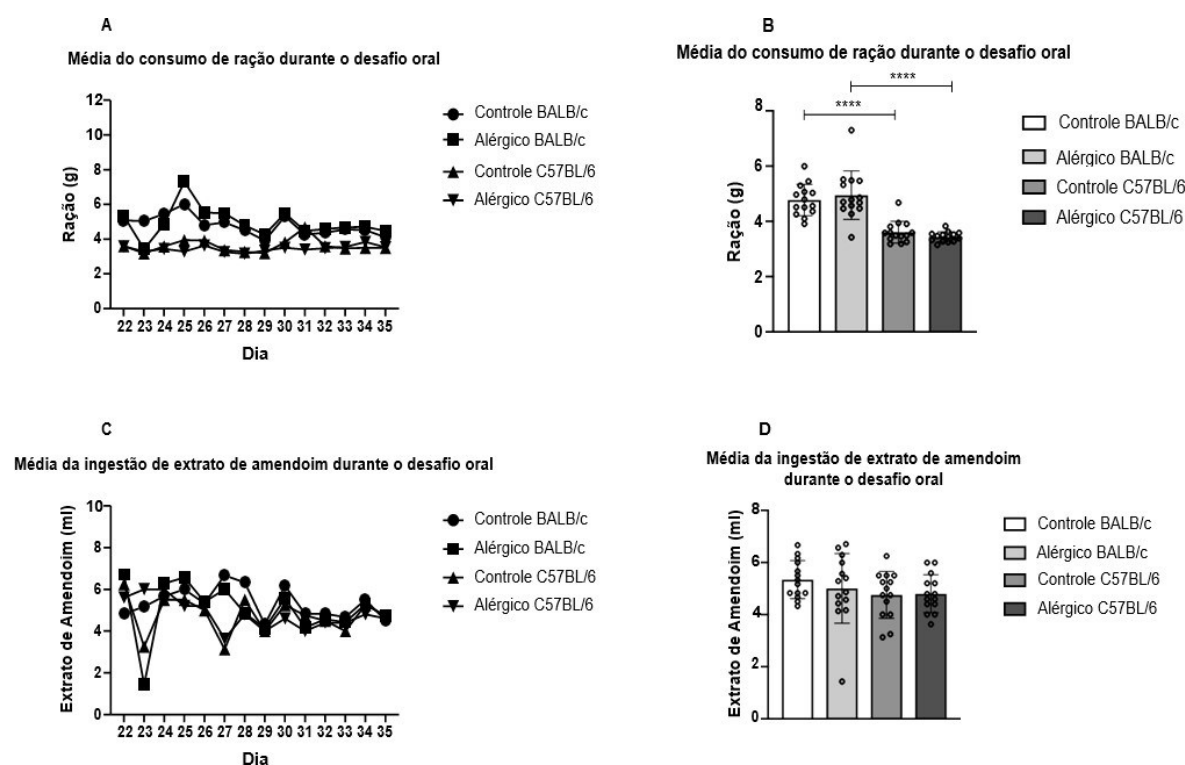


Figura 12. Média do consumo de ração e da ingestão de extrato de amendoim durante o desafio oral. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 40µg de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais receberam uma segunda imunização com 40µg de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. A partir do dia 21, durante o desafio oral, os animais ingeriram o extrato de amendoim por 14 dias (até o dia 35). Os grupos controles não foram imunizados e ingeriram o extrato de amendoim durante o desafio oral. O consumo de ração e a ingestão de extrato de amendoim foram monitorados diariamente em cada grupo. Com base nos valores obtidos por grupo, foi feita a média de consumo por animal. (A) Análise cinética da média do consumo de ração por animal durante o desafio oral. (B) Média do consumo de ração por animal durante o desafio oral. (C) Análise cinética da média de ingestão do extrato de amendoim por animal durante o desafio oral. (D) Média da ingestão de extrato de amendoim por animal durante o desafio oral. Os dados estão representados como média ± desvio padrão. ****p<0,0001.

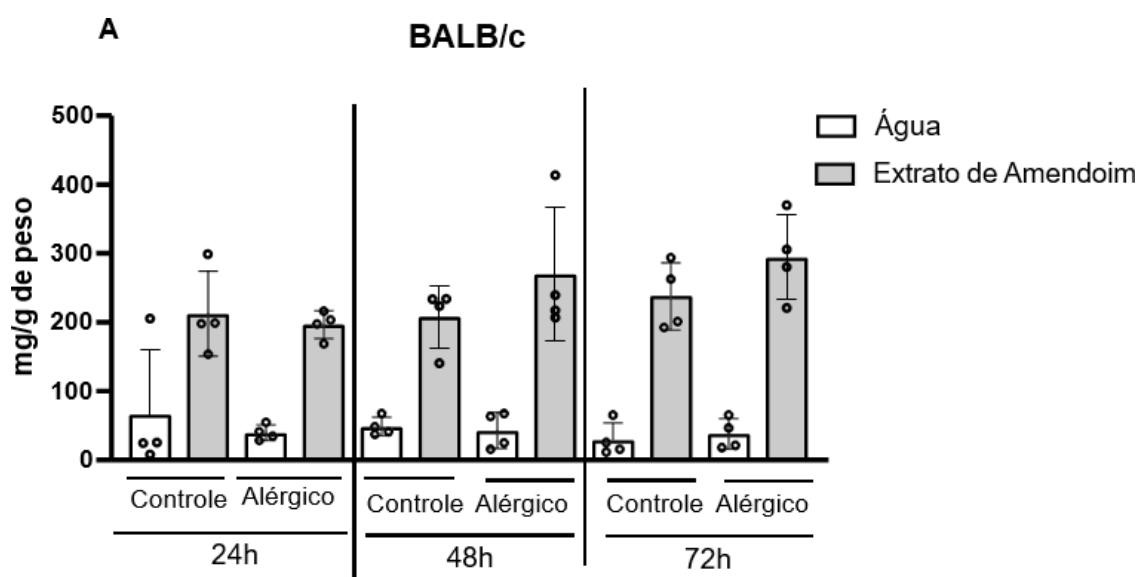
4.8 Os camundongos alérgicos das linhagens BALB/c e C57BL/6 não apresentam aversão ao consumo do extrato de amendoim.

Nos modelos experimentais de alergia alimentar à OVA e à BLG metodologicamente semelhantes ao presente estudo, os camundongos alérgicos apresentam aversão à solução de clara de ovo e ao whey protein, respectivamente, mesmo que em magnitudes diferentes. Logo, o teste de preferência alimentar foi aplicado nos camundongos sensibilizados com o EPA para investigar um possível comportamento aversivo em relação ao extrato de amendoim. Para isso,

juntamente com 3mg de Al(OH)₃, nos dias 0 e 14. Após uma semana, os animais sensibilizados

e seus respectivos controles foram colocados em gaiolas individuais, onde ofertou-se a cada um deles duas mamadeiras: uma contendo água, e uma contendo extrato de amendoim. A ingestão individual de água e extrato de amendoim foi avaliada em intervalos de 24h, durante 3 dias (24h, 48h e 72h).

Como resultado, foi possível observar que camundongos dos grupos controle e alérgico de ambas linhagens preferiram ingerir o extrato de amendoim do que a água. Curiosamente, ao contrário dos modelos de alergia alimentar à OVA e à BLG, os camundongos alérgicos de nenhuma das linhagens ingeriram menos extrato de amendoim do que seus respectivos controles em nenhum dos três pontos de análise (Figura 13A e B). Ou seja, o fenômeno da aversão não pôde ser observado no presente modelo de alergia alimentar ao amendoim.



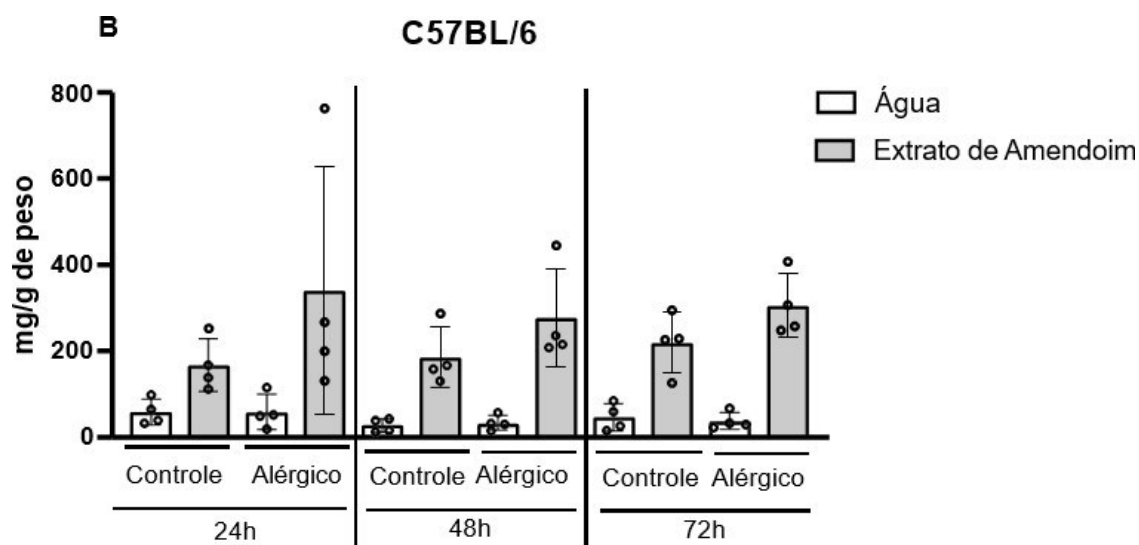


Figura 13. Média da ingestão individual de água e extrato de amendoim durante o teste de preferência.

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. Quatorze dias depois, os animais receberam uma segunda imunização com 40 μ g de EPA na presença de 3mg de Al(OH)₃. Os camundongos dos grupos controles não foram imunizados. A partir do dia 21, os camundongos de todos os grupos foram colocados em gaiolas individuais, contendo duas mamadeiras preenchidas com água e extrato de amendoim. O peso das mamadeiras era determinado antes da oferta e após 24h de consumo, durante 3 dias consecutivos, para determinação da quantidade de água e extrato de amendoim ingeridos por camundongo. (A) Linhagem BALB/c. (B) Linhagem C57BL/6. O consumo está expresso em mg/g de peso. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

O estudo da individualidade de diferentes tipos de alergia alimentar em modelos murinos requer protocolos padrão que tenham como principal diferença o antígeno indutor das reações alérgicas. O grupo de pesquisa do LIB, juntamente com seus colaboradores, tem desenvolvido modelos de alergia alimentar padronizados em relação à linhagem de camundongos (BALB/c), à via de sensibilização (subcutânea ou peritoneal), e ao adjuvante (hidróxido de alumínio). Com essa estrutura, atualmente existem dois modelos murinos de alergia alimentar padronizados: alergia à OVA e alergia à BLG. Para completar as três alergias alimentares mais prevalentes, o presente estudo teve o objetivo de padronizar um novo modelo murino de alergia alimentar ao amendoim nos padrões dos modelos desenvolvidos pelo LIB e colaboradores. Como resultado desse esforço, o presente modelo de alergia ao amendoim foi eficaz em desencadear alterações clássicas da alergia alimentar, como o aumento na produção de IgE e IgG, associado a alterações inflamatórias na mucosa intestinal.

O primeiro passo na padronização desse modelo foi a determinação da dose ótima de sensibilização dos camundongos com o EPA. As doses mais baixas, de 8µg e 40µg de proteínas, foram mais imunogênicas do que a dose mais alta, de 80µg. Diversos estudos mostraram que doses mais baixas de alérgenos, na presença de adjuvante, levam a uma maior produção de IgE e, conseqüentemente, a respostas alérgicas mais graves. Segundo Vaz et al. (1971), a administração intraperitoneal de 0,1µg de OVA, juntamente com hidróxido de alumínio, induz

leva apenas a um aumento transitório na produção de IgE, sem interferência na produção de IgG1. Em modelos nos quais os camundongos sensibilizados são desafiados com OVA, doses mais baixas de sensibilização levam a um maior infiltrado de eosinófilos no sítio da inflamação, assim como uma maior produção de citocinas do tipo 2 (LEE et al., 2013; SAKAI et al., 1999). Isso também é observado em um modelo murino de alergia alimentar ao amendoim, no qual a administração intragástrica de 5mg de amendoim, juntamente com toxina colérica, gera maior produção de IgE e resposta anafilática mais grave em comparação à sensibilização com doses cinco vezes mais altas (LI et al., 2000). Curiosamente, a supressão na produção de IgE e as respostas inflamatórias mais brandas mediante sensibilização com altas doses de antígeno parecem estar relacionadas à ativação de vias reguladoras, com indução de citocinas anti-inflamatórias (TGF-β e IL-10) e geração de linfócitos Treg com alta capacidade supressora (LEE et al., 2013).

Sendo assim, os resultados observados no presente estudo estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura. Apesar de não haver diferença na sensibilização com 8µg e 40µg de EPA, apenas os animais sensibilizados com a dose de 40µg apresentaram redução no peso corporal e alteração no consumo de extrato de amendoim durante o desafio oral. Nos modelos de alergia à OVA e à BLG, essas características também são observadas (GOMES-SANTOS et al., 2015; SALDANHA et al., 2004), o que nos levou a escolher a quantidade de 40µg de EPA como a dose ótima de sensibilização. É importante ressaltar que a sensibilização foi feita com extrato proteico cru, ou seja, contendo todas as proteínas do amendoim. Logo, como nem todas as proteínas presentes no EPA são alergênicas, os 40µg de proteínas do EPA provavelmente não correspondem a 40µg de alérgenos.

No modelo de alergia alimentar à OVA, a produção de IgG1-anti OVA aumenta durante o desafio oral em comparação com os níveis produzidos durante a sensibilização (SALDANHA et al., 2004). Essa característica não foi observada no protocolo 1, no qual testou-se a dose de sensibilização nos camundongos BALB/c. Além disso, em comparação a outras linhagens, os camundongos BALB/c parecem ser resistentes à alergia ao amendoim. Em um modelo de sensibilização intragástrica com toxina colérica, camundongos BALB/c produzem níveis mais baixos de IgE e são resistentes à anafilaxia em comparação com camundongos C3H/HeJ (MORAFO et al., 2003). Em um esquema de sensibilização similar ao do presente estudo, Teixeira (1995) e Teixeira et al. (2008) mostraram que camundongos BALB/c são menos responsivos à imunização com extrato proteico de amendoim do que camundongos C57BL/6. Em vista disso, testou-se o presente modelo de alergia alimentar ao amendoim em duas linhagens de camundongos: BALB/c e C57BL/6.

Assim como demonstrado por Teixeira (1995) e Teixeira et al. (2008), no presente estudo os camundongos BALB/c produziram níveis mais baixos de IgG anti- EPA do que os camundongos C57BL/6, evidenciado pelos métodos de ELISA e Western Blot. Esses animais expressam diferentes complexos de histocompatibilidade principal (MHC). Enquanto a linhagem BALB/c expressa o haplótipo H-2d, a linhagem C57BL/6 expressa o haplótipo H-2b. Sendo assim, pode ser que as moléculas do MHC- II dos camundongos C57BL/6 se liguem com maior avidéz aos peptídeos produzidos a partir dos antígenos do EPA e, assim, os apresentem de forma mais eficiente aos linfócitos T (essenciais para a produção de anticorpos por linfócitos B). Além disso, a linhagem C57BL/6 é mais eficiente em montar respostas Th1 do que a linhagem BALB/c. O anticorpo utilizado para o ensaio de ELISA, tanto nos trabalhos de Teixeira (1995) e Teixeira et al. (2008), quanto no presente estudo, não distingue os subtipos

de IgG presentes no soro dos animais. Dessa maneira, não é possível saber se a maior produção de IgG na linhagem C57BL/6 decorre de uma maior produção de IgG1 (ligado a respostas Th2) ou de uma maior produção de IgG2a (ligado a respostas Th1). É importante ressaltar que a diferença vista nos níveis séricos de IgG anti-EPA não foi observada em relação aos níveis de IgE total, principal anticorpo em respostas imunes do tipo 2. Apesar de não ter sido possível dosar os níveis de IgE específica para as proteínas do EPA, essa classe de anticorpo encontra-se em concentrações muito baixas no soro em comparação a outros isotipos, como a IgG (LOH; VALE; MCLEAN- TOOKE, 2013). Logo, é provável que o aumento nos anticorpos do tipo IgE nos grupos alérgicos seja específico para as proteínas do amendoim e, assim, não haja diferença nos níveis séricos de IgE específica entre as duas linhagens. Porém, será importante determinar os níveis de IgE específica, futuramente, no modelo de alergia alimentar ao amendoim apresentado aqui.

De forma intrigante, o grupo controle da linhagem C57BL/6 apresentou altos níveis séricos de IgE total após os 14 dias de desafio oral e, por isso, não houve diferença em relação ao grupo alérgico. Além disso, o grupo controle apresentou contagem elevada de células caliciformes, apesar de não ter tido alterações nos outros parâmetros histológicos. Como a produção aumentada de IgE e a maior contagem de células caliciformes estão ligadas a respostas imunes do tipo 2, é possível que os camundongos controle da linhagem C57BL/6 já se sensibilizem pela ingestão crônica do extrato. Em um modelo de alergia alimentar ao amendoim similar ao apresentado aqui, o consumo crônico de sementes de amendoim por camundongos C57BL/6 não imunizados levou a uma maior contagem de eosinófilos na mucosa intestinal, maior frequência de células NK na lâmina própria, assim como redução na frequência de células Foxp3⁺ nas placas de Peyer (CARDOSO et al., 2008). Além disso, esses animais também apresentaram maior expressão gênica de diversas citocinas no jejuno, incluindo IL-13, IFN- γ e IL-10. Curiosamente, algumas dessas alterações não são observadas na ausência de IL-4, a principal citocina envolvida nos processos de sensibilização (CARDOSO et al., 2009). Apesar de não ter sido observada produção de IgE específica pelos camundongos não imunizados que consumiram o amendoim, os dados relatados por Cardoso et al. (2008) claramente mostram que o consumo crônico desse alimento pode modular o GALT. Assim, no presente estudo, a produção aumentada de IgE total pelos camundongos C57BL/6 do grupo controle levanta a possibilidade de que a ingestão prolongada de extrato de amendoim pode naturalmente alterar diferentes compartimentos do sistema imune no intestino, o que pode

alterar o estado de tolerância para as proteínas dos alimentos ou para outros antígenos presentes no lúmen intestinal.

O presente protocolo de alergia alimentar ao amendoim foi eficaz em aumentar os níveis séricos de IgE durante o desafio oral, o que coincidiu com alterações inflamatórias na mucosa intestinal, evidenciadas pelo aumento na contagem de células caliciformes, eosinófilos e linfócitos intraepiteliais. Apesar da linhagem C57BL/6 ter sido mais responsiva do que a linhagem BALB/c, ambas se diferenciaram dos seus respectivos grupos controle em termos de produção de anticorpos anti-EPA e inflamação intestinal. Logo, o presente protocolo funciona para ambas as linhagens e, assim, nos permite realizar futuras comparações com os modelos de alergia alimentar à OVA e à BLG desenvolvidos pelo grupo do LIB e colaboradores. No entanto, algumas diferenças importantes devem ser mencionadas. No presente estudo, os animais foram sensibilizados com um extrato proteico cru, ao passo que os animais dos outros modelos foram sensibilizados com antígenos purificados (OVA e BLG) (GOMES-SANTOS et al., 2015; SALDANHA et al., 2004). Como o EPA pode conter outras substâncias bioativas que podem interagir com as APCs e modular sua capacidade de induzir respostas efectoras no momento da sensibilização, é necessário testar a sensibilização com antígenos purificados do amendoim para aproximar mais o presente modelo dos demais já padronizados. Além disso, a solução de desafio nos modelos de alergia alimentar à OVA e BLG possuem 20% de clara de ovo e whey protein, respectivamente. No presente modelo, a solução ofertada aos camundongos possui apenas 3,3% de amendoim. Apesar desse alimento ter aproximadamente o dobro de proteínas do que a clara de ovo (Tabela Brasileira de Composição de Alimento – TACO 4a Edição), essa concentração de 3,3% oferece menos da metade da quantidade de proteínas/ml ofertada na solução de clara de ovo a 20% (9mg/ml vs. 20mg/ml, respectivamente). Sendo assim, seria interessante investigar o efeito da oferta de um extrato de amendoim mais concentrado na resposta alérgica dos animais. Por último, o extrato de amendoim é rico em lipídios, ao contrário das soluções de clara de ovo e whey protein. Apesar da fração lipídica do amendoim apresentar efeitos adjuvantes na sensibilização (PALLADINO et al., 2018; VAN WIJK et al., 2005), a ingestão de proteínas do amendoim com veículos ricos em lipídios aumenta o limiar de proteínas necessário para desencadear reações alérgicas (GRIMSHAW et al., 2003). Logo, seria interessante investigar o efeito de um extrato de amendoim pobre em lipídios na resposta alérgica dos animais sensibilizados com EPA.

Ao contrário de muitos modelos murinos que desafiam os animais com um bolus de antígeno por gavagem para análise de respostas anafiláticas (LIU; NAVARRO; LOPATA,

2016), o desafio oral nos modelos do LIB e colaboradores consiste na oferta do antígeno diluído na água da mamadeira por, no mínimo, 7 dias. Isso permite o acesso fracionado e contínuo aos alérgenos, viabilizando a análise do comportamento dos camundongos mediante a solução desencadeadora das respostas alérgicas. Nos modelos de alergia à OVA e BLG, o grupo alérgico ingere menos solução de clara de ovo (20%) e whey protein (20%), respectivamente, do que o grupo controle ao longo do desafio oral (GOMES-SANTOS et al., 2015; SALDANHA et al., 2004). Quando os camundongos sensibilizados com OVA podem escolher entre beber água ou solução de clara de ovo adocicada, eles preferem beber água, ao contrário dos animais não sensibilizados (CARA; CONDE; VAZ, 1994). No mesmo cenário, os camundongos sensíveis ou não à BLG preferem ingerir solução de whey protein à água, ainda que os animais sensibilizados ingiram menos volume do que os animais controles (SANTOS, 2018). Sendo assim, enquanto os camundongos sensíveis à OVA apresentam aversão acentuada à solução de clara de ovo, os camundongos sensíveis à BLG apresentam aversão parcial à solução de whey protein.

Diferentemente do que é observado nos modelos citados anteriormente, no presente estudo, o grupo alérgico não ingeriu menos extrato de amendoim do que o grupo controle durante o desafio oral. Além disso, quando os camundongos são submetidos ao teste de preferência, todos eles preferem ingerir o extrato de amendoim à água, não havendo diferença na quantidade de extrato de amendoim ingerido entre os camundongos sensibilizados e controles. Logo, o fenômeno da aversão não foi observado no presente modelo de alergia alimentar ao amendoim, o que pode estar relacionado a respostas no sistema nervoso central. Ao ingerir solução de clara de ovo, os animais alérgicos à OVA apresentam maior atividade neuronal na região central da amígdala (CeA) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), áreas relacionadas a situações de ansiedade e estresse, como a aversão (BASSO et al., 2003). Essa característica não foi observada na alergia alimentar à BLG, visto que o grupo alérgico não se diferencia do controle na ativação da CeA frente a ingestão de solução de whey protein (SANTOS, 2018). Neste mesmo trabalho, foi mostrado que a adição de BLG à solução de clara de ovo é capaz de reverter o fenômeno da aversão em camundongos sensíveis à OVA. Isso levou a autora do trabalho a propor que a ingestão de BLG pode levar a ativação de áreas cerebrais relacionadas a recompensa, encorajando os animais a ingerir a solução contendo o antígeno, mesmo que isso leve a efeitos indesejáveis. Na mesma linha de pensamento, pode ser que esta seja uma explicação para os resultados observados no presente estudo e que, talvez,

esse efeito “recompensa” nos animais alérgicos ao amendoim seja ainda maior, visto que eles não apresentaram nível algum de aversão.

De fato, camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, ambas empregadas no presente modelo, apresentam boa aceitação ao amendoim e alta preferência por essa semente em relação a ração comercial, mostrando um apreço natural por esse alimento (TEIXEIRA, 1995; TEIXEIRA et al., 2008). Nestes estudos, a sensibilização dos camundongos com 10 μ g ou 100 μ g de extrato proteico de amendoim, na presença de hidróxido de alumínio, fez com que os animais evitassem o consumo de amendoim e passassem a comer mais castanha de caju, num cenário onde, além da ração, os animais tinham essas duas opções de escolha. Esse comportamento não foi observado no teste de preferência do presente estudo, o que pode estar relacionado a três fatores: a dose de sensibilização, a forma de oferta do alimento e a busca por recompensa. No modelo de alergia alimentar ao amendoim apresentado aqui, os animais foram sensibilizados com 40 μ g de EPA. No protocolo 1, essa dose levou a uma maior ingestão do extrato de amendoim comparado às doses extremas de 8 μ g e 80 μ g (próximas a 10 μ g e 100 μ g). Sendo assim, pode ser que uma dose intermediária de sensibilização tenha um efeito diferente de doses baixas ou altas no comportamento dos animais frente ao amendoim. Outra possível explicação é o fato de que, nos estudos de Teixeira (1995) e Teixeira et al. (2008), o amendoim é ofertado in natura, ao passo que, no presente estudo, esse alimento foi processado e ofertado em forma de extrato. Logo, é provável que a semente in natura traga estímulos não presentes no extrato que levam o camundongo alérgico a rejeitá-la. Por último, o maior consumo de castanha de caju por camundongos alérgicos ao amendoim (TEIXEIRA, 1995; TEIXEIRA et al., 2008) pode ser uma busca por sensações palatáveis parecidas, visto que as duas sementes são ricas em lipídios. Nos estudos de Cardoso et al. (2008,2009), no qual não há outra opção de consumo além do amendoim, os camundongos alérgicos comem mais sementes desse alimento do que os camundongos controle durante o desafio oral. Esse achado é parecido com o que foi encontrado no presente estudo, uma vez que a média da ingestão de extrato de amendoim no segundo e terceiro dia do teste de preferência foi maior no grupo alérgico do que no grupo controle de ambas as linhagens, porém sem significância estatística. Apesar dos animais alérgicos terem a opção de ingerir água, essa não traz as mesmas sensações palatáveis que o amendoim e, por isso, talvez os animais insistam em ingerir o extrato de amendoim pela recompensa sensorial de um alimento que é naturalmente apreciado por eles.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a sensibilização de camundongos BALB/c e C57BL/6 com duas imunizações de 40µg de EPA adsorvidas em 3mg de Al(OH)₃ é capaz de induzir um aumento na produção de IgE total e IgG anti-EPA, assim como alterações inflamatórias na mucosa intestinal mediante a ingestão do extrato de amendoim. Além disso, foi possível observar que os camundongos alérgicos não apresentam comportamento aversivo ao consumo do extrato de amendoim. Logo, o novo modelo murino de alergia alimentar ao amendoim foi eficaz em desencadear os processos inflamatórios observados nos demais modelos murinos de alergia alimentar desenvolvidos pelo LIB e colaboradores e, por isso, poderá ser usado para futuras comparações com os modelos de alergia alimentar à OVA e à BLG.

REFERÊNCIAS

- Apostolovic D, Stanic-Vucinic D, de Jongh HH, de Jong GA, Mihailovic J, Radosavljevic J, Radibratovic M, Nordlee JA, Baumert JL, Milcic M, Taylor SL, Garrido Clua N, Cirkovic Velickovic T, Koppelman SJ. Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.
- Asai K, Kitaura J, Kawakami Y, Yamagata N, Tsai M, Carbone DP, Liu FT, Galli SJ, Kawakami T. Regulation of Mast Cell Survival by IgE. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 791–800, jun. 2001.
- Avery NJ, King RM, Knight S, Hourihane JO. Assessment of quality of life in children with peanut allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 14, n. 5, p. 378–382, 2003. BASSO, A. S. et al. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1–2, p. 69–77, 2003.
- Bannon GA. What makes a food protein an allergen? **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 4, n. 1, 2004.
- Blázquez AB, Berin MC. Gastrointestinal Dendritic Cells Promote Th2 Skewing via OX40L. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4441–4450, 2008.
- Bock SA, Muoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 1, p. 191–193, 2001.
- Brough HA, Liu AH, Sicherer S, Makinson K, Douiri A, Brown SJ, Stephens AC, Irwin McLean WH, Turcanu V, Wood RA, Jones SM, Burks W, Dawson P, Stablein D, Sampson H, Lack G. Atopic dermatitis increases the effect of exposure to peanut antigen in dust on peanut sensitization and likely peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 164–170.e4, 2015.
- Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Northstone K, Henderson J, Alizadehfar R, Ben-Shoshan M, Morgan K, Roberts G, Masthoff LJ, Pasmans SG, van den Akker PC, Wijmenga C, Hourihane JO, Palmer CN, Lack G, Clarke A, Hull PR, Irvine AD, McLean WH. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 3, p. 661–667, 2011.
- Burton OT, Darling AR, Zhou JS, Noval-Rivas M, Jones TG, Gurish MF, Chatila TA, Oettgen HC. Direct effects of IL-4 on mast cells drive their intestinal expansion and increase susceptibility to anaphylaxis in a murine model of food allergy. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 4, p. 740–750, 2013.
- Campbell DE, Mehr S. Fifty years of allergy: 1965-2015. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 51, n. 1, p. 91–93, 2015.
- Cara DC, Conde AA, Vaz NM. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1994.

Cara DC, Conde AA, Vaz NM. Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, n. 1, p. 16–20, 1997.

Cardoso CR, Teixeira G, Provinciatto PR, Godoi DF, Ferreira BR, Milanezi CM, Ferraz DB, Rossi MA, Cunha FQ, Silva JS. Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 2, p. 338–349, 2008.

Cardoso CR, Provinciatto PR, Godoi DF, Ferreira BR, Teixeira G, Rossi MA, Cunha FQ, Silva JS. IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 3, p. 593–600, 2009.

Chen X, Zhuang Y, Wang Q, Moutsoglou D, Ruiz G, Yen SE, Dreskin SC. Analysis of the effector activity of Ara h 2 and Ara h 6 by selective depletion from a crude peanut extract. **Journal of Immunological Methods**, v. 372, n. 1–2, p. 65–70, set. 2011.

Chin S, Vickery BP. Pathogenesis of food allergy in the pediatric patient. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, n. 6, p. 621–629, 2012.

Chu DK, Llop-Guevara A, Walker TD, Flader K, Goncharova S, Boudreau JE, Moore CL, Seunghyun In T, Wasserman S, Coyle AJ, Kolbeck R, Humbles AA, Jordana M. IL-33, but not thymic stromal lymphopoietin or IL-25, is central to mite and peanut allergic sensitization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 1, p. 187–200.e8, 2013.

Chu DK, Mohammed-Ali Z, Jiménez-Saiz R, Walker TD, Goncharova S, Llop-Guevara A, Kong J, Gordon ME, Barra NG, Gillgrass AE, Van Seggelen H, Khan WI, Ashkar AA, Bramson JL, Humbles AA, Kolbeck R, Wasserman S, Jordana M. T helper cell IL-4 drives intestinal Th2 priming to oral peanut antigen, under the control of OX40L and independent of innate-like lymphocytes. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 6, p. 1395–1404, 2014.

Cohen S, Dworetzky M. The allergy archives: Pioneers and Milestones. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 1, p. 179–184, 2002.

Dourado LP, Saldanha JC, Gargiulo DL, Noviello Mde L, Brant CC, Reis ML, Souza RM, Faria AM, Souza Dda G, Cara DC. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. **Cellular Immunology**, v. 262, n. 1, p. 62–68, 2010.

Dourado LP, Noviello ML, Alvarenga DM, Menezes Z, Perez DA, Batista NV, Menezes GB, Ferreira AV, de Souza Dda G, Cara DC. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. **Cellular Immunology**, v. 270, n. 2, p. 198–206, 2011.

Du Toit G, Katz Y, Sasieni P, Mesher D, Maleki SJ, Fisher HR, Fox AT, Turcanu V, Amir T, Zadik-Mnuhin G, Cohen A, Livne I, Lack G. Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 5, p. 984–991, 2008.

Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, Bahnson HT, Radulovic S, Santos AF, Brough HA, Phippard D, Basting M, Feeney M, Turcanu V, Sever ML, Gomez Lorenzo M, Plaut M, Lack

G; LEAP Study Team. Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 9, p. 803–813, 2015.

Esterházy D, Canesso MCC, Mesin L, Muller PA, de Castro TBR, Lockhart A, ElJalby M, Faria AMC, Mucida D. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 126–130, 2019.

Faria AM, Gomes-Santos AC, Gonçalves JL, Moreira TG, Medeiros SR, Dourado LP, Cara DC. Food components and the immune system: From tonic agents to allergens. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–16, 2013.

Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunological Reviews*, v. 206, n. 1, p. 232–259, ago. 2005. FINKELMAN, F. D.; KHODOUN, M. V; STRAIT, R. Human IgE-independent systemic anaphylaxis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 6, p. 1674–1680, jun. 2016.

Golde, WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for bleeding of mice. 2005. **Lab Animal**, v. 34, n. 9, p. 39–43, 2005.

Gomes-Santos AC, Fonseca RC, Lemos L, Reis DS, Moreira TG, Souza AL, Silva MR, Silvestre MP, Cara DC, Faria AM. Hydrolyzed whey protein prevents the development of food allergy to β -lactoglobulin in sensitized mice. **Cellular Immunology**, v. 298, n. 1–2, p. 47–53, 2015.

Gowthaman U, Chen JS, Zhang B, Flynn WF, Lu Y, Song W, Joseph J, Gertie JA, Xu L, Collet MA, Grassmann JDS, Simoneau T, Chiang D, Berin MC, Craft JE, Weinstein JS, Williams A, Eisenbarth SC. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. **Science Robotics**, v. 4, n. 34, p. 1–23, 2019.

Grimshaw KE, King RM, Nordlee JA, Hefle SL, Warner JO, Hourihane JO. Presentation of allergen in different food preparations. p. 1581–1585, 2003. HE, J. S. et al. IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract-revisited. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 49, n. 6, p. 681–689, 2014.

Kanagaratham C, Sallis BF, Fiebiger E. Experimental Models for Studying Food Allergy. **Cmgh**, v. 6, n. 3, p. 356–369.e1, 2018.

Kelleher MM, Dunn-Galvin A, Gray C, Murray DM, Kiely M, Kenny L, McLean WHI, Irvine AD, Hourihane JO. Skin barrier impairment at birth predicts food allergy at 2 years of age. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1111–1116.e8, 2016.

Khodoun MV, Strait R, Armstrong L, Yanase N, Finkelman FD. Identification of markers that distinguish IgE- from IgG-mediated anaphylaxis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 30, p. 12413–12418, 2011.

King RM, Knibb RC, Hourihane JOB. Impact of peanut allergy on quality of life, stress and anxiety in the family. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 64, n. 3, p. 461–468, 2009.

- Kobayashi T, Iijima K, Dent AL, Kita H. Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 1, p. 300–313.e7, 2017.
- Koppelman SJ, Wensing M, Ertmann M, Knulst AC, Knol EF. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, n. 4, p. 583–590, 2004.
- Kubo S, Matsuoka K, Taya C, Kitamura F, Takai T, Yonekawa H, Karasuyama H. Drastic Up-Regulation of FcεRI on Mast Cells Is Induced by IgE Binding Through Stabilization and Accumulation of FcεRI on the Cell Surface. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 6, p. 3427–3434, 2001.
- Kukkonen AK, Pelkonen AS, Mäkinen-Kiljunen S, Voutilainen H, Mäkelä MJ. Ara h 2 and Ara 6 are the best predictors of severe peanut allergy: A double-blind placebo-controlled study. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 70, n. 10, p. 1239–1245, 2015.
- Lee HS, Schlereth S, Khandelwal P, Saban DR. Ocular Allergy Modulation to Hi-Dose Antigen Sensitization Is a Treg-Dependent Process. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–9, 2013.
- Li XM, Serebrisky D, Lee SY, Huang CK, Bardina L, Schofield BH, Stanley JS, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 1 I, p. 150–158, 2000.
- Liu T, Navarro S, Lopata AL. Current advances of murine models for food allergy. **Molecular Immunology**, v. 70, p. 104–117, 2016.
- Loh RK, Vale S, McLean-Tooke A. Quantitative serum immunoglobulin tests. **Australian Family Physician**, v. 42, n. 4, p. 195–198, 2013.
- Ma L, Danoff TM, Borish L. Case fatality and population mortality associated with anaphylaxis in the United States. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1075–1083, 2014.
- Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Kleiner G, Lee SY, Sampson HA, Li AM. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2- TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 1122–1128, 2003.
- Palladino C, Narzt MS, Bublin M, Schreiner M, Humeniuk P, Gschwandtner M, Hafner C, Hemmer W, Hoffmann-Sommergruber K, Mildner M, Palomares O, Gruber F, Breiteneder H. Peanut lipids display potential adjuvant activity by triggering a proinflammatory response in human keratinocytes. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 73, n. 8, p. 1746–1749, 2018.
- Palladino C, Breiteneder H. Peanut allergens. **Molecular Immunology**, v. 100, n. April, p. 58–70, 2018.

Peters RL, Allen KJ, Dharmage SC, Koplin JJ, Dang T, Tilbrook KP, Lowe A, Tang ML, Gurrin LC; HealthNuts Study. Natural history of peanut allergy and predictors of resolution in the first 4 years of life: A population-based assessment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 5, p. 1257- 1266.e2, 2015.

Peters RL, Koplin JJ, Gurrin LC, Dharmage SC, Wake M, Ponsonby AL, Tang MLK, Lowe AJ, Matheson M, Dwyer T, Allen KJ; HealthNuts Study. The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 1, p. 145- 153.e8, 2017.

Petersen A, Kull S, Rennert S, Becker WM, Krause S, Ernst M, Gutsmann T, Bauer J, Lindner B, Jappe U. Peanut defensins: Novel allergens isolated from lipophilic peanut extract. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 5, p. 1295- 1301.e5, 2015.

Platts-Mills TAE. The allergy epidemics: 1870-2010. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 136, n. 1, p. 3–13, jul. 2015.

Porterfield HS, Murray KS, Schlichting DG, Chen X, Hansen KC, Duncan MW, Dreskin SC. Effector activity of peanut allergens: a critical role for Ara h 2, Ara h 6, and their variants. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 7, p. 1099– 1108, 2009.

Prescott S, Allen KJ. Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 22, n. 2, p. 155–160, 2011.

Renz H, Allen KJ, Sicherer SH, Sampson HA, Lack G, Beyer K, Oettgen HC. Food allergy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 2018.

Santiago, H.C.; Bennuru, S.; Ribeiro, J.M.; Nutman, T.B. Structural differences between human proteins and aero- and microbial allergens define allergenicity. **PLoS One**, v. 7, n. 7, 2012.

Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 118, n. 1, p. 9–15, 1999.

Saldanha JC, Gargiulo DL, Silva SS, Carmo-Pinto FH, Andrade MC, Alvarez-Leite JJ, Teixeira MM, Cara DC. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 6, p. 809– 816, 2004.

Sampson HA. Food allergy: Past, present and future. **Allergology International**, v. 65, n. 4, p. 363–369, 2016.

Santos L. Entre a aversão e a recompensa: um conflito neuro-imunológico na alergia alimentar experimental à β -lactoglobulina. **Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia)** - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2018.

Savage J, Sicherer S, Wood R. The Natural History of Food Allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 2, p. 196–203, 2016.

Schwager C, Kull S, Behrends J, Röckendorf N, Schocker F, Frey A, Homann A, Becker WM, Jappe U. Peanut oleosins associated with severe peanut allergy— importance of

lipophilic allergens for comprehensive allergy diagnostics. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 5, p. 1331- 1338.e8, 2017.

Shreffler WG, Castro RR, Kucuk ZY, Charlop-Powers Z, Grishina G, Yoo S, Burks AW, Sampson HA. The Major Glycoprotein Allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, Is a Ligand of Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin and Acts as a Th2 Adjuvant In Vitro. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3677–3685, 2006.

Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 41–58, 2018.

Siragania RP, de Castro RO, Barbu EA, Zhang J. Mast cell signaling: the role of protein tyrosine kinase Syk, its activation and screening methods for new pathway participants. **FEBS Lett**, v. 584, n. 24, 2010.

Teixeira, G. Seleção de dietas por camundongos normais, imunes e tolerantes a amendoim e castanha de caju. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia)** - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1995.

Teixeira G, Paschoal PO, de Oliveira VL, Pedruzzi MM, Campos SM, Andrade L, Nóbrega A. Diet selection in immunologically manipulated mice. **Immunobiology**, v. 213, n. 1, p. 1–12, 2008.

Van Wijk F, Nierkens S, Hassing I, Feijen M, Koppelman SJ, de Jong GA, Pieters R, Knippels LM. The effect of the food matrix on In Vivo immune responses to purified peanut allergens. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 2, p. 333–341, 2005.

Vaz EM, Vaz NM, Levine BB. Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin. **Immunology**, v. 21, n. 1, p. 11–15, 1971.

Walczyk NE, Smith PM, Tovey E, Wright GC, Fleischfresser DB, Roberts TH. Analysis of Crude Protein and Allergen Abundance in Peanuts (*Arachis hypogaea* cv. Walter) from Three Growing Regions in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 15, p. 3714–3725, 2013.

Walczyk NE, Smith PMC, Tovey ER, Roberts TH. Peanut protein extraction conditions strongly influence yield of allergens Ara h 1 and 2 and sensitivity of immunoassays. **Food Chemistry**, v. 221, p. 335–344, 2017.

Xiong H, Dolpady J, Wabl M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 2, p. 353–364, 2012.