

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Marcos Felipe Andrade de Oliveira

AVERSÃO E PREFERÊNCIA AO SABOR: mecanismos de proteção e dessensibilização na
alergia alimentar ao amendoim

Belo Horizonte
2025

Marcos Felipe Andrade de Oliveira

AVERSÃO E PREFERÊNCIA AO SABOR: mecanismos de proteção e dessensibilização na
alergia alimentar ao amendoim

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Coorientadora: Denise Carmona Cara

Belo Horizonte
2025

043

Oliveira, Marcos Felipe Andrade de.

Aversão e preferência ao sabor: mecanismos de proteção e dessensibilização na alergia alimentar ao amendoim [manuscrito] / Marcos Felipe Andrade de Oliveira. – 2025.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

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

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Hipersensibilidade a Amendoim. 3. Imunoglobulina E. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Machado, Denise Carmona Cara. 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 TESE DE DOUTORADO DE MARCOS FELIPE ANDRADE DE OLIVEIRA. Aos vinte dias do mês de agosto de 2025 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Aversão e preferência ao sabor: Mecanismos de Proteção e Dessensibilização na Alergia Alimentar ao Amendoim", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: 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: Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Momtchilo Russo (Universidade de São Paulo), aprovado; Dra. Denise Moraes da Fonseca (Universidade de São Paulo), aprovado; Dr. Alexandre Salgado Basso (Universidade Federal de São Paulo), aprovado; Dra. Denise Carmona Cara Machado - 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, 20 de agosto de 2025.

Documento assinado digitalmente
 HELTON DA COSTA SANTIAGO
 Data: 21/08/2025 16:14:43-0300
 verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Documento assinado digitalmente
 DENISE MORAIS DA FONSECA
 Data: 20/08/2025 20:29:25-0300
 verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 MONTCHILLO RUSSO
 Data: 21/08/2025 14:15:32-0300
 verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Momtchilo Russo (USP)

Dra. Denise Moraes da Fonseca (USP)


Documento assinado digitalmente
 ALEXANDRE SALGADO BASSO
 Data: 21/08/2025 15:02:11-0300
 verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Alexandre Salgado Basso (UNIFESP)

Documento assinado digitalmente
 DENISE CARMONA CARA MACHADO
 Data: 21/08/2025 17:56:43-0300
 verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Denise Carmona Cara Machado - Coorientadora (UFMG)

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

Documento assinado digitalmente
 ANA MARIA CAETANO DE FARIA
 Data: 20/08/2025 17:12:19-0300
 verifique em <https://validar.iti.gov.br>

RESUMO

A aversão ao consumo do alimento alergênico expressa um comportamento de ansiedade, a partir do qual se evita o contato com o antígeno para evitar as consequências da resposta imune alérgica. Esse fenômeno se inicia com a ligação do antígeno à IgE na membrana de mastócitos, os quais degranulam e liberam leucotrienos capazes de induzir a produção de GDF-15, uma citocina que indiretamente induz a ativação do núcleo central da amígdala no cérebro. A aversão está bem descrita no modelo experimental de alergia à ovalbumina (OVA), mas ainda não é claro se esse fenômeno ocorre nas demais alergias alimentares. Levando em consideração a importância clínica e epidemiológica da alergia ao amendoim, este estudo teve como objetivo investigar a aversão alimentar em um modelo experimental de alergia ao amendoim, assim como as consequências imunológicas de diferentes níveis de aversão para os camundongos sensibilizados. Em um teste de preferência logo após serem sensibilizados com um extrato proteico de amendoim (EPA), camundongos BALB/c e C57BL/6 preferem ingerir um extrato total de amendoim a 3% (ETA 3%) à água, a despeito da ativação de mastócitos. No entanto, após serem desafiados exclusivamente com ETA 3% por quatorze dias, camundongos BALB/c, mas não C57BL/6, passam a apresentar aversão ao ETA 3% em teste de preferência. Essa aversão coincidiu com maiores níveis séricos de IgE total, IgE anti-EPA, MCPT-1 e GDF-15, assim como maior ativação da amígdala. Porém, a aversão foi subvertida pelo aumento da concentração do ETA de 3% para 10%, mostrando que, nesse contexto, a aversão pode ser moldável mediante o aumento do valor hedônico da solução antigênica. A partir disso, pensou-se que, em um contexto de baixa aversão, há uma exposição crônica ao antígeno, o que leva a um processo de dessensibilização. Camundongos BALB/c foram sensibilizados com OVA ou Ara h 1, um dos principais alérgenos do amendoim. Durante três semanas de desafio oral, metade dos animais de cada grupo pode escolher entre beber água ou a solução antigênica: solução de clara de ovo 20% com 8% de sacarose (SCO 20%) ou ETA 10%, respectivamente. A outra metade só teve a opção de beber a solução antigênica. Na alergia ao ovo, quando a água estava disponível, os camundongos sensibilizados rejeitaram a SCO 20% e, portanto, foram protegidos da inflamação. No entanto, ao contrário do outro grupo, os camundongos não apresentaram queda na produção de IgE anti-OVA e tiveram uma reação anafilática cutânea mais grave quando desafiados. Por outro lado, a presença da água não fez com que os camundongos sensibilizados ao Ara h 1 deixassem de ingerir o ETA 10%, a despeito da inflamação. Ao final, ambos os grupos apresentaram queda na produção de IgE anti-Ara h 1. Porém, apenas o grupo que ingeriu exclusivamente ETA 10% apresentou reação anafilática cutânea leve quando desafiado. Assim, camundongos sensibilizados com antígenos do amendoim apresentam uma aversão moldável, a despeito da ativação de mastócitos, e escolhem manter o amendoim na sua dieta a longo prazo, o que pode eventualmente levar a um processo de dessensibilização.

Palavras-chave: alergia; IgE; aversão

ABSTRACT

Aversion to the allergenic food expresses an anxiety-like behavior, through which contact with the antigen is avoided to avoid the consequences of the allergic immune response. This phenomenon begins with the binding of the antigen to IgE-bound mast cells, which degranulate and release leukotrienes capable of inducing the production of GDF-15, a cytokine that indirectly activates the central nucleus of amygdala in the brain. Aversion is well described in the experimental model of allergy to ovalbumin (OVA), but it is still unclear whether this phenomenon occurs in other food allergies. Considering the clinical and epidemiological importance of peanut allergy, this study aimed to investigate food aversion in an experimental model of peanut allergy, as well as the immunological consequences of different levels of aversion in sensitized mice. In a preference test immediately after being sensitized with peanut protein extract (PPE), BALB/c and C57BL/6 mice preferred to ingest 3% whole peanut extract (3% WPE) than water, despite mast cell activation. However, after being challenged exclusively with 3% ETA for fourteen days, BALB/c, but not C57BL/6 mice, began to show aversion to 3% ETA in a preference test. This aversion coincided with higher serum levels of total IgE, anti-EPA IgE, MCPT-1, and GDF-15, as well as greater activation of the central nucleus of the amygdala. The aversion was reversed by increasing the ETA concentration from 3% to 10%, demonstrating that, in this context, aversion can be malleable due to an increase in the hedonic value of the antigenic solution. Based on these data, we tested the hypothesis that, in a context of low aversion, there is chronic exposure to the antigen that leads to a desensitization process. BALB/c mice were sensitized with OVA or Ara h 1, a major peanut allergen. During three weeks of oral challenge, half of the animals in each group could choose between drinking water or the antigenic solution: 20% egg white solution with 8% sucrose (20% SCO) or 10% ETA, respectively. The other half only had the option of drinking the antigenic solution. In the egg allergy group, when water was available, the sensitized mice rejected the 20% SCO and were therefore protected from inflammation. However, unlike the other group, the mice did not show a decrease in anti-OVA IgE production (desensitization) and had a more severe cutaneous anaphylactic reaction when challenged. On the other hand, the presence of water did not prevent the mice sensitized to Ara h 1 from ingesting the solution containing 10% ETA, despite the inflammation. Ultimately, both groups showed a decrease in anti-Ara h 1 IgE production. However, only the group that ingested exclusively ETA 10% presented a mild cutaneous anaphylactic reaction when challenged. Thus, mice sensitized to peanut antigens exhibit a malleable aversion despite mast cell activation, and choose to keep peanut in their diet in the long term, which might eventually lead to desensitization.

Keywords: allergy; IgE; aversion

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estratégia de análise das populações de linfócitos Th2 e Treg..... | 34 |
| Figura 2. A ingestão de ETA 3% por camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados leva à produção de IgE capaz de ativar mastócitos..... | 37 |
| Figura 3. Camundongos BALB/c e C57BL/6 não apresentam aversão a extratos de amendoim logo após serem sensibilizados..... | 40 |
| Figura 4. Camundongos BALB/c, mas não C57BL/6, sensibilizados apresentam aversão ao ETA após o desafio oral. | 44 |
| Figura 5 A ingestão de ETA 3% por camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados leva a alterações comportamentais..... | 47 |
| Figura 6. A sensibilização com baixa dose de OVA leva ao maior nível de aversão, e a adição de 8% de sacarose torna a SCO altamente palatável.. | 49 |
| Figura 7. A aversão impede o contato crônico com o antígeno e, conseqüentemente, a dessensibilização. | 52 |
| Figura 8. A dessensibilização à OVA mediante a ingestão crônica de SCO tem alto custo fisiológico e não é duradoura.. | 54 |
| Figura 9. A ausência de aversão contribui para o contato crônico com o antígeno, favorecendo o processo de dessensibilização..... | 58 |
| Figura 10. A dessensibilização ao Ara h 1 mediante a ingestão crônica de ETA não tem alto custo fisiológico, mas leva a alterações comportamentais. | 60 |
| Figura 11. Camundongos sensibilizados à OVA apresentam maior ativação de mastócitos do que camundongos sensibilizados ao Ara h 1..... | 62 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 Interações neuro-imunes na mucosa intestinal | 11 |
| 1.2 Alimentos enquanto fonte de prazer e desprazer..... | 13 |
| 1.3 Aversão ao alimento em modelos murinos de alergia alimentar..... | 16 |
| 1.4 Dessensibilização mediante o contato crônico com o antígeno | 18 |
| 2. OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Objetivo Geral | 22 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 22 |
| 3. METODOLOGIA..... | 23 |
| 3.1 Animais..... | 23 |
| 3.2 Extrato Proteico de Amendoim | 23 |
| 3.3 Extrato Total de Amendoim | 23 |
| 3.4 Desenho Experimental..... | 23 |
| 3.4.1 Indução de Alergia Alimentar ao Amendoim..... | 24 |
| 3.4.2 Indução de Alergia Alimentar ao Ovo..... | 24 |
| 3.4.3 Comparação entre alergia alimentar ao ovo e ao amendoim..... | 25 |
| 3.4.4 Monitoramento do peso corporal e da ingestão da solução antigênica durante o desafio oral..... | 25 |
| 3.5 Teste de Preferência..... | 26 |
| 3.6 Medida dos níveis de Imunoglobulinas Séricas | 26 |
| 3.6.1 Medida de IgG1 anti-EPA, Ara h 1 ou OVA | 26 |
| 3.6.2 Medida de IgG2a anti-Ara h 1 ou OVA | 27 |
| 3.6.3 Medida dos níveis de IgE Total..... | 27 |
| 3.6.4 Medida dos níveis de IgE anti-EPA ou OVA..... | 28 |
| 3.6.5 Medida de IgE anti-Ara h 1 | 29 |
| 3.7 Medida dos níveis de MCPT-1 Sérico..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.8 Medida dos níveis GDF-15 Sérico | 30 |
| 3.9 Anafilaxia Cutânea Ativa e Passiva..... | 30 |
| 3.10 Teste Comportamental do Campo Aberto | 31 |
| 3.11 Imunohistoquímica do Cérebro | 31 |
| 3.12 Análise fenotípica por Citometria de Fluxo | 33 |
| 3.12.1 Extração de células dos pmLN | 33 |
| 3.12.2 Marcação das células dos pmLN | 33 |
| 3.13 Análise Estatística | 34 |
| 4. RESULTADOS | 36 |
| 4.1 Camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados e desafiados com proteínas do amendoim produziram IgE específica capaz de degranular mastócitos | 36 |
| 4.2 Camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados não apresentaram aversão ao consumo de ETA 3%, a despeito da ativação de mastócitos | 38 |
| 4.3 Após o desafio oral, camundongos sensibilizados da linhagem BALB/c, mas não C57BL/6, apresentam aversão ao ETA | 42 |
| 4.4 Após o desafio oral, os camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentam alterações comportamentais..... | 46 |
| 4.5 A aversão alimentar é uma barreira para a dessensibilização voluntária | 48 |
| 4.6 Apesar do benefício da dessensibilização, a exposição crônica ao antígeno no contexto de alta aversão tem elevado custo fisiológico e não é duradoura..... | 53 |
| 4.7 A ausência de aversão possibilita a dessensibilização espontânea | 55 |
| 4.8 A exposição crônica ao antígeno num contexto de ausência de aversão não está associada a um elevado custo fisiológico, mas gera alterações comportamentais | 59 |
| 4.9 O alto nível de aversão e o impacto da exposição ao antígeno no modelo de alergia à OVA pode estar relacionado a maior ativação de mastócitos..... | 61 |
| 5. DISCUSSÃO | 64 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 75 |
| 7. REFERÊNCIAS | 76 |

1. INTRODUÇÃO

As alergias alimentares são um tipo de doença caracterizada por reações inflamatórias a antígenos presentes em alimentos. Reações alérgicas já foram associadas a mais de cem alimentos, mas apenas oito deles estão relacionados à maioria dos casos de alergia, incluindo leite, ovo, amendoim, outras oleaginosas, peixes, crustáceos, soja e sementes de gergelim (Sampson, 2016). As tentativas de investigar os aspectos que conferem alergenicidade 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).

Os eventos imunológicos que desencadeiam as alergias alimentares se iniciam com a sensibilização. Nessa fase, o contato inicial de determinada proteína alergênica com o organismo leva à indução de uma resposta efetora em detrimento de uma resposta tolerogênica. Isso provavelmente se deve a alterações no microambiente que favorecem um estado mais ativado de células apresentadoras de antígeno (APC), particularmente as células dendríticas. Alta produção de alarminas (IL-25, IL-33 e TSLP) que levam à expressão de citocinas do tipo 2, ativação exacerbada de receptores de reconhecimento padrão, assim como características intrínsecas de proteínas alergênicas, podem induzir a expressão de moléculas co-estimuladoras em APC (OX40L e MHC II, por exemplo) (Chinthrajah et al., 2016; Tordesillas et al., 2017). Assim, ao apresentar os antígenos para linfócitos T naive nos linfonodos drenantes, as APC induzem a diferenciação de linfócitos Th2. Nesse mesmo contexto, linfócitos Tfh produtores de IL-4 e IL-13, diferenciados alternativamente à indução de linfócitos T reguladores, induzem linfócitos B nos centros germinativos dos órgãos linfoides a produzirem IgG1 e IgE, a principal molécula efetora das alergias alimentares (Kobayashi et al., 2017; Gowthaman et al., 2019). Esses eventos são clinicamente silenciosos e culminam na ligação de IgE com seu receptor FcεRI expresso na superfície de basófilos e mastócitos, selando a sensibilização.

Em um contato posterior com o mesmo alimento alergênico, a ligação de antígenos com mais de uma molécula de IgE na superfície de mastócitos (ligação cruzada) leva a uma cascata de fosforilação que ativa diversas quinases, como PLC, ERK, JNK e PKC, culminando no aumento de cálcio intracelular e na translocação de fatores de transcrição para o núcleo, como NFκB e 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, entre outras) (Siraganian et al., 2010). Ao degranular, os mastócitos liberam diversos mediadores inflamatórios pré-formados (proteases, histamina, proteoglicanos, etc.), assim como mediadores inflamatórios produzidos *de novo* (como leucotrienos, proteoglicanos, PAF – fator de ativação plaquetária, entre outros) (Albert-Bayo et al., 2019). Essas moléculas ativam uma gama de eventos, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa, que causam os sintomas clássicos das alergias alimentares: angioedema, urticária, rinite, desconforto abdominal, diarreia, vômito, entre outros (Renz et al., 2018). Em casos mais graves, as reações alérgicas podem afetar drasticamente a função pulmonar e cardiovascular, levando a um quadro de anafilaxia.

1.1 Interações neuro-imunes na mucosa intestinal

O intestino possui uma área estimada em 32m², proporcionando ao corpo a maior área de contato com o meio externo (Helander; Fandriks, 2014). Logo, esse órgão interage com uma gama de antígenos provenientes da dieta e da microbiota intestinal, e conseqüentemente está associado ao maior tecido linfoide secundário do corpo (GALT - do inglês, *gut associated lymphoid tissue*). Devido a essa interação, o GALT está em constante desenvolvimento de respostas imunes tolerogênicas que evitam reações inflamatórias para antígenos dietéticos e microbianos inócuos, ao passo que desenvolve respostas imunes efetoras que controlam o crescimento de bactérias no lúmen e previnem sua translocação para outras partes do corpo (Esterházy et al., 2019). Logo, essa dicotomia da atividade imunológica na mucosa intestinal é finamente regulada, de forma a garantir a integridade do órgão e contribuir para o bom funcionamento de suas atividades fisiológicas.

Além do GALT, o intestino possui o maior tecido nervoso periférico do corpo, conhecido como ENS (do inglês, *enteric nervous system*) (Veigas-Fernandes e Mucida, 2016). O ENS é composto por dois plexos ganglionados, mioentérico e submucoso, que

estão localizados nas camadas muscular e submucosa do intestino, respectivamente (Wang et al., 2021). Ambos possuem milhares de neurônios que se conectam a uma variedade de células intestinais, regulando a contração da musculatura lisa, a dilatação de vasos sanguíneos, a secreção de glândulas e a função de células epiteliais endócrinas e imunes (Rao e Gershon, 2016). Além disso, o intestino também é inervado pelo sistema nervoso parassimpático, através do nervo vago e de fibras nervosas da porção sacral da medula espinhal, assim como pelo sistema nervoso simpático (Wang et al., 2021), os quais também influenciam a função intestinal muitas vezes através da modulação do ENS. Logo, pode-se perceber que o intestino é o órgão onde os maiores tecidos linfóide e nervoso periférico se encontram, evidenciando a alta interação local entre esses dois sistemas.

Interações entre neurônios e células do sistema imune têm sido descritas tanto para linfócitos quanto para células da imunidade inata. Os neuropeptídeos neurocinina A e substância P (SP), assim como a IL-6 derivada de neurônios, podem inibir a diferenciação de linfócitos Treg na mucosa intestinal (Yissachar et al., 2017). Além disso, linfócitos T expressam o receptor muscarínico M3, o qual se liga à acetilcolina (ACh) e é essencial para a função dessas células em infecções intestinais (Darby et al., 2015). Assim como os linfócitos T, os linfócitos B também podem interagir com os neurônios. O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) pode induzir linfócitos B a produzirem IgA, a imunoglobulina mais abundante na mucosa intestinal (Mora e Andrian, 2008). Curiosamente, anticorpos reativos a neurônios entéricos podem mediar as alterações na motilidade intestinal em camundongos com encefalomielite autoimune (Spear et al., 2018). Logo, existe uma influência mútua da atividade neuronal e imune adaptativa no intestino.

Células imunes inatas da mucosa intestinal localizam-se próximas a terminações nervosas, indicando uma estreita relação entre esses compartimentos. Neurônios do plexo mioentérico produzem o fator estimulador de colônia 1 (CSF1), o qual promove a sobrevivência de macrófagos adjacentes (Muller et al., 2014). Da mesma maneira, esses macrófagos ativam os neurônios do plexo mioentérico através da produção de BMP-2, regulando a motilidade intestinal (Muller et al., 2014). Em relação a células linfóides inatas (ILC), as ILC2 estão próximas a neurônios produtores de neuromedina U e noradrenalina, os quais ativam ou inibem, respectivamente, a função anti-parasitária dessas células (Cardoso et al., 2017; Moriyama et al., 2018). As ILC3, fundamentais para a integridade da barreira intestinal, são altamente influenciadas pela ação do VIP e do

GDNF (fator neurotrófico derivado da glia), os quais parecem inibir ou ativar, respectivamente, a produção de IL-22 por essas células (Talbot et al., 2020; Ibiza et al., 2016).

Os mastócitos se localizam próximos a neurônios sensoriais da mucosa intestinal. Essas células nervosas produzem uma variedade de neuropeptídeos, como SP, VIP, CGRP e CRH, que podem modular a atividade de mastócitos (Jacobson et al., 2021). Os neurônios sensoriais, por sua vez, possuem receptores para os mediadores inflamatórios secretados por mastócitos ativados, podendo diminuir o limiar para o disparo de potencial de ação nessas células nervosas (Jacobson et al., 2021; Veigas-Fernandes e Mucida, 2016). Em convergência com essas observações, a interação entre mastócitos e neurônios se associa ao desenvolvimento de dor em quadros de síndrome do intestino irritado e alergia alimentar (Jacobson et al., 2021).

Curiosamente, a prevalência de ansiedade em indivíduos com alergia alimentar é maior do que em indivíduos não alérgicos, sejam eles adultos, adolescentes ou crianças (Castro et al., 2010). Essa associação é evidenciada em modelos murinos de alergia alimentar, nos quais a indução da doença se relaciona a alterações comportamentais indicativas de ansiedade e depressão (Germundson et al., 2018; Germundson et al., 2020). Nesse contexto, além da mucosa intestinal, os mastócitos estão ativados e em maior número em algumas regiões cerebrais, onde também se observou maior expressão do receptor histaminérgico H3. Logo, esses dados evidenciam que as interações neuro-imunes iniciadas na mucosa intestinal durante reações alérgicas podem afetar o sistema nervoso central e, conseqüentemente, desencadear alterações de humor e comportamento.

1.2 Alimentos enquanto fonte de prazer e desprazer

O ato de comer está intimamente ligado ao suprimento das necessidades energéticas e às características que conferem valor hedônico ao alimento. Logo, tanto o conteúdo nutritivo, quanto as propriedades sensoriais do alimento, podem gerar prazer mediante o seu consumo. Isso é bem exemplificado em estudos nos quais a adição de sabor doce, com ou sem valor nutritivo, tem a capacidade de gerar preferência por determinada solução ou alimento, tanto em ratos quanto em camundongos de diferentes linhagens (Beeler et al., 2012; Pinhas et al., 2011; Sclafani e Ackroff, 2015; Sclafani e Ackroff, 2017). Apesar de o sabor possuir efeito importante nesses cenários, o valor

energético parece ser o fator crucial, uma vez que sacarose induz preferência mais robusta do que adoçantes, ainda que mediante a incapacidade de sentir o sabor doce (Beeler et al., 2012; Sclafani e Ackroff, 2015). No entanto, metil- α -D-glucopiranosídeo, um açúcar não metabolizável, também é capaz de induzir preferência, mostrando um efeito direto da molécula de açúcar além dos metabólitos e das calorias provenientes dela (Zukerman et al., 2013).

Esses efeitos estão associados à ativação de áreas cerebrais relacionadas ao sistema mesolímbico, o qual é responsável pelo processamento de experiências positivas que geram algum tipo de recompensa (Lewis et al., 2021). Esse sistema tem íntima ligação com a produção de dopamina por neurônios da Área Tegmentar Ventral (ATV), os quais fazem projeções para o Estriado, Córtex Pré-frontal e outras áreas cerebrais. A parte ventral do Estriado abriga o Núcleo Accumbens (NAc), o qual se destaca nesse circuito neural que coordena motivação e comportamentos em direção à recompensa (Lewis et al., 2021; Baik, 2021).

Assim, diversos estudos mostraram ativação do NAc mediante o consumo de alimentos palatáveis. O consumo de *pellets* de ração adoçada com sacarose leva a uma liberação expressiva de dopamina no NAc (Beeler et al., 2012). Em um cenário semelhante, a exposição de camundongos a uma ração com sabor de chocolate e alta concentração de sacarose leva a alterações morfológicas em neurônios do NAc condizentes com alta ativação do sistema recompensa (Montalban et al., 2024). Por fim, a oferta intermitente de uma dieta rica em lipídeos e sacarose leva ao aumento da expressão gênica do receptor de dopamina do tipo 1 (DR1) no estriado, assim como mudanças comportamentais condizentes com comportamento do tipo compulsivo (Júnior et al., 2025). Esses efeitos não são restritos a roedores, uma vez que mudanças similares associadas à exposição a alimentos altamente palatáveis são observadas em humanos (Lewis et al., 2021; Baik, 2021).

Nesses contextos, os sinais que ativam o sistema mesolímbico envolvem hormônios ligados ao controle da ingestão alimentar e a ativação de circuitos neurais que se iniciam na mucosa do trato gastrointestinal. A grelina, hormônio orexígeno produzido principalmente no estômago, pode ativar neurônios na ATV e levar ao aumento de dopamina no NAc, culminando no consumo hedônico de alimentos (Egecioglu et al., 2010; Jerlhag et al., 2012). A colocistoquinina (CCK), hormônio importante para a

digestão e regulação do apetite, também pode levar ao aumento de dopamina no estriado (Han et al., 2018). Além disso, a ativação de células enteroendócrinas produtoras de colicistocinina (CCK) mediante ingestão de uma substância de sabor neutro é capaz de induzir preferência condicionada, e esse efeito é anulado por um antagonista do receptor de CCK (Bai et al., 2022). Além desses efeitos hormonais, Han et al. (2018) mostraram que a ativação optogenética do gânglio nodoso direito do nervo vago que inerva a porção proximal do intestino leva à liberação de dopamina no estriado e, conseqüentemente, é capaz de induzir preferência condicionada a uma solução insípida. Tan et al. (2020) confirmaram esse achado ao ofertar glicose para camundongos e, além disso, identificaram o transportador de glicose SLGT-1 como essencial para a ativação desse circuito neural que medeia a preferência ao açúcar.

Se os alimentos podem ser fonte de prazer, eles também podem carrear substâncias nocivas ao organismo e, assim, desencadear efeitos adversos como náusea e desconforto gastrointestinal (Lin et al., 2017). A associação do mal-estar (estímulo incondicionado) com as características sensoriais do alimento (estímulo condicionado) leva ao fenômeno da aversão condicionada ao sabor (CTA) (Lin et al., 2017). Nesse sentido, evita-se os malefícios causados pela substância nociva a partir da rejeição do alimento que evoca o sabor memorado. Em experimentos com roedores, CTA é bem mimetizado ao associar a ingestão de uma solução palatável com injeções intraperitoneais de cloreto de lítio (LiCl), o qual causa mal-estar abdominal, hipotermia, diminuição da frequência cardíaca e alterações comportamentais (Ingram, 1982; Meachum e Bernstein, 1990; Chambers, 2018). Esse efeito está ligado à ativação da insula e, conseqüentemente, da região basolateral da amígdala (Kayyal et al., 2019). Além de LiCl, diversas outras substâncias como feniltiocarbamida, ciclofosfamida e sulfato de cobre induzem o mesmo condicionamento (St Jhon et al., 2005; Smith e Theodore; 1984; Coil e Norgren, 1981). Atendo-se à mucosa intestinal, a ativação de células enteroendócrinas e enterocromafins produtoras de serotonina e substância P parecem ter íntima ligação com o desenvolvimento de CTA (Bai et al., 2022).

Sendo assim, os sinais periféricos após a ingestão de determinado alimento são percebidos, integrados e memorados no sistema nervoso central. A partir disso, atribui-se valência positiva ou negativa à experiência da ingestão do alimento, o que molda escolhas alimentares futuras.

1.3 Aversão ao alimento em modelos murinos de alergia alimentar

Sabendo-se que a mucosa intestinal é um ambiente de vasta interação neuroimune e de assimilação de sinais que convergem em aceitação ou rejeição de alimentos, como se dá a relação de camundongos alérgicos com o alimento para o qual estão sensibilizados?

Em um estudo pioneiro da década de 1990, Cara et al. (1994) mostraram que mediante a possibilidade de ingerir água ou uma solução de clara de ovo (20%) adocicada, os camundongos preferem ingerir a solução com sabor doce. No entanto, se esses animais forem previamente sensibilizados com ovalbumina (OVA), constituinte da clara de ovo, há um desvio na preferência natural dos camundongos, os quais passam a apresentar uma maior ingestão de água e uma redução drástica no consumo da solução de clara de ovo adocicada. Isso foi interpretado como uma aversão ao sabor induzida pelo sistema imune, a qual se relacionou à produção de anticorpos reativos à OVA, visto que camundongos sensibilizados com uma proteína ausente na clara de ovo não apresentaram o comportamento aversivo.

Após três anos, os mesmos autores mostraram que a transferência adotiva de esplenócitos de camundongos sensibilizados com OVA pôde induzir a aversão ao sabor em camundongos naive (Cara et al., 1997), comprovando que esse fenômeno está intimamente ligado à memória imunológica. Esses dados, somados à observação da presença de anticorpos específicos, apontaram para um papel chave de linfócitos B nesse fenômeno. Assim, estudos subsequentes mostraram que a produção de IgE é fundamental para a concretização da aversão ao sabor. Camundongos tratados com anticorpo anti-IgE, assim como camundongos *knockout* para IgE, FcεRI ou IL-4, não desenvolvem comportamento aversivo após terem sido sensibilizados (Basso et al., 2003; Dourado et al., 2010; Florsheim et al., 2023). Logo, a indispensabilidade de anticorpos do tipo IgE e sua forte interação com mastócitos, abundantes na mucosa intestinal, apontou essa célula como a mediadora da aversão ao sabor na alergia alimentar.

De fato, a depleção de mastócitos e o bloqueio da degranulação dessas células inibem o comportamento aversivo de camundongos sensibilizados (Costa-Pinto et al., 2006; Florsheim et al., 2023). Logo, os mediadores inflamatórios secretados por mastócitos são fundamentais nesse processo. Abordagens farmacêuticas para inviabilizar

a sinalização de histamina, serotonina, assim como a função de proteases, não foram capazes de impedir o desenvolvimento da aversão ao sabor (Cara et al., 1997; Florsheim et al., 2023). No entanto, o bloqueio da produção de leucotrienos, secretados por mastócitos ativados, foi capaz de reverter o comportamento aversivo de animais sensibilizados à OVA (Florsheim et al., 2023; Plum et al., 2023). A partir de diferentes abordagens experimentais, mostrou-se que os leucotrienos podem induzir células epiteliais EPCAM⁺ a produzirem GDF15 (do inglês, *growth and differentiation factor 15*). Através da corrente sanguínea, essa citocina pode alcançar o cérebro e ativar o núcleo do trato solitário (NTS) e a área postrema (AP), culminando na ativação do núcleo parabraquial (lpPBN) e da região central da amígdala (CeA), a qual está intimamente relacionada ao estresse e à ansiedade. Os dados desse estudo corroboram achados anteriores mostrando que camundongos aversivos à solução de clara de ovo (20%) apresentam maior ativação neuronal no CeA (Basso et al., 2003). Assim, esse circuito neural foi proposto como a base para o comportamento aversivo no contexto da alergia alimentar.

Mediante as observações em torno da aversão ao sabor em camundongos sensibilizados à OVA, Florsheim et al. (2021) sugerem que o significado biológico desse fenômeno é a limitação do contato do organismo com substâncias tóxicas presentes nos alimentos, sejam elas de origem proteica (alérgenos) ou não. Em caso de substâncias tóxicas não proteicas incapazes de serem detectadas por células nervosas ou epiteliais da mucosa, o sistema imune marcaria proteínas do alimento veículo, via IgE-mastócito, para indiretamente associar a substância tóxica aos seus efeitos deletérios através de um mecanismo análogo ao condicionamento pavloviano (Florsheim et al., 2021). Logo, a aversão faria parte de um “Sistema de Controle de Qualidade de Alimentos”, para que o organismo seja protegido de efeitos nocivos ao seu funcionamento.

Apesar de essa hipótese ser altamente plausível, tendo sido formulada a partir de uma profunda análise crítica, ela parece não se aplicar a todo contexto de sensibilização a proteínas alimentares. No nosso laboratório, mostrou-se que camundongos sensibilizados com β -lactoglobulina (BLG), proteína constituinte do soro do leite, não desviam sua preferência por uma solução de *whey protein* (20%) em direção à água, mesmo na presença de IgE específica (Lemos et al., 2022). Além disso, a clássica aversão ao sabor no modelo de sensibilização à OVA é modulada pela adição de BLG à solução antigênica. Esses efeitos parecem estar relacionados à ativação de neurônios no núcleo

accumbens (NAc), intimamente ligado ao sistema recompensa. Logo, esses cenários sugerem um conflito entre estímulos de recompensa e aversão, onde os camundongos insistem em ingerir o líquido contendo a proteína alergênica pelo que parece ser uma busca por prazer. Sendo assim, os dados do estudo de Lemos et al. (2022) mostram que nem sempre a percepção do alérgeno na mucosa intestinal leva à aversão ao sabor.

Além do ovo e do leite, o amendoim é um outro tipo de alimento relacionado a alergias alimentares. Nele, já foram descritas pelo menos 16 proteínas alergênicas (Palladino; Breiteneder, 2018). A resistência à degradação química e enzimática, assim como a capacidade intrínseca de ativar células dendríticas, evidenciam o potencial alergênico do amendoim (Apostolovic et al., 2016; Chu et al., 2013; Shreffler et al., 2006). Além disso, as reações alérgicas a esse alimento são frequentemente associadas a sintomas graves (Ma et al., 2014; Sampson, 2016). No entanto, do ponto de vista nutricional e sensorial, o amendoim é um alimento rico, pois possui alto teor de proteínas, vitaminas e minerais, além de ser palatável devido ao seu teor lipídico. Logo, seria interessante investigar se camundongos sensibilizados ao amendoim apresentam aversão alimentar.

1.4 Dessensibilização mediante o contato crônico com o antígeno

No contexto da alergia alimentar, a aversão é entendida como um mecanismo protetor, pois a exposição ao antígeno aciona os mecanismos patogênicos da doença. Logo, o contato com o antígeno é ruim. Porém, no início do século XX, Schofield (1908) relatou a dessensibilização de um adolescente alérgico ao ovo a partir de um feito contraintuitivo: expondo o garoto diariamente a pílulas de ovo cru por sete meses. Antes do tratamento, o garoto apresentava urticária, inchaço e falta de ar mediante exposição a pequenas quantidades de ovo. Após o tratamento, ele foi capaz de comer um ovo por dia e, assim, incluí-lo em sua alimentação diária. Ainda nas primeiras décadas do século XX, outros relatos similares surgiram na literatura (Patriarca et al., 2003). Eles se tornaram a base para que, na década de 1980, um dos primeiros protocolos de dessensibilização por via oral fossem publicados (Patriarca et al., 1984). Com isso, a imunoterapia oral (OIT), abordagem terapêutica para o tratamento de alergias por via oral, tornou-se um campo promissor para a investigação científica e aplicação clínica. Sendo assim, a depender da maneira, o contato com o antígeno pode gerar benefícios para indivíduos com alergia alimentar.

De forma geral, os protocolos de OIT iniciam-se com uma fase de escalonamento, na qual oferta-se microgramas do alérgeno e, em um ou dois dias, aumenta-se para alguns miligramas. Em seguida, há um incremento na dose com intervalos semanais, durante três a nove meses, até que se atinja a dose de manutenção (variando de 300 a 4000mg) (Wood, 2017). Essa dose final é mantida por meses a anos, dependendo do protocolo. Resultados bem-sucedidos foram relatados para diversos tipos de alergia alimentar, como ao ovo, leite e amendoim. Em um estudo randomizado, cinquenta indivíduos alérgicos ao ovo foram submetidos à OIT com uma dose de manutenção de 1g de proteína de clara de ovo. Com base em teste de desafio oral, 44% e 72% dos participantes dessensibilizaram após 8 e 18 meses de OIT, respectivamente (Palosuo et al., 2021). Em outro estudo com indivíduos alérgicos ao leite de vaca, a quantidade média de proteína para desencadear reação alérgica aumentou de 40mg para 5140mg após OIT, evidenciando uma dessensibilização (Skripak et al., 2008). Por fim, em um grande estudo envolvendo mais de quinhentos participantes com alergia ao amendoim, 67,2% daqueles tratados com 300mg de proteína de amendoim por seis meses foram capazes de passar pelo teste de desafio oral com uma dose de 600mg ou mais, sem sintomas (Vickery et al., 2018). Esse estudo foi essencial para o desenvolvimento da PALFORZIA, a primeira e única OIT aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para alergia ao amendoim (Purswani e Kim, 2022).

Os níveis iniciais de IgE específica relacionam-se à capacidade de atingir a dose de manutenção e o sucesso da OIT (Cohen et al., 2022; Ashley et al., 2024). Durante o tratamento, pode ocorrer um aumento transiente nos níveis de IgE e de linfócitos B de memória com mutações que indicam maturação de afinidade (Nozawa et al., 2014; Patil et al., 2015). No entanto, para aqueles que conseguem completar a OIT, é comum haver diminuição dos níveis de IgE específica (Sugimoto et al., 2016; Dana et al., 2022). Por ser um anticorpo com papel central na patologia das alergias alimentares, essa diminuição parece, de fato, ser desejável e importante para a dessensibilização. Porém, esse efeito não é consistente em todos os estudos (Skripak et al., 2008; Santos et al., 2020).

Diferentemente da IgE, os níveis dos anticorpos do tipo IgG aumentam em resposta à OIT. Esse efeito é observado principalmente para IgG4, mas aumento nos níveis de IgG1, IgG2 e IgG3 já foram relatados (Nozawa et al., 2014; Savilahti et al., 2014; Sugimoto et al., 2016). Anticorpos do tipo IgG4 podem ser neutralizantes e, assim, interferem com a interação entre o alérgeno e a IgE, limitando a ativação de mastócitos

(Keswani et al., 2024). Além disso, a menor ativação de basófilos tratados com soro de pacientes pós OIT é altamente dependente da fração de IgG e da disponibilidade do receptor inibitório FcγRIIb (Burton et al., 2014). Assim, a dessensibilização de pacientes pela OIT está intimamente ligada à modulação da resposta de anticorpos do tipo IgG, os quais diminuem a ativação de granulócitos mesmo na presença de níveis significativos de IgE com preservada capacidade de ativar mastócitos. É importante ressaltar que, além de IgG, o aumento dos níveis de IgA também se relaciona à eficácia da OIT (Sugimoto et al., 2016; Palosuo et al., 2021), a qual interfere com a cascata de sinalização do FcεRI e, assim, inibe a degranulação de mastócitos sensibilizados com IgE (El Ansari et al., 2022). Isso aponta para outra camada de regulação humoral da atividade da IgE após a OIT.

Além de linfócitos B, os linfócitos T também contribuem para o processo de dessensibilização. Em uma OIT para alergia ao amendoim, houve a indução de linfócitos T reguladores Foxp3⁺ antígeno específicos, os quais eram capazes de produzir altos níveis de IL-10 e de inibir a proliferação de linfócitos T efetores em resposta a proteínas do amendoim (Syed et al., 2014). O aumento da razão CD4⁺ CD25⁺ FoxP3^{high} : CD4⁺ CD25⁺ FoxP3^{intermediate} também parece importante, e essa maior expressão de FoxP3 pode estar relacionada a alterações epigenéticas que favorecem a expressão desse fator de transcrição (Varshney et al., 2011; Syed et al., 2014). Em relação a outras populações de linfócitos T CD4⁺, há uma diminuição na frequência de linfócitos antígeno-específicos com marcadores associados a resposta do tipo 2, como o OX40, e uma supressão na atividade de linfócitos Th2A e Th1 convencionais (Kaushik et al., 2022; Monian et al., 2022). Essas alterações são acompanhadas por diminuição na produção de citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Kaushik et al., 2022; Kulis et al., 2019).

Apesar de não esgotar os mecanismos por trás da dessensibilização, a modulação dos parâmetros discutidos até aqui está fortemente associada à efetividade e à duração dos benefícios da OIT. Além dos estudos em humanos, há vários trabalhos relatando a eficácia da OIT em camundongos sensibilizados para diferentes alérgenos da dieta, compartilhando mecanismos de modulação da resposta humoral e celular associada à alergia alimentar (Rupa e Wine, 2012; Vonk et al., 2017; Wagenaar et al., 2019).

Com base em tudo que foi exposto até aqui, decidiu-se investigar se ocorreria aversão no contexto da alergia alimentar ao amendoim e quais seriam as consequências imunológicas da presença ou ausência desse fenômeno para os camundongos

sensibilizados. A partir disso, formulou-se a hipótese de que os camundongos sensibilizados para os antígenos do amendoim não apresentariam aversão por ser este um alimento muito palatável. Se os animais voluntariamente continuassem a ingerir esse alimento em sua dieta, nossa outra hipótese é que, eventualmente, eles iriam se dessensibilizar devido à exposição crônica aos antígenos do amendoim.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar a aversão e a preferência ao sabor no contexto da alergia alimentar ao amendoim nas linhagens BALB/c e C57BL/6, assim como as consequências imunológicas desses comportamentos alimentares para os camundongos sensibilizados

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de IgE, a ativação de mastócitos e a produção de GDF-15 no modelo de alergia alimentar ao amendoim;
- Submeter os camundongos a um teste de preferência antes e após o desafio oral para avaliar a aversão alimentar na alergia a um extrato de amendoim;
- Avaliar a ativação neuronal na amígdala e no núcleo accumbens de camundongos sensibilizados e desafiados com um extrato de amendoim para correlacioná-la aos resultados do teste de preferência;
- Avaliar as alterações comportamentais dos camundongos sensibilizados e desafiados com um extrato de amendoim
- Utilizando os modelos de alergia alimentar ao ovo e ao amendoim, investigar o efeito da aversão e da preferência ao sabor na relação do animal sensibilizado com o alimento alergênico a longo prazo, e como isso interfere no seu estado de sensibilização;
- Comparar a gravidade da alergia alimentar ao ovo com a alergia alimentar ao amendoim.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Utilizou-se camundongos machos das linhagens C57BL/6 e BALB/c, assim como camundongos fêmea da linhagem BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas. Os camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Durante os períodos de aclimação e experimentação, os camundongos tiveram acesso à água filtrada e ração comercial *ad libitum*, salvo durante o teste de preferência e desafio oral, onde ofertou-se extrato de amendoim ou solução de clara de ovo aos grupos experimentais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 339/2019.

3.2 Extrato Proteico de Amendoim

O extrato proteico de amendoim (EPA) foi produzido como descrito anteriormente (Oliveira, 2021). Amendoim branco da marca Yoki foi triturado até formar uma farinha e, em seguida, desengordurado com hexano. A farinha de amendoim foi diluída e homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos em Tampão Tris 20mM pH 8,5 (1:30 - g/ml). Esse extrato foi filtrado em peneira e, em seguida, centrifugado a 100.000xg, por 1h a 4°C. Após a centrifugação, a suspensão do restante de lipídeos foi retirada para que o extrato proteico límpido fosse coletado. O EPA foi aliquoteado e armazenado a -80°C.

3.3 Extrato Total de Amendoim

Para fazer o extrato total de amendoim (ETA) ofertado em mamadeira aos camundongos, o amendoim foi triturado e homogeneizado em água potável (pH 8,5) na proporção de 1:30 (g/ml), gerando uma concentração de aproximadamente 3%. Em momentos específicos, utilizou-se uma concentração de 10%. Em seguida, o ETA foi filtrado em peneira e armazenado a 4°C por, no máximo, 48h.

3.4 Desenho Experimental

O protocolo experimental para indução de alergia alimentar utilizado neste trabalho baseou-se nos modelos previamente desenvolvidos pelo Laboratório de Imunobiologia e colaboradores. Nele, os animais são sensibilizados com o antígeno de

interesse adsorvido em hidróxido de alumínio. Em seguida, eles são desafiados com uma solução contendo o antígeno para o qual foram sensibilizados, ofertada em mamadeira. A partir dessa estrutura, ajustes podem ser feitos para que o protocolo se adeque à pergunta de interesse. Por isso, no presente estudo, utilizou-se os seguintes protocolos:

3.4.1 Indução de Alergia Alimentar ao Amendoim

Camundongos BALB/c e C57BL/6, machos, foram divididos em três grupos: Sensibilizado (Sens), Controle (Ctrl) e Naive. Os camundongos do grupo Sens receberam uma injeção subcutânea contendo 40µg de EPA na presença de 3mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), diluídos em volume final de 200µl de salina, nos dias 0 e 14. O grupo Ctrl recebeu as mesmas injeções, porém sem o antígeno. No dia 21, iniciou-se o desafio oral, no qual os grupos Sens e Ctrl receberam o ETA 3% em mamadeira como única opção de líquido a ser ingerido até o dia 35 (2 semanas). Os camundongos do grupo Naive não receberam nenhum tipo de tratamento e ingeriram apenas água durante o desafio oral.

De acordo com perguntas específicas, alguns ajustes foram feitos nesse protocolo experimental. Em um bloco de experimento, camundongos BALB/c, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Sensibilizado (Sens) e Controle (Ctrl). Os animais do grupo sensibilizado receberam uma injeção subcutânea contendo 1µg de Ara h 1 adsorvido em 1mg de Al(OH)₃, diluídos em volume final de 200µl de salina, no dia 0. No dia 14, os animais receberam um *booster* (1µg de Ara h 1) sem o adjuvante. Os animais do grupo Ctrl receberam as mesmas injeções, porém sem o antígeno. No desafio oral, o grupo Sens foi subdividido em três grupos: Sens (Água), o qual ingeriu apenas água; Sens (Água + ETA); o qual pôde escolher entre ingerir água e ETA 10%; e Sens (ETA), o qual ingeriu apenas ETA 10%. Assim como o grupo Sens (Água + ETA), o grupo Ctrl também pôde escolher entre ingerir água e ETA 10%. O desafio oral durou três semanas (dia 21 ao dia 42).

3.4.2 Indução de Alergia Alimentar ao Ovo

Camundongos BALB/c, fêmeas, foram divididos em dois grupos: Sensibilizado (Sens) e Controle (Ctrl). Os animais do grupo sensibilizado receberam uma injeção subcutânea contendo 1µg de ovalbumina (OVA) adsorvido em 1mg de Al(OH)₃, diluídos em volume final de 200µl de salina, no dia 0. No dia 14, os animais receberam um

booster sem o adjuvante. Os animais do grupo Ctrl receberam as mesmas injeções, porém sem o antígeno. No desafio oral, utilizou-se uma solução de clara de ovo (SCO) na concentração de 20% (diluída em água potável) e adoçada com 8% de sacarose. Para esse período, o grupo Sens foi subdividido em dois grupos: Sens (Água + SCO); o qual pôde escolher entre ingerir água e SCO; e Sens (SCO), o qual ingeriu apenas SCO. Assim como o grupo Sens (Água + SCO), o grupo Ctrl também pôde escolher entre ingerir água e SCO. O desafio oral durou três semanas (dia 21 ao dia 42).

Em um outro bloco de experimento, após as três semanas de desafio oral, os grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) ficaram duas semanas sem contato com a SCO, ingerindo apenas água. Após esse período, ambos os grupos foram redesiados com gavagens diárias contendo 15mg de OVA diluída em PBS por sete dias.

3.4.3 Comparação entre alergia alimentar ao ovo e ao amendoim

Camundongos BALB/c fêmeas foram divididos em quatro grupos experimentais: Ctrl OVA, Sens OVA, Ctrl Ara h 1, Sens Ara h 1. Os animais dos grupos sensibilizados receberam uma injeção subcutânea contendo 1µg de OVA ou 1µg de Ara h 1 adsorvidos em 1mg de Al(OH)₃, diluídos em volume final de 200µl de salina, no dia 0. No dia 14, eles receberam um *booster* sem o adjuvante. Os animais dos grupos Ctrl receberam as mesmas injeções, porém sem o antígeno. A partir dia 21, por sete dias, os grupos Ctrl OVA e Sens OVA receberam uma gavagem de 30mg de OVA por dia, enquanto os grupos Ctrl Ara h 1 e Sens Ara h 1 receberam uma gavagem de 30mg de EPA por dia.

3.4.4 Monitoramento do peso corporal e da ingestão da solução antigênica durante o desafio oral

O peso corporal e a ingestão de SCO ou ETA foram monitorados diariamente ao longo do desafio oral. Para determinar alterações no peso, os animais foram pesados no dia 21, antes do início do desafio oral. O peso nos dias subsequentes foi subtraído pelo peso do dia 21. Com esse valor, determinou-se a porcentagem de alteração do peso corporal a partir do peso pré-desafio oral.

As mamadeiras contendo SCO ou ETA eram pesadas diariamente, onde obtinha-se o peso da oferta e da sobra. A diferença entre esses dois valores era dividida pelo

número de camundongos na gaiola, obtendo-se a ingestão média diária por camundongo. O conteúdo das mamadeiras era renovado diariamente.

3.5 Teste de Preferência

Camundongos foram divididos em grupos sensibilizado (Sens) e controle (Ctrl), e passaram pelo mesmo processo de sensibilização descrito nas sessões 4.4.1 e 4.4.2, recebendo injeções subcutâneas nos dias 0 e 14. Logo após a segunda injeção, os camundongos foram separados em gaiolas individuais, cada uma delas abrigando dois camundongos separados por uma grade de ferro. Ofertou-se duas mamadeiras contendo água potável para cada camundongo. No dia 21, iniciou-se o teste de preferência, no qual uma das mamadeiras contendo água foi substituída por uma mamadeira contendo ETA, EPA (feito a partir de uma farinha de amendoim com 80% menos gordura, da marca *Better PB*, diluída em água potável pH 8,5) ou SCO, dependendo do experimento. Sendo assim, cada camundongo pôde escolher entre ingerir água ou a solução contendo o antígeno de interesse.

O teste de preferência durou 24h para o modelo de alergia alimentar ao ovo, e 72h para o modelo de alergia alimentar ao amendoim. O peso das mamadeiras foi aferido diariamente, em intervalos de 24h, para o monitoramento da ingestão líquida. Para evitar o possível efeito da posição das mamadeiras sobre a escolha dos camundongos, o lado de cada mamadeira era trocado a cada 24h. O peso dos camundongos foi aferido diariamente, e a ingestão de água e soluções antigênicas foi expressa em miligramas de líquido ingerido/grama de peso dos animais.

3.6 Medida dos níveis de Imunoglobulinas Séricas

O sangue dos camundongos foi coletado e centrifugado a 12.000rpm por 10 minutos para obtenção do soro, o qual foi utilizado para a dosagem de imunoglobulinas séricas por ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) ou *Western Blot*.

3.6.1 Medida de IgG1 anti-EPA, Ara h 1 ou OVA

Placas de 96 poços de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas com EPA, que contém Ara h 1, ou OVA diluído em tampão carbonato pH 9,6 (100µl/poço; 20µg/ml) e incubadas a 4°C por, no mínimo, 16h. Após esse período, as placas foram bloqueadas com PBS BSA 1% (200µl/poço) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se

as amostras de soro dos camundongos (200µl/poço; 1:2000) na primeira fileira das placas, fazendo-se uma diluição seriada (1:2) até a última fileira. Após incubação a 37°C por 1h, adicionou-se o anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado à HRP (107005 - Southern Biotech) diluído em PBS BSA 1% (100µl/poço; 1:5000). Após incubação a 37°C por 1h, a presença de reação positiva foi determinada pela adição de ABTS diluído em tampão citrato pH 5,0 (0,5mg/ml) contendo peróxido de hidrogênio 30% (1µl/ml). Deixou-se a placa ao abrigo da luz até que a reação acontecesse, a qual foi interrompida com SDS 1%. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada pelo leitor Bio-RadiMark™ Microplate Reader com o filtro de 415nm. Entre cada um dos passos desse ensaio, exceto na adição de SDS 1%, as placas foram lavadas com salina-tween 0,05%.

3.6.2 Medida de IgG2a anti-Ara h 1 ou OVA

Placas de 96 poços de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas com EPA, que contém Ara h 1, ou OVA diluído em tampão carbonato pH 9,6 (100µl/poço; 20µg/ml) e incubadas a 4°C por, no mínimo, 16h. Após esse período, as placas foram bloqueadas com PBS BSA 1% (200µl/poço) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se as amostras de soro dos camundongos (200µl/poço; 1:2000) na primeira fileira das placas, fazendo-se uma diluição seriada (1:2) até a última fileira. Após incubação a 37°C por 1h, adicionou-se o anticorpo purificado anti-IgG2a de camundongo produzido em cabra (Southern Biotech), diluído em PBS BSA 1% (100µl/poço; 1:2000). Após incubação a 37°C por 1h, adicionou-se o anticorpo purificado anti-IgG de cabra produzido em coelho (616005 - Southern Biotech) em PBS BSA 1% (100µl/poço; 1:1000). Após incubação a 37°C por 1h, a presença de reação positiva foi determinada pela adição de ABTS diluído em tampão citrato pH 5,0 (0,5mg/ml) contendo peróxido de hidrogênio 30% (1µl/ml). Deixou-se a placa ao abrigo da luz até que a reação acontecesse, a qual foi interrompida com SDS 1%. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada pelo leitor Bio-RadiMark™ Microplate Reader com o filtro de 415nm. Entre cada um dos passos desse ensaio, exceto na adição de SDS 1%, as placas foram lavadas com salina-tween 0,05%.

3.6.3 Medida dos níveis de IgE Total

Placas de 96 poços de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas anticorpo anti-IgE UNLB (113001 – Southern Biotech) diluído em tampão carbonato (1:1000, pH 9,6) e incubadas a 4°C por, no mínimo, 16h. Após esse período, as placas foram bloqueadas

com PBS BSA 1% (200µl/poço) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se as amostras de soro dos camundongos, incubando-se por 2h à temperatura ambiente ou *overnight* à 4°C. Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-IgE de camundongo conjugado à biotina (113008 – Southern Biotech), diluído em PBS BSA 1% (1:100 para IgE anti-EPA; 1:500 para IgE anti-OVA). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se estreptavidina conjugada à HRP (710005 – Southern Biotech), diluída em PBS BSA 1% (1:5000). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, a presença de reação positiva foi determinada pela adição de ABTS diluído em tampão citrato pH 5,0 (0,5mg/ml) contendo peróxido de hidrogênio 30% (1µl/ml). Deixou-se a placa ao abrigo da luz até que a reação acontecesse, a qual foi interrompida com SDS 1%. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada pelo leitor Bio-RadiMark™ Microplate Reader com o filtro de 415nm. Entre cada um dos passos desse ensaio, exceto na adição de SDS 1%, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05%.

3.6.4 Medida dos níveis de IgE anti-EPA ou OVA

Placas de 96 poços de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas com EPA ou OVA (6µg/poço em volume de 50µl) diluído em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas a 4°C por, no mínimo, 16h. Após esse período, as placas foram bloqueadas com PBS BSA 1% (200µl/poço) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se as amostras de soro dos camundongos, incubando-se por 2h à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-IgE de camundongo conjugado à biotina (113008 – Southern Biotech), diluído em PBS BSA 1% (1:100 para IgE anti-EPA; 1:500 para IgE anti-OVA). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se estreptavidina conjugada à HRP (710005 – Southern Biotech), diluída em PBS BSA 1% (1:5000). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, a presença de reação positiva foi determinada pela adição de ABTS diluído em tampão citrato pH 5,0 (0,5mg/ml) contendo peróxido de hidrogênio 30% (1µl/ml). Deixou-se a placa ao abrigo da luz até que a reação acontecesse, a qual foi interrompida com SDS 1%. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada pelo leitor Bio-RadiMark™ Microplate Reader com o filtro de 415nm. Entre cada um dos passos desse ensaio, exceto na adição de SDS 1%, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05%.

3.6.5 Medida de IgE anti-Ara h 1

No ensaio de ELISA, placas de 96 poços de poliestireno (NUNC) foram sensibilizadas com EPA (6µg/poço em volume de 100µl) diluído em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas a 4°C por, no mínimo, 16h. Após esse período, as placas foram bloqueadas com PBS BSA 1% (200µl/poço) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se as amostras de soro dos camundongos diluídas em PBS BSA 1% (1:1), incubando-se *overnight* à 4°C. Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-IgE de camundongo conjugado à biotina (113008 – Southern Biotech), diluído em PBS BSA 1% (1:300). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se estreptavidina conjugada à HRP (710005 – Southern Biotech), diluída em PBS BSA 1% (1:5000). Após 1h de incubação à temperatura ambiente, a presença de reação positiva foi determinada pela adição de ABTS diluído em tampão citrato pH 5,0 (0,5mg/ml) contendo peróxido de hidrogênio 30% (1µl/ml). Deixou-se a placa ao abrigo da luz até que a reação acontecesse, a qual foi interrompida com SDS 1%. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada pelo leitor Bio-RadiMark™ Microplate Reader com o filtro de 415nm. Entre cada um dos passos desse ensaio, exceto na adição de SDS 1%, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05%.

Para a análise de IgE reativa ao Ara h 1 por *Western Blot*, utilizou-se um EPA enriquecido com Ara h 1 (EPA-Ara h 1), o qual foi diluído em azul de brofenol 0,2% (1:1) na presença de β-mercaptoetanol (em condição de redução) e fervido por 5 minutos. A partir dessa diluição, 10µg de proteína/coluna foram corridas em gel de acrilamida 15% a 150V por 2h. Após isso, as colunas de proteína foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em cuba transparente contendo tampão de transferência, carregado a 24V *overnight* e a 48V durante 1h antes da finalização do processo. Para certificar que a transferência ocorreu, a membrana de nitrocelulose foi corada com reagente de Panceau para visualização das bandas de proteína. As colunas de proteína foram bloqueadas com PBS-Tween 0,3% durante 1h à temperatura ambiente, sobre agitação. Em seguida, em tubos individuais contendo colunas de EPA-Ara h 1, adicionou-se um *pool* de soro dos camundongos dos seus respectivos grupos experimentais, diluídos em PBS-Tween 0,3% (1:10). As amostras de soro foram previamente tratadas com coluna de proteína G. Após agitação por 1h à temperatura ambiente, adicionou-se o anticorpo anti-IgE de camundongo conjugado à HRP (113005 – Southern Biotech) diluído em PBS-Tween 0,3% (1:1000). Após agitação por 1h à temperatura ambiente, a presença de interação das

imunoglobulinas do tipo IgE com as proteínas do EPA-Ara h 1 foi determinada pela adição de peróxido de hidrogênio diluído em uma solução contendo DAB.

3.7 Medida dos níveis de MCPT-1 Sérico

Os níveis séricos de MCPT-1 foram dosados com um kit de ELISA (88-7503-22 Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo anti-MCPT1 purificado, diluído em PBS 1X, *overnight* à 4°C. Após bloqueio com a solução diluente, colocou-se na placa as amostras de soro, diluídas 1:5 em PBS1X, e incubou-se *overnight* à 4°C. Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-MCPT-1 conjugado à biotina, e incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente. Após 30 minutos de incubação com avidina-HRP, a reação foi revelada com TMB 1X e parada com H₂SO₄ 2M. Em seguida, a absorbância das amostras foi determinada pelo leitor Bio-RadiMark™ Microplate Reader com o filtro de 450nm. Todo o ensaio foi feito com volume de 50 µl, e entre cada um dos passos desse ensaio, exceto na adição de H₂SO₄, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05%.

3.8 Medida dos níveis GDF-15 Sérico

Os níveis séricos de GDF-15 foram dosados com um kit de ELISA (MGD150 - R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, colocou-se 100µl de soro (diluído 1:2 em reagente do fabricante) em uma placa de 96 poços já sensibilizada com anticorpo anti-GDF-15. Após 2h de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se o anticorpo conjugado. Após 2h de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se a solução de substrato, incubando-se por 30 minutos ao abrigo da luz. Após adicionar solução de parada, a absorbância das amostras foi determinada pelo leitor Bio-RadiMark™ Microplate Reader com o filtro de 450nm. Entre cada um dos passos desse ensaio, exceto na adição da solução de parada, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05%.

3.9 Anafilaxia Cutânea Ativa e Passiva

Nos ensaios de anafilaxia cutânea ativa, os animais dos grupos Ctrl e Sens passaram pelo desafio oral e, ao final, passaram pelo teste de anafilaxia cutânea ativa. Após anestesiados, os camundongos receberam uma injeção intradérmica, na orelha ou no dorso, contendo 20µg de OVA ou 50µg de EPA diluídos em PBS. Imediatamente após,

injetou-se 200µl de azul de Evan (0,5%) por via intravenosa. Decorridos 30 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

A região onde se injetou o antígeno foi coletada, cortada em pedaços menores, e embebida em formamida por 72h para dissolução do corante extravasado no tecido. O sobrenadante foi pipetado em placas de 96 poços para a leitura da absorbância à 620nm. Com base em uma curva de concentração conhecida de Azul de Evan, os valores de absorbância foram transformados e expressos em concentração (mg/ml).

Nos ensaios de anafilaxia cutânea passiva, os grupos experimentais passaram pelo desafio oral e, ao final, o soro dos camundongos foi coletado para preparo de um *pool* representativo de cada grupo. Um volume de 10µl ou 30µl de soro puro foi injetado na orelha ou no dorso, respectivamente, de animais naive previamente anestesiados. Após 48h, injetou-se 300µg de EPA diluído em Azul de Evan (0,5%) por via intravenosa nos camundongos previamente anestesiados. Após 30 minutos, os animais foram eutanasiados e coletou-se as áreas onde o soro foi injetado. No experimento onde injetou-se o soro na orelha, prosseguiu-se da mesma maneira descrita anteriormente para leitura da absorbância do corante dissolvido em formamida. No experimento onde injetou-se no dorso, mediu-se o diâmetro do extravasamento de Azul de Evan.

3.10 Teste Comportamental do Campo Aberto

Nos devidos experimentos, os camundongos foram submetidos ao teste Campo Aberto para investigação do comportamento do tipo ansioso. Os camundongos foram colocados no centro de uma caixa quadrada (40 x 40 x 40cm) e filmados nesse aparato por 5 minutos para análise dos seguintes parâmetros: número de entradas no centro do aparato e tempo de permanência no centro do aparato. Essas duas medidas são inversamente proporcionais ao nível de comportamento do tipo ansioso dos camundongos. As medidas foram feitas utilizando-se o software EthoVision® XT versão 12.

3.11 Imunohistoquímica do Cérebro

A ativação neuronal na amígdala e no núcleo accumbens (NAc) foi feita por marcação de cFOS em dois experimentos distintos. No primeiro, camundongos foram gavados com 40mg de EPA logo após o ciclo de sensibilização (dia 21 do protocolo

experimental). Após 90 minutos, eles foram eutanasiados para a coleta do cérebro. No segundo experimento, os camundongos passaram pelo desafio oral e, no último dia, 90 minutos após a troca da mamadeira contendo ETA 3%, eles foram eutanasiados para a coleta do cérebro. Todo o processo ocorreu como descrito a seguir.

Os camundongos foram anestesiados e perfundidos com PBS, seguido de paraformaldeído 4% (PFA 4%). Os cérebros foram coletados e fixados em PFA 4% por 24h. Em seguida, eles foram desidratados em concentrações crescentes de sacarose diluída em PBS (10%, 20% e 30%). Os cérebros ficaram 24h em cada uma dessas soluções. Após desidratado, os cérebros foram congelados rapidamente em um recipiente contendo isopentano, envolto por gelo seco. Imediatamente, os tecidos foram colocados no freezer -80°C até o processamento. Utilizando-se um micrótomo, fatias de 40µm de espessura foram cortadas nas regiões do núcleo accumbens (NAc) e amígdala, e preservadas em isopentano a -20°C.

No dia da marcação de cFOS por imunohistoquímica, utilizando-se placas de 24 poços, os tecidos foram lavados em PBS e, em seguida, incubados com uma solução de bloqueio (PBS contendo glicina (1%), triton (0,2%) e BSA (2%)) por 1h à temperatura ambiente. Após isso, foi adicionado um anticorpo de coelho anti-cFOS de camundongo (2250S, Cell Signaling), deixando-o overnight à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado um anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à biotina, o qual ficou reagindo por 1h à temperatura ambiente. Após isso, adicionou-se uma solução contendo substância A e substância B (kit ABC), deixando reagir por 1h à temperatura ambiente. Para revelar a reação dos anticorpos com seus substratos, adicionou-se DAB na presença de peróxido de hidrogênio, o qual ficou reagindo por cerca de 1-2 minutos, até que o tecido ficasse com uma coloração amarronzada. Em seguida, os tecidos foram imediatamente retirados da solução de revelação e lavados em PBS. Entre cada uma das etapas citadas anteriormente, os tecidos foram lavados três vezes com PBS, por 5 minutos, em agitação.

Após finalizar a marcação, os tecidos foram colocados em lâminas de vidro e tratados com álcool e xilol. Por fim, com Etellan, colou-se uma lamínula sobre os tecidos. As lâminas foram fotografadas, e as fotos foram analisadas no software Qupath.

3.12 Análise fenotípica por Citometria de Fluxo

Os camundongos foram eutanasiados, e os linfonodos mesentéricos proximais (pmLN) foram coletados para análise de subpopulações de linfócitos T auxiliares.

3.12.1 Extração de células dos pmLN

Os linfonodos mesentéricos proximais (pmLN – duodenais e jejunais) foram coletados em eppendorfs de 2ml contendo 1ml de RPMI completo (RPMI1640 - GIBCO adicionado de 10% de soro fetal bovino – Cultilab). Os pmLN foram colocados em placas de petri e macerados por fricção, utilizando-se duas lâminas foscas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos à 4°C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 200µl de RPMI completo.

3.12.2 Marcação das células dos pmLN

2×10^6 células de cada amostra foram colocadas em placa de poliestireno e, primeiramente, incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 (receptores FcγRII/III) e um marcador de viabilidade celular por 15 minutos à 4°C. Após lavagem com PBS BSA 0,5%, as células foram incubadas com um mix de anticorpos anti-marcadores de superfície celular conjugados a fluorocromos por 30 minutos à 4°C (CD3 – APCCy7, 100222, Biolegend; CD4 – PE-Cy7, 100528, Biolegend). Após lavagem com PBS BSA 0,5%, as células foram permeabilizadas e fixadas por 30 minutos à 4°C. Em seguida, após outra lavagem, as células foram marcadas com anticorpos anti-fatores de transcrição que determinam as subpopulações de linfócitos Th2 (GATA3 – BV421, 563349, BD Horizon) e Treg (FOXP3 - Alexa Fluor 488, 560407, BD Pharmingen) por 1h à 4°C. As células foram, então, lavadas e ressuspensas em PBS BSA 0,5% para serem adquiridas no citômetro FACS Fortessa (BD Bioscience) acoplado a um computador contendo o software Diva. De acordo com os padrões de tamanho e granulosidade (*Forward Scatter* x *Side Scatter*), delimitou-se um *gate* na população de linfócitos para aquisição de 100.000 eventos. A análise da frequência de linfócitos Th2 e Treg foi feita no software FlowJo v10, segundo a estratégia apresentada na Figura 1.

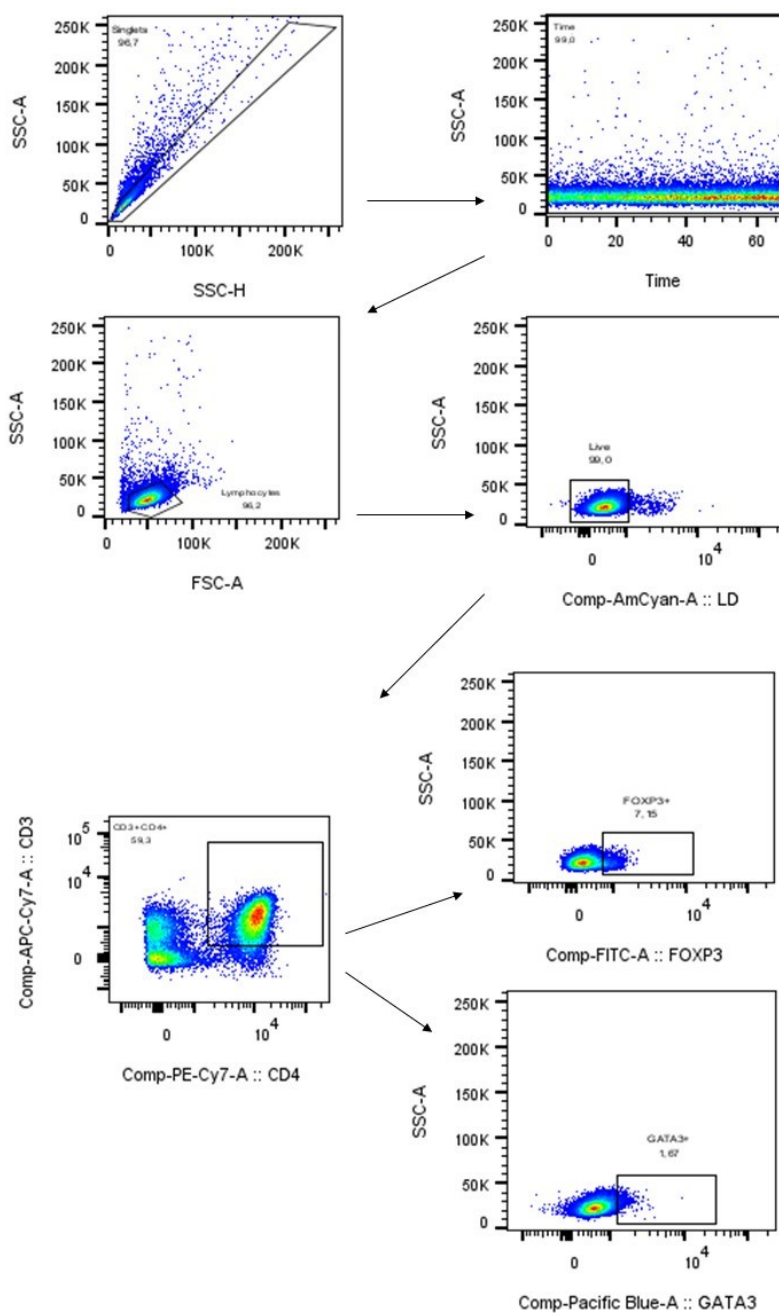


Figura 1. Estratégia de análise das populações de linfócitos Th2 e Treg.

3.13 Análise Estatística

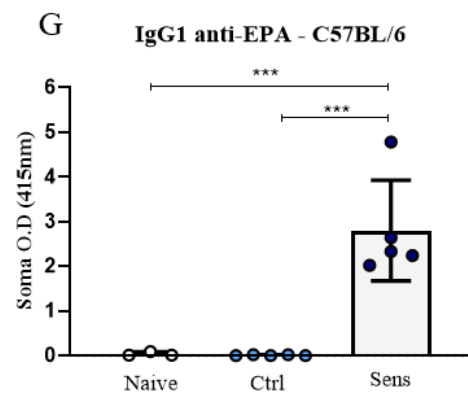
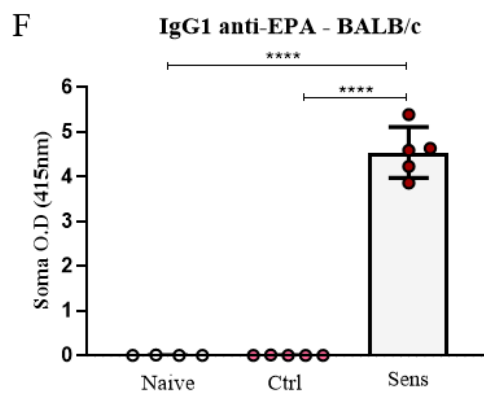
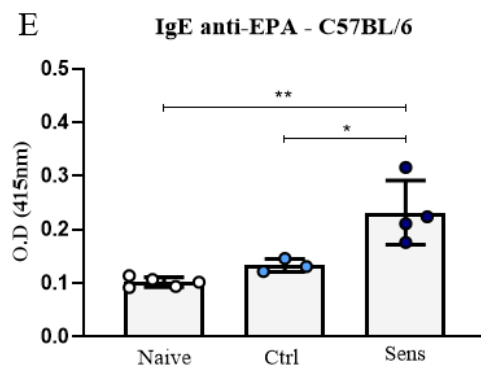
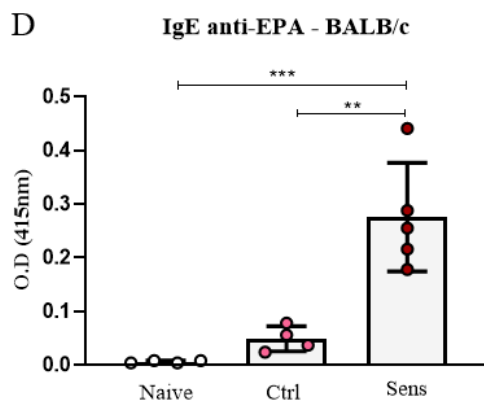
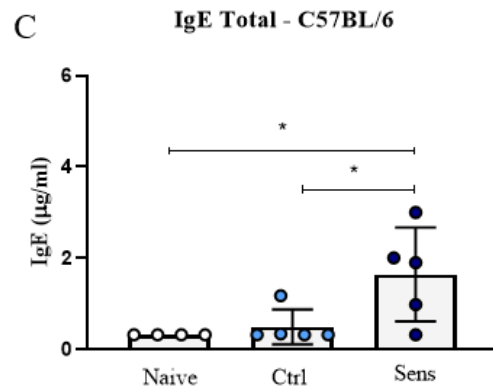
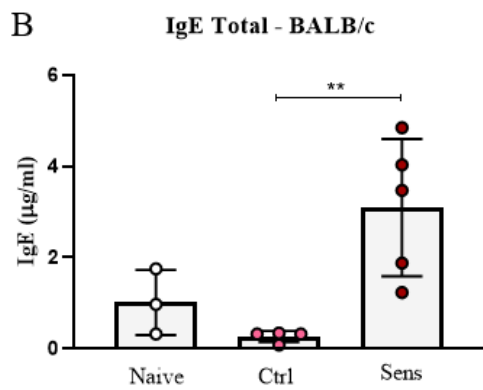
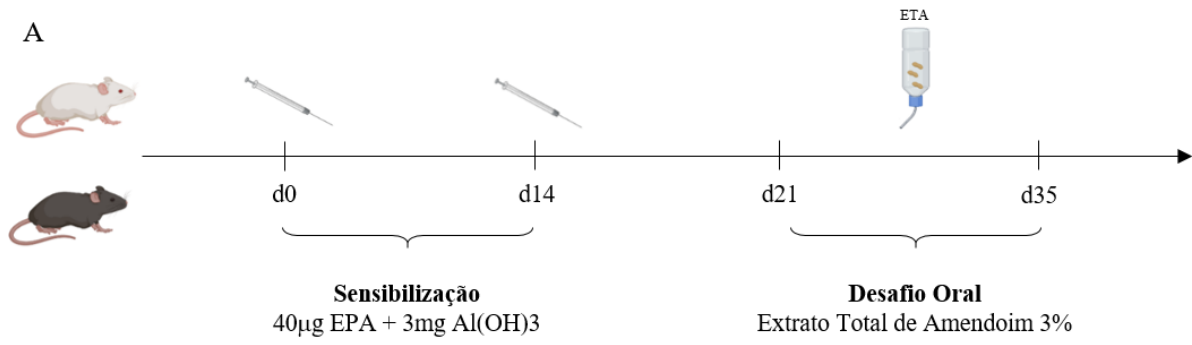
A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram feitas com o programa GraphPad Prism® versão 7. Aplicou-se o teste One Way ANOVA quando as médias aritméticas entre três ou mais grupos era comparada. Havendo diferença entre elas,

prosseguiu-se com o teste de Turkey para determinar quais grupos diferenciaram entre si. Em casos onde a comparação das médias aritméticas era feita entre apenas dois grupos, aplicou-se o Teste t. A significância estatística era considerada com valor de $p < 0,05$. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1 Camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados e desafiados com proteínas do amendoim produziram IgE específica capaz de degranular mastócitos

O fenômeno da aversão é altamente dependente da produção de IgE e da ativação de mastócitos (Basso et al., 2003; Florsheim et al., 2023). Sendo assim, determinou-se a capacidade do presente modelo de alergia ao amendoim (Fig. 2A) em desencadear essas respostas. Nele, os camundongos foram sensibilizados com extrato proteico de amendoim (EPA) e desafiados com extrato total de amendoim (ETA) 3% por quatorze dias. Após o desafio oral, os camundongos BALB/c e C57BL/6 do grupo sensibilizado (Sens) apresentaram maiores níveis séricos de IgE total e anti-EPA do que os grupos controle (Ctrl) e Naive (Fig. 2B-E). Devido a participação essencial da IgG1 na biologia da IgE em respostas imunes do tipo 2 (Erazo et al, 2007), dosamos esse subtipo de IgG no soro dos animais e, de fato, altos títulos de IgG1-anti EPA foram encontrados apenas nos grupos Sens (Fig. 2F e G). Por fim, a transferência intradérmica de soro dos grupos Sens para animais naive foi capaz de sensibilizar os mastócitos da pele, fazendo com que ocorresse um maior extravasamento local de Azul de Evan mediante exposição às proteínas do amendoim (Fig. 2H e I). Sendo assim, após o consumo do ETA 3%, camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados aumentaram a produção de IgE, a qual teve a capacidade de se ligar a mastócitos e leva-los à degranulação na presença de antígenos específicos. É importante ressaltar que, como mostrado anteriormente (Oliveira, 2021), os camundongos dos grupos Sens apresentam alterações inflamatórias na mucosa intestinal, evidenciadas por maior número de eosinófilos, linfócitos intraepiteliais e células caliciformes. Logo, o presente modelo é capaz de induzir inflamação e as respostas imunes necessárias para que a aversão alimentar aconteça.



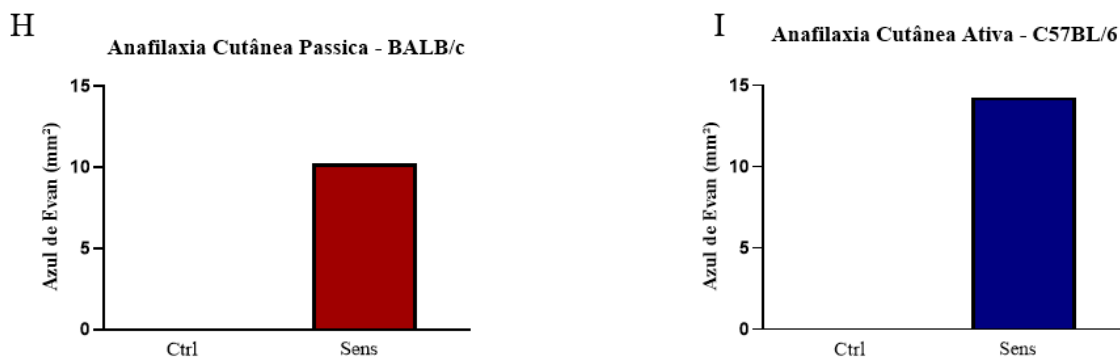


Figura 2. A ingestão de ETA 3% por camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados leva à produção de IgE capaz de ativar mastócitos. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c e C57BL/6 do grupo Sens receberam uma injeção subcutânea com 40µg de EPA adsorvido em 3mg de Al(OH)₃ nos dias 0 e 14. Camundongos do grupo Ctrl receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, os grupos Sens e Ctrl ingeriram ETA 3% por quatorze dias. Camundongos do grupo Naive não receberam injeção e ingeriram apenas água durante o desafio oral. (B e C) Níveis séricos de IgE total pós desafio oral. (D e E) Níveis séricos de IgE anti-EPA pós desafio oral. (F e G) Níveis séricos de IgG1 anti-EPA pós desafio oral. (H e I) Extravasamento de Azul de Evan pós ensaio de anafilaxia cutânea passiva em camundongos naive que receberam pool de soro dos grupos Ctrl e Sens das linhagens BALB/c e C57BL/6 e, após 48h, foram desafiados com EPA. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

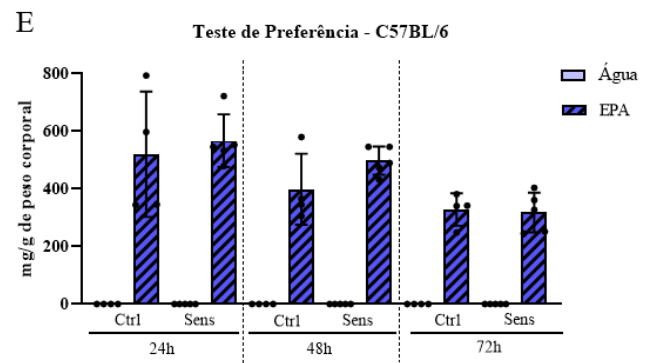
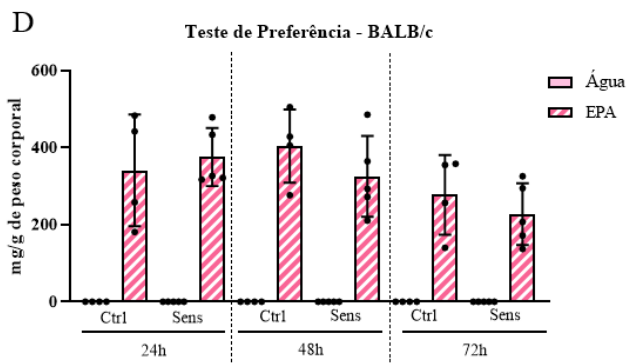
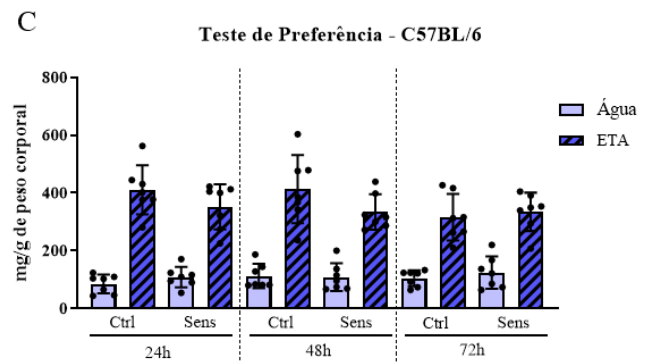
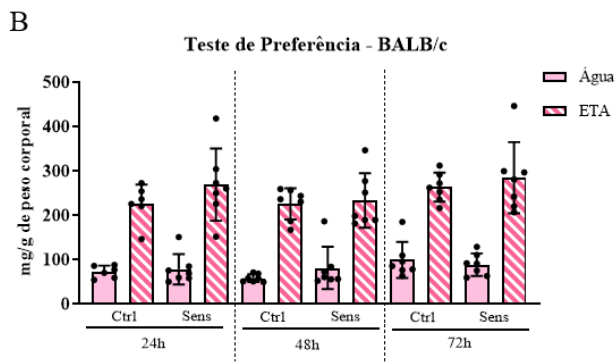
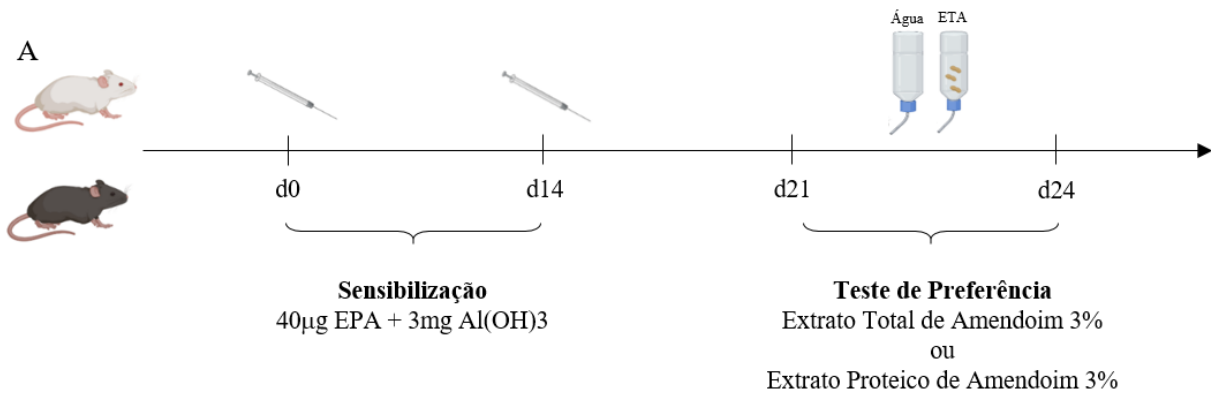
4.2 Camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados não apresentaram aversão ao consumo de ETA 3%, a despeito da ativação de mastócitos

Camundongos sensibilizados com ovalbumina (OVA) apresentam alta aversão a soluções que contenham esse antígeno, antes mesmo de serem desafiados por via oral (Cara et al., 1994; Basso et al., 2003; Florsheim et al., 2023). Diferentemente, camundongos sensibilizados com β -lactoglobulina apresentam apenas uma aversão parcial a uma solução de soro de leite (Lemos et al., 2022). Logo, investigou-se em qual ponto desse espectro os camundongos sensibilizados ao EPA se encaixariam. Ao serem submetidos a um teste de preferência (Fig. 3A), no qual os animais poderiam escolher entre ingerir água ou ETA 3%, os camundongos dos grupos Sens de ambas as linhagens (BALB/c e C57BL/6) apresentaram nenhuma aversão à solução contendo o antígeno (Fig 3B e C). Na verdade, assim como os grupos Ctrl, eles preferiram ingerir o ETA 3% à água. Isso foi observado ao longo de 72h.

Uma característica peculiar do amendoim é o seu alto teor lipídico, o que confere alta palatabilidade a esse alimento. Para testar o efeito da porção lipídica no resultado observado, decidimos repetir o teste de preferência com um EPA 3% feito a partir de uma

farinha de amendoim comercial com redução de 80% do teor lipídico. Essa alteração não foi capaz de mudar o resultado previamente obtido. Ou seja, mesmo frente a uma solução contendo menos lipídios, os camundongos dos grupos Ctrl e Sens, de ambas as linhagens, preferiram ingerir o extrato de amendoim à água (Fig. 3D e E). Os resultados dos testes de preferência não podem ser explicados por ausência da ativação de mastócitos, pois ao expor os camundongos sensibilizados ao EPA no dia 21 do protocolo experimental (logo após a sensibilização, sem que houvesse contato prévio com o antígeno por via oral), já conseguimos detectar a ativação de mastócitos nas duas linhagens (Fig. 3F e G). Logo, até o momento, camundongos sensibilizados ao amendoim não apresentaram aversão; ao contrário, demonstraram preferência por esse alimento em detrimento da água, e isso ocorreu a despeito da ativação de mastócitos.

Como demonstrado por Basso et al. (2003), e posteriormente confirmado e detalhado por Florsheim et al. (2023), a gavagem de OVA em camundongos sensibilizados leva à ativação do núcleo central da amígdala (CeA), o que se associa ao comportamento aversivo dos animais ao consumo do antígeno. Lançando mão da mesma abordagem experimental, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram sensibilizados nos dias 0 e 14, e após uma semana (dia 21), ambos os grupos Ctrl e Sens foram gavados com 40mg de EPA (Fig. 3H). Após 90 minutos, coletou-se os cérebros dos animais para análise da expressão neuronal de cFOS na amígdala. Como esperado, uma vez que os camundongos não apresentaram aversão, não houve diferença na expressão de cFOS entre os grupos Ctrl e Sens de ambas as linhagens (Fig. 3I e J). Como os camundongos apresentaram preferência pela ingestão do ETA 3%, investigou-se também a possível ativação de neurônios no NAc (área cerebral relacionada ao prazer) associada à presença de proteínas do amendoim na mucosa intestinal. Os grupos Ctrl das linhagens BALB/c e C57BL/6 apresentaram maior expressão de cFOS no NAc do que seus respectivos grupos Sens pós-gavagem (Fig. 3K e L). Assim, a presença de proteínas do amendoim na mucosa intestinal não levou à ativação da amígdala nos grupos Sens, mas associou-se a uma maior ativação do NAc apenas nos grupos Ctrl. Mesmo com menor ativação do NAc, os animais sensibilizados insistiram em ingerir o ETA 3%.



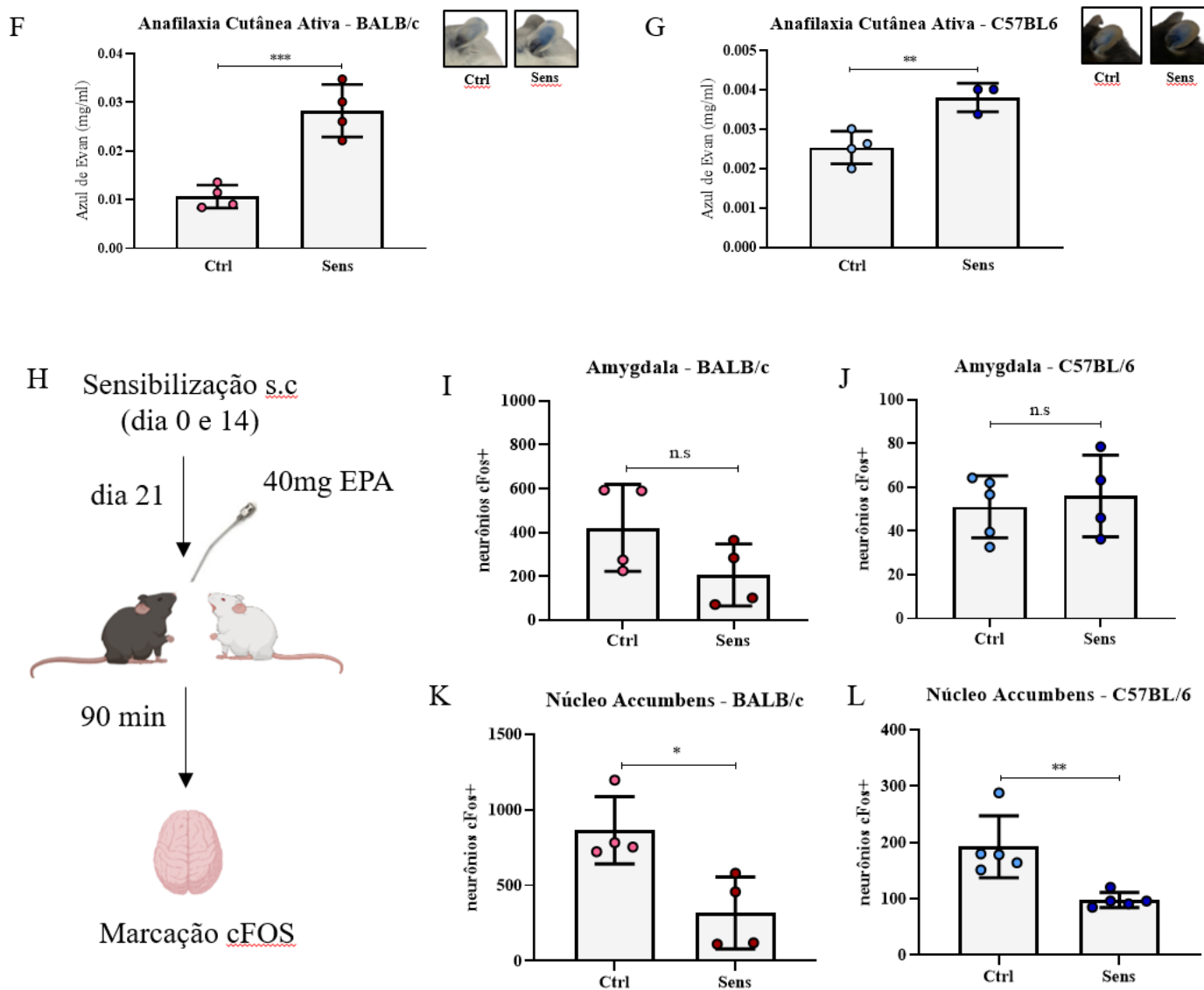


Figura 3. Camundongos BALB/c e C57BL/6 não apresentam aversão a extratos de amendoim logo após serem sensibilizados. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c e C57BL/6 do grupo Sens receberam uma injeção subcutânea com 40µg de EPA adsorvido em 3mg de Al(OH)₃ nos dias 0 e 14. Camundongos do grupo Ctrl receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. No dia 21, cada camundongo recebeu duas mamadeiras: uma contendo água e outra contendo ETA 3% ou EPA 3%. A quantidade de cada uma dessas soluções foi medida diariamente, por três dias. (B e C) Teste de preferência entre água e ETA 3%. (D e E) Teste de preferência entre água e EPA 3%. (F e G) Extravasamento de Azul de Evan pós ensaio de anafilaxia cutânea ativa. (H) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. No dia 21, após a sensibilização, camundongos dos grupos Sens e Ctrl receberam uma gavagem de 40mg de EPA. Após 90 minutos, o cérebro foi coletado para marcação de cFOS na amígdala e NAc. (I e J) Número de neurônios cFOS⁺ na amígdala. (K e L) Número de neurônios cFOS⁺ no NAc. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

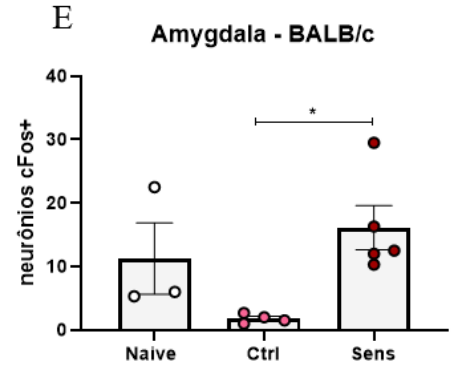
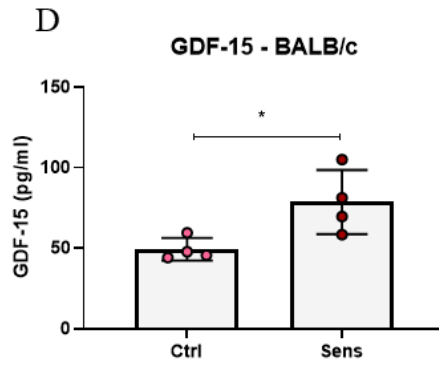
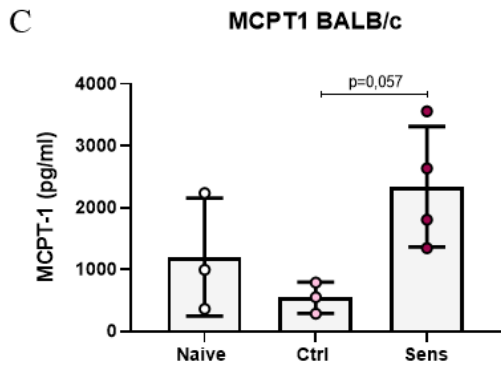
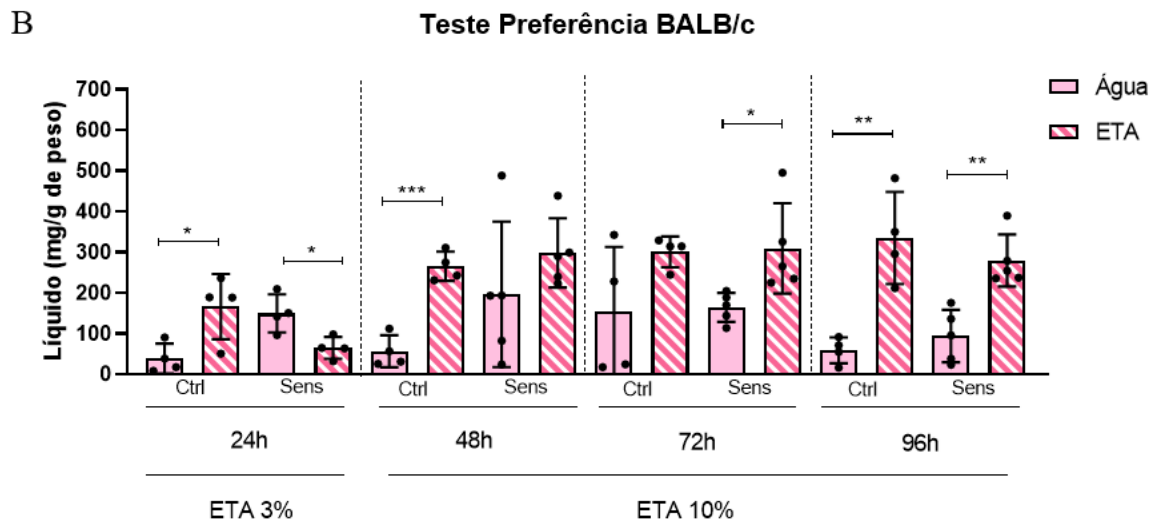
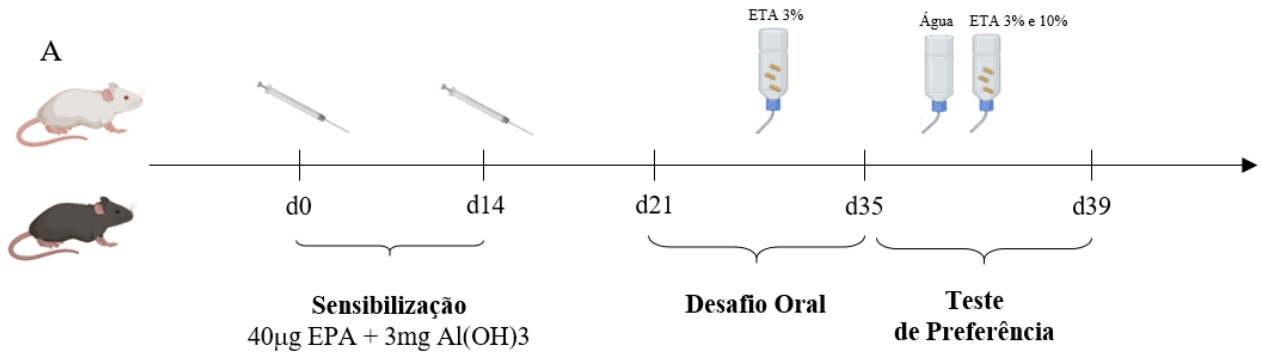
4.3 Após o desafio oral, camundongos sensibilizados da linhagem BALB/c, mas não C57BL/6, apresentam aversão ao ETA

A ausência de aversão foi observada logo após a sensibilização dos animais, sem que eles houvessem passado pelas alterações inflamatórias desencadeadas durante o desafio oral. Sendo assim, logo após os quatorze dias de ingestão exclusiva de ETA 3%, os camundongos foram novamente submetidos ao teste de preferência, no qual podiam escolher entre ingerir ETA 3% ou água por 24h, (Fig. 4A). Na linhagem BALB/c, os camundongos do grupo Ctrl apresentaram a mesma preferência observada anteriormente. No entanto, ao contrário do que foi observado logo após a sensibilização (Fig. 4B), os camundongos Sens preferiram ingerir água ao ETA 3% depois da experiência do desafio oral (Fig. 4B), exibindo um comportamento aversivo. Coletou-se o soro dos animais logo antes desse teste de preferência para avaliar os níveis séricos de MCPT-1 e GSDF-15. A aversão coincidiu com uma tendência a apresentar maiores níveis séricos de MCPT-1 (Fig. 4C), enzima liberada a partir da ativação de mastócitos. Nesse mesmo momento, os camundongos Sens também apresentaram maior produção de GDF-15 do que o grupo Ctrl (Fig. 4D). Como consequência, ao avaliar a ativação neuronal na amígdala (em um experimento à parte, logo após o desafio oral), observou-se um maior número de neurônios cFOS⁺ no grupo Sens do que no grupo Ctrl (Fig. 4E). Ou seja, assim como mostrado no contexto da alergia ao ovo (Florsheim et al., 2023), a aversão dos camundongos associou-se à maior ativação de mastócitos, à maior produção de GDF-15 e à maior ativação da amígdala. No entanto, ao aumentar a concentração do ETA de 3% para 10% e continuar o teste de preferência por mais três dias, os camundongos sensibilizados gradativamente deixaram de exibir aversão e, ao final do teste, voltaram a preferir o ETA à água (Fig. 4B). Ou seja, a despeito da ativação de mastócitos, da produção de GDF-15 e da ativação da amígdala, a aversão foi sobrepujada pelo aumento da concentração de amendoim no extrato. Por isso, nesse contexto, essa aversão foi entendida como moldável.

Em relação à linhagem C57BL/6, o grupo Ctrl continuou a apresentar preferência pelo ETA 3%, enquanto o grupo sensibilizado ingeriu a mesma quantidade das duas soluções, não apresentando preferência (Fig. 4F). No entanto, como a quantidade de ETA 3% ingerida pelo grupo Sens foi menor do que o grupo Ctrl, entendeu-se isso como uma aversão parcial. Nesse momento, o grupo Sens não apresentou diferença na produção de MCPT-1 e GDF-15 em relação ao grupo Ctrl (Fig. 4G-H), nem no grau de ativação da

amígdala (Fig. 4I). Assim como para a linhagem BALB/c, o aumento da concentração de amendoim restaurou a preferência do grupo Sens pelo ETA (Fig. 4F).

Após quatorze dias de ingestão de *whey protein*, camundongos sensibilizados com a β -lactoglobulina apresentam ativação do NAc (Lemos et al., 2022). Isso, somado à aversão moldável em camundongos BALB/c sensibilizados e à ausência de aversão em camundongos C57BL/6 sensibilizados, nos levou à hipótese de que a ingestão do ETA poderia ativar o sistema recompensa e, assim, manter a ingestão da solução alergênica mesmo no contexto da sensibilização. Sendo assim, analisou-se a expressão de cFOS no NAc após quatorze dias de ingestão de ETA 3%. Na linhagem BALB/c, não houve diferença na ativação do NAc entre os grupos (Fig. 4J). Na linhagem C57BL/6, no entanto, o grupo Ctrl apresentou maior número de neurônios cFOS⁺ no NAc do que o grupo Sens (Fig 4K). Assim, a ingestão de ETA 3% pelos camundongos sensibilizados não se associa à ativação do NAc.



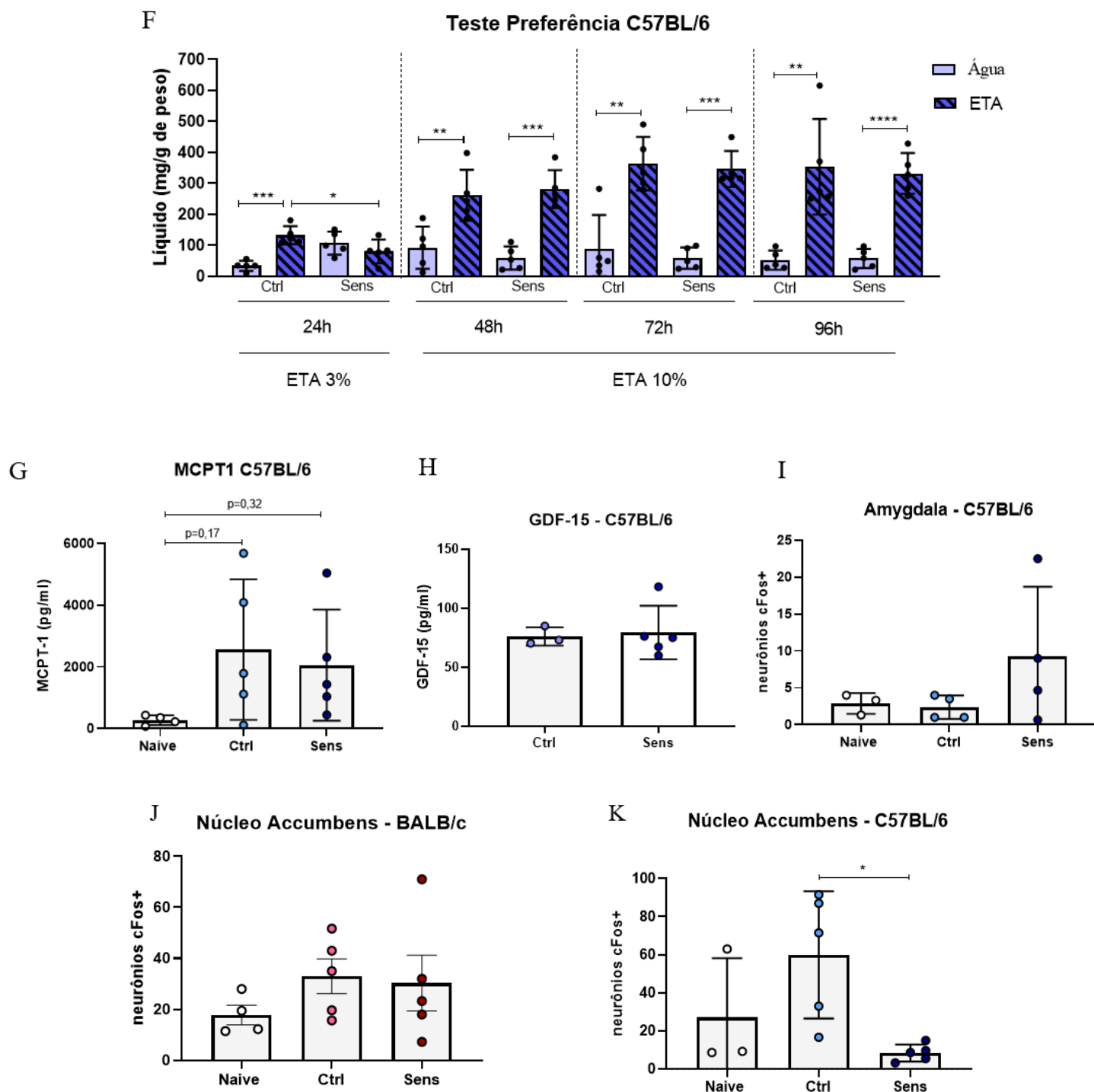


Figura 4. Camundongos BALB/c, mas não C57BL/6, sensibilizados apresentam aversão ao ETA após o desafio oral. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c e C57BL/6 do grupo Sens receberam uma injeção subcutânea com 40 μ g de EPA adsorvido em 3mg de Al(OH)₃ nos dias 0 e 14. Camundongos do grupo Ctrl receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, os grupos Sens e Ctrl ingeriram ETA 3% por quatorze dias. Camundongos do grupo Naive não receberam injeção e ingeriram apenas água durante o desafio oral. Ao final do desafio oral, os camundongos dos grupos Ctrl e Sens foram submetidos a um teste de preferência por 96h. No primeiro dia, podiam escolher entre ingerir água e ETA 3%. No restante dos dias, a concentração do ETA subiu de 3% para 10%. (B e F) Teste de preferência entre água e ETA após o desafio oral. (C e G) Níveis séricos de MCPT-1. (D e H) Níveis séricos

de GDF-15. (E e I) Número de neurônios cFOS⁺ na amígdala pós-desafio oral. (J e K) Número de neurônios cFOS⁺ no NAc pós-desafio oral. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

4.4 Após o desafio oral, os camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentam alterações comportamentais

Camundongos com alergia alimentar tendem a apresentar comportamento do tipo ansioso após serem desafiados (Basso et al., 2003; Smith et al., 2021). Assim, submetemos os animais ao teste do Campo Aberto após o desafio oral (Fig. 5A). Nele, o número de entradas e o tempo de permanência no centro do aparato é inversamente proporcional ao comportamento do tipo ansioso. Surpreendentemente, os camundongos Sens das linhagens BALB/c e C57BL/6 apresentaram um maior número de entrada no centro do aparato do que seus respectivos grupos Ctrl e Naive (Fig. 5B e C). Além disso, eles permaneceram no centro por mais tempo do que o grupo Naive (Fig. 5D e E). Logo, a ingestão de ETA 3% levou os animais sensibilizados de ambas as linhagens a exibirem uma diminuição do comportamento do tipo ansioso em comparação aos grupos não sensibilizados.

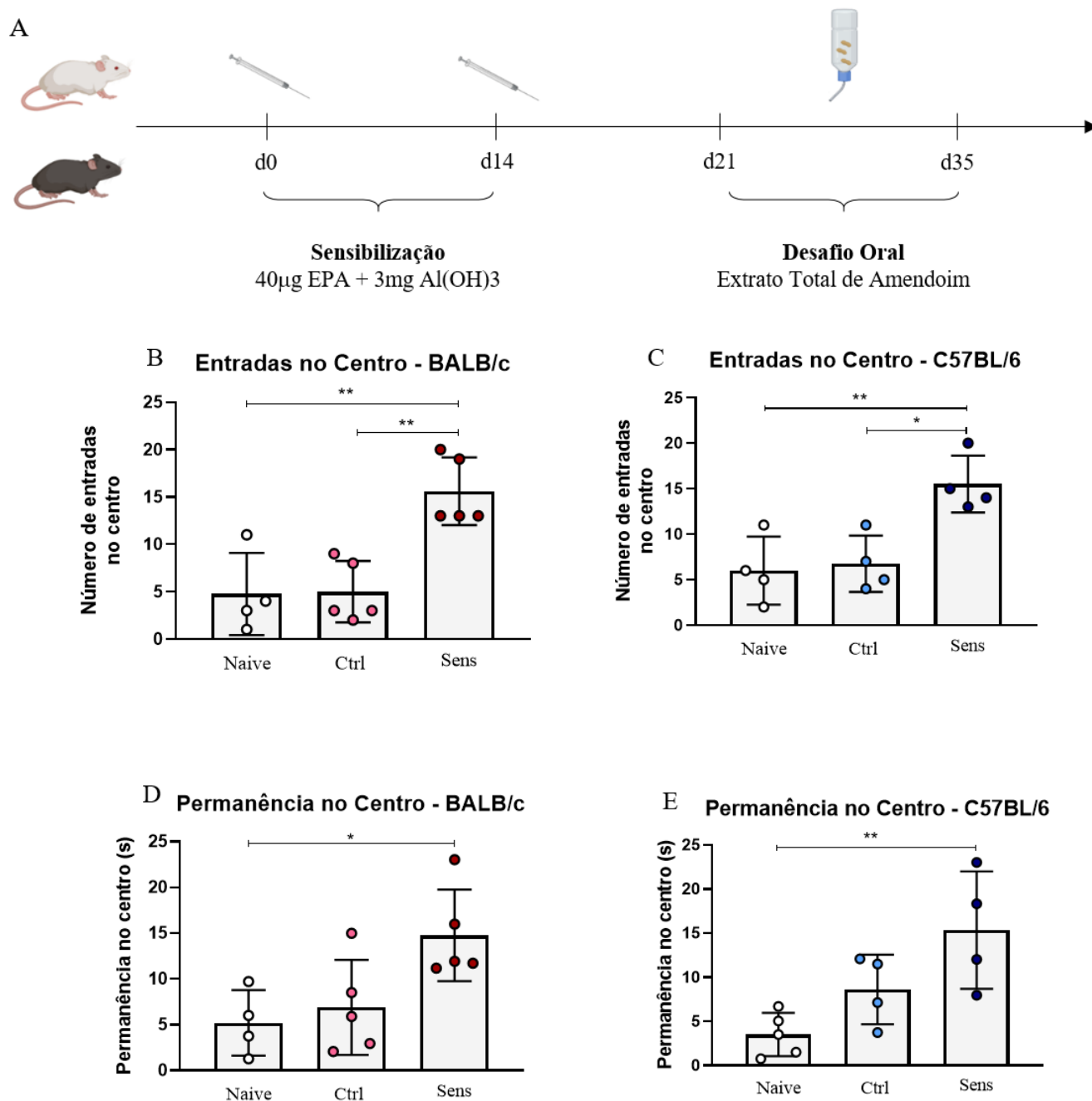


Figura 5. A ingestão de ETA 3% por camundongos BALB/c e C57BL/6 sensibilizados leva a alterações comportamentais. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c e C57BL/6 do grupo Sens receberam uma injeção subcutânea com 40µg de EPA adsorvido em 3mg de Al(OH)₃ nos dias 0 e 14. Camundongos do grupo Ctrl receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, os grupos Sens e Ctrl ingeriram ETA 3% por quatorze dias. Camundongos do grupo Naive não receberam injeção e ingeriram apenas água durante o desafio oral. Após o desafio oral, todos os grupos foram submetidos ao teste Campo Aberto, no qual se mediu o (A e B) número de entradas no centro do aparato e (F e G) o tempo de permanência no centro do aparato durante. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

4.5 A aversão alimentar é uma barreira para a dessensibilização voluntária

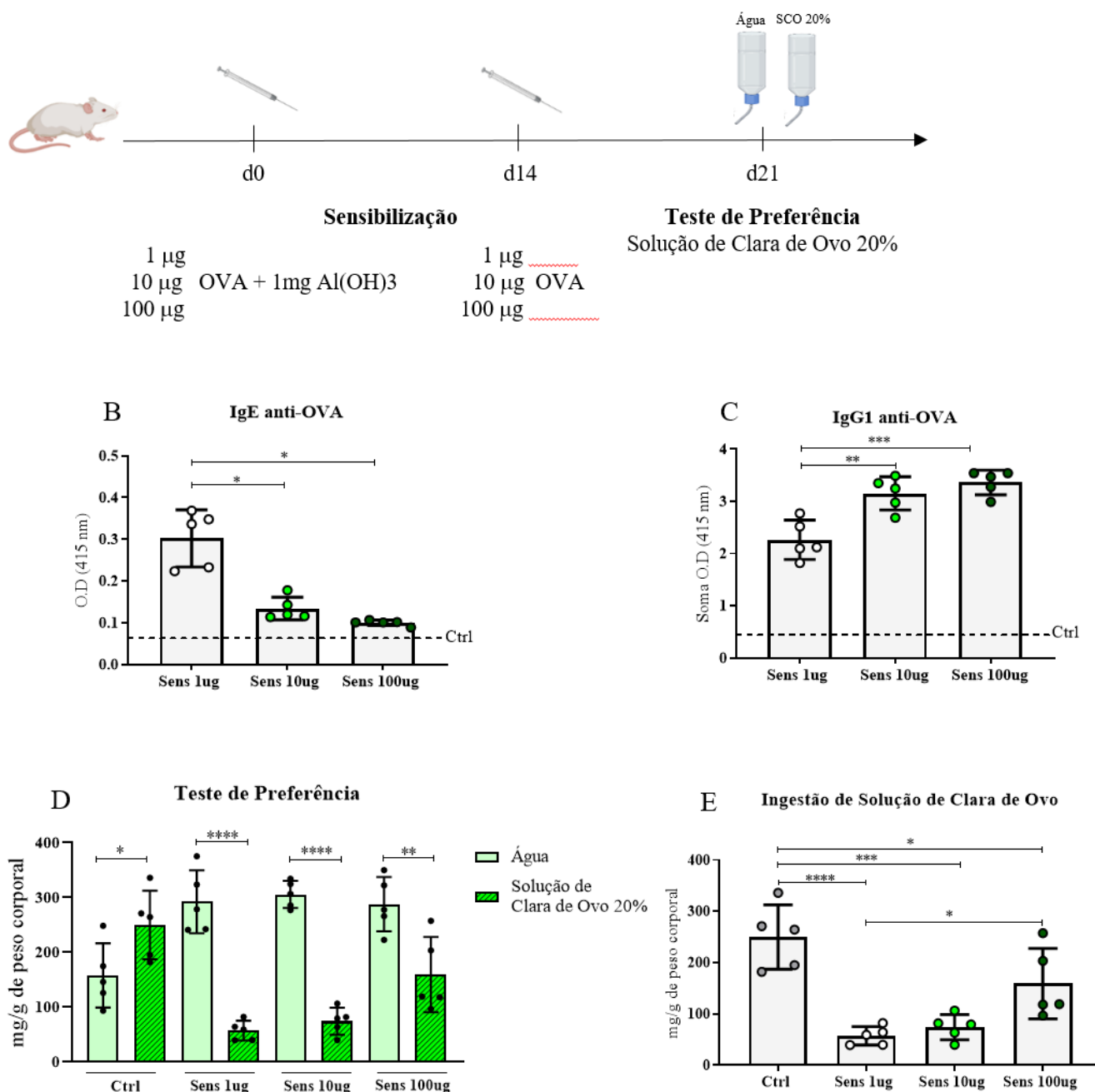
Considerando-se que houve uma aversão moldável ao ETA, e que o contato crônico do antígeno com a mucosa intestinal leva à dessensibilização (Dourado et al., 2010; Batista et al., 2014; Vonk et al., 2017), gerou-se a hipótese de que num contexto de pouca ou ausência de aversão, camundongos sensibilizados insistem no contato com o alimento alergênico, gerando o benefício da dessensibilização. Por outro lado, quando há aversão, camundongos sensibilizados evitam o alimento alergênico e, assim, não passam pelos processos imunomodulatórios associados à dessensibilização.

Como primeiro passo para testar essa hipótese, lançamos mão do modelo de alergia alimentar ao ovo, onde há forte aversão ao antígeno. Primeiramente, determinou-se o esquema de sensibilização que geraria o maior nível de aversão. Vaz et al. (1971) mostraram que altos níveis de IgE anti-OVA são gerados quando os camundongos são sensibilizados com baixa dose de antígeno. Sabendo-se da importância da IgE para o fenômeno da aversão, sensibilizou-se camundongos BALB/c com 1µg (Sens 1µg), 10µg (Sens 10µg) ou 100µg (Sens 100µg) de OVA. Em seguida, eles foram submetidos a um teste de preferência no qual poderiam escolher entre ingerir água ou solução de clara de ovo 20% (SCO) adoçada com sacarina (0,5%) por 24h (Fig. 6A). O grupo Sens 1µg foi o que produziu a maior quantidade de IgE (Fig. 6B) e a menor quantidade de IgG1 (Fig. 6C) comparado aos demais grupos sensibilizados. Apesar dessa diferença, todos os grupos sensibilizados, mas não o grupo Ctrl, apresentaram aversão à SCO (Fig. 6D). No entanto, o grau de aversão apresentado pelo grupo Sens 1µg foi o mais elevado (Fig. 6E). Os camundongos desse grupo ingeriram apenas 22,8% da quantidade de SCO ingerida pelo grupo Ctrl, enquanto os grupos Sens 10µg e Sens 100µg ingeriram 29,7% e 63,65%, respectivamente. Logo, a dose de sensibilização que gerou o grau mais elevado de aversão foi 1µg.

Em seguida, testou-se as alterações no sabor que tornariam a SCO o mais palatável possível. Inicialmente, ofertou-se SCO com 0,5% de sacarina a camundongos não sensibilizados como única opção de líquido a ser ingerido. Em intervalos de 24h, dobrou-se a quantidade de sacarina para ver se o aumento do sabor doce aumentaria a quantidade de SCO ingerida pelos animais (Fig. 6F). Mesmo atingindo a concentração de 2%, o aumento de sacarina não desencadeou mudanças bruscas na ingestão de SCO (Fig. 6G). Sabendo-se que camundongos preferem sacarose à sacarina, trocou-se a sacarina por

sacarose para adoçar a SCO, mantendo-se o aumento progressivo da concentração (Fig. 6F). Ao chegar na concentração de 8%, os camundongos apresentaram um aumento expressivo na ingestão de SCO (Fig. 6G). Finalmente, para testar a diferença na ingestão de SCO adoçada em relação à SCO não adoçada, ofertou-se SCO com ou sem 8% de sacarose a dois grupos de animais não sensibilizados por duas semanas (Fig. 6H). A média de ingestão diária do grupo que recebeu a SCO adoçada foi 166% maior do que a média da ingestão diária do grupo que recebeu a SCO não adoçada (Fig. 6I). Isso mostra a alta palatabilidade da SCO adicionada de 8% de sacarose.

A



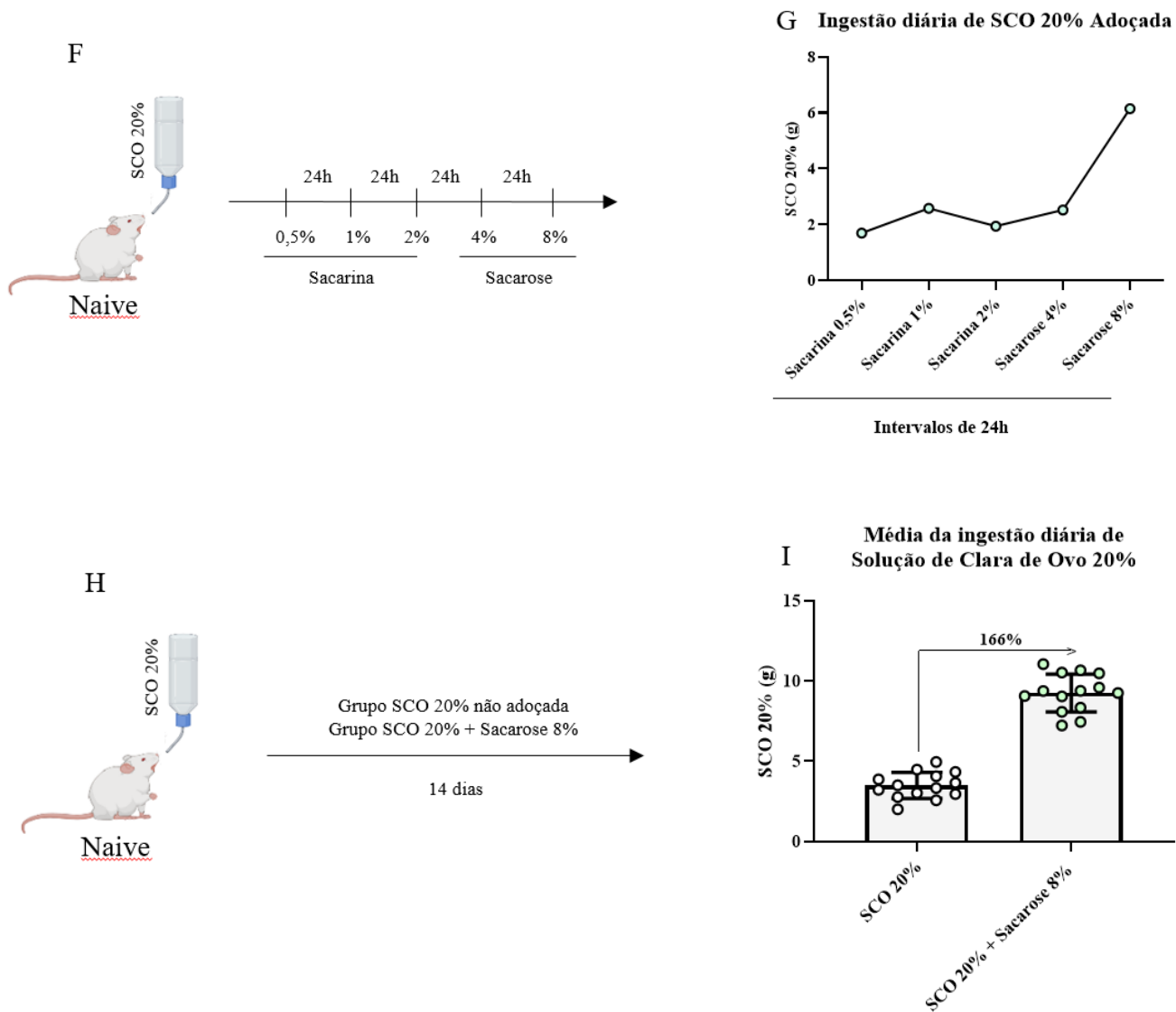
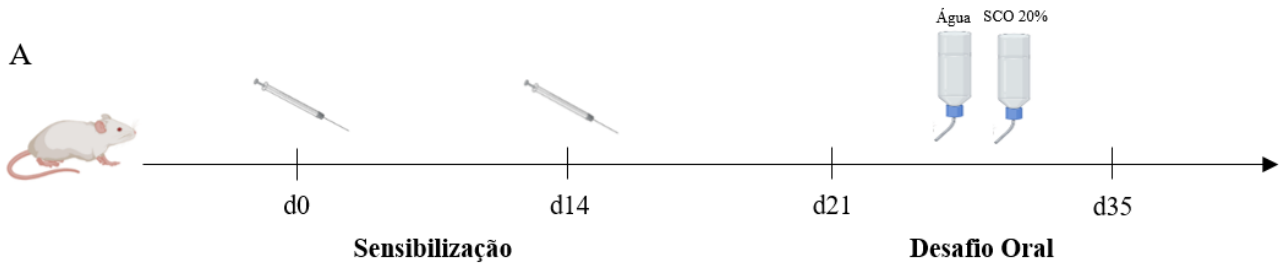


Figura 6. A sensibilização com baixa dose de OVA leva ao maior nível de aversão, e a adição de 8% de sacarose torna a SCO altamente palatável. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c do grupo Sens foram sensibilizados com 1µg, 10µg ou 100µg de OVA adsorvida em 1mg de Al(OH)₃, por via subcutânea, no dia 0. No dia 14, esses grupos receberam um boost com as mesmas doses de antígeno, sem o adjuvante. Camundongos do grupo Ctrl receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. No dia 21, cada camundongo recebeu duas mamadeiras: uma contendo água e outra contendo SCO com 0,5% sacarina. A quantidade de cada uma dessas soluções foi medida diariamente, por 24h. (B) Níveis séricos de IgE anti-OVA pós teste de preferência. (C) Níveis séricos de IgG1 anti-OVA pós teste de preferência. (D) Teste de preferência entre água e SCO com 0,5% sacarina. (E) Comparação da quantidade de SCO com 0,5% sacarina ingerida entre os grupos. (F) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Para determinar uma SCO altamente palatável, camundongos naive receberam, inicialmente, SCO adoçada com 0,5% de sacarina. A cada 24h, a concentração de sacarina dobrou, até atingir 2%. No dia seguinte, a sacarina foi trocada para sacarose, na concentração de 4%, a qual dobrou no dia seguinte. (G) A quantidade média de ingestão da SCO foi monitorada diariamente. (H) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos naive foram divididos em dois grupos. Um ingeriu SCO não adoçada e o outro ingeriu SCO com 8% de sacarose por 14 dias. (I) Quantidade média de ingestão das duas SCO ao longo dos 14 dias. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$).

Uma vez definido o esquema de sensibilização que gera alto nível de aversão e a SCO que oferece alta palatabilidade, prosseguiu-se para a testagem da hipótese de que a aversão é uma barreira para a dessensibilização. Para isso, sensibilizou-se dois grupos com 1µg de OVA: Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) (Fig. 7A). O primeiro, assim como o grupo controle (Ctrl), pôde escolher entre ingerir água ou SCO com 8% de sacarose ao longo de duas semanas de desafio oral. O último, no entanto, só tinha a opção de ingerir a SCO com 8% de sacarose. Como esperado, o grupo Ctrl ingeriu mais SCO do que ambos os grupos sensibilizados ao longo do desafio oral, com maior ingestão na segunda semana em comparação à primeira (Fig. 7B). Os camundongos do grupo Sens (Água + SCO) beberam pouca SCO ao longo do desafio oral (~0,4g/animal/dia), sem alterações entre a primeira e a segunda semana. Em decorrência disso, durante a exposição à solução antigênica, não apresentaram mudanças nos níveis séricos de IgE anti-OVA (Fig 7C). A quantidade sérica de IgG1 anti-OVA, no entanto, aumentou na primeira, e manteve-se estável até o final da segunda semana de desafio oral (Fig. 7D). Já os camundongos do grupo Sens (SCO), apesar de também ingerirem uma quantidade pequena de SCO na primeira semana (~0,6g/animal/dia), apresentaram um aumento na ingestão de SCO durante a segunda semana de desafio oral (~1,38g/animal/dia) (Fig. 7B). Isso se relacionou bem aos níveis séricos de IgE anti-OVA, os quais aumentaram ao final da primeira semana (coincidindo com a baixa ingestão), mas retornaram aos valores pré-desafio oral ao final da segunda semana (coincidindo com o aumento na ingestão) (Fig. 7E). Já os níveis de IgG1 anti-OVA aumentaram gradativamente ao longo do desafio oral (Fig. 7F). Logo, diferentemente do grupo Sens (Água + SCO), a ausência da opção da água forçou os animais do grupo Sens (SCO) a constantemente entrar em contato com o antígeno, o que eventualmente levou à uma queda nos níveis séricos de IgE anti-OVA.

Para uma melhor investigação desse provável processo de dessensibilização, estendeu-se o tempo de desafio oral para três semanas e comparou-se os níveis de imunoglobulinas séricas, assim como a degranulação de mastócitos, entre os grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO). Ao final da terceira semana, apesar de não haver diferença na produção de IgE específica (Fig. 7G), o grupo Sens (SCO) tinha níveis séricos de IgG1 e IgG2a anti-OVA mais elevados que o grupo Sens (Água + SCO) (Fig. 7H e I). Além disso, ao expor os mastócitos da pele à OVA, o grupo Sens (SCO) apresentou menor extravasamento vascular do que o grupo Sens (Água + SCO) (Fig. 7J). Ou seja, o contato constante com a OVA levou a processos imunomodulatórios que conferiram diminuição

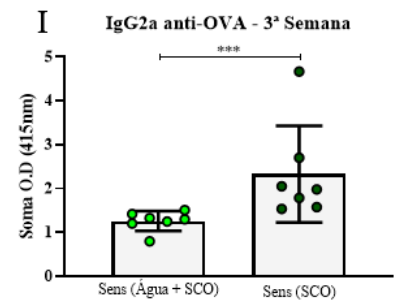
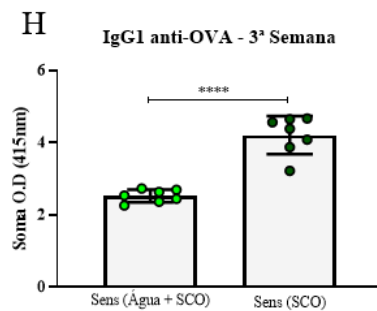
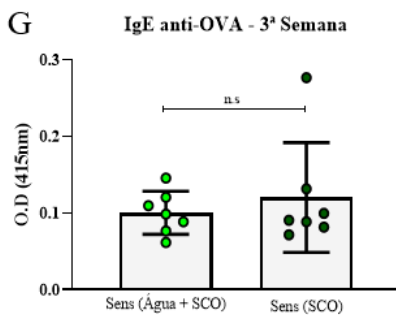
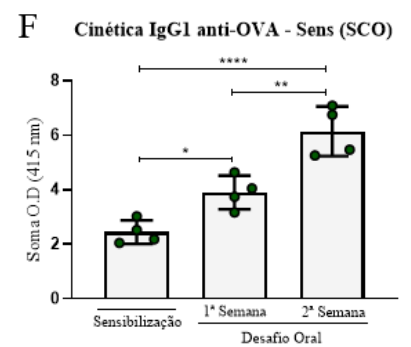
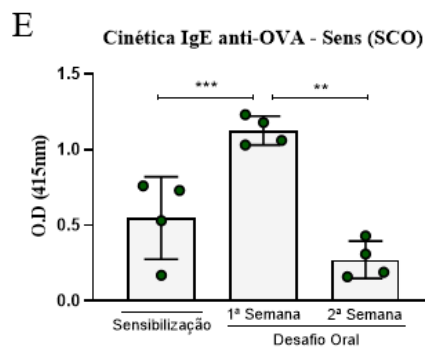
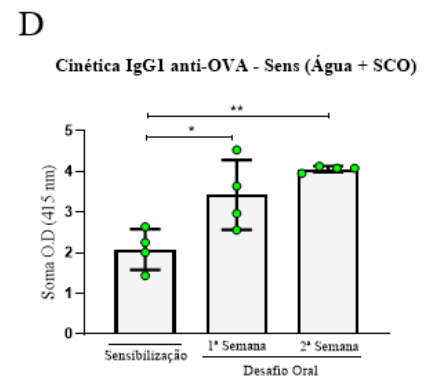
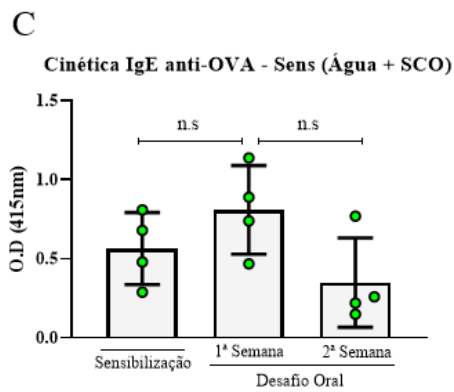
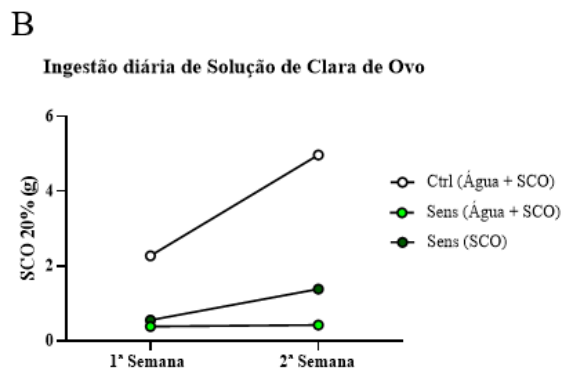
da ativação de mastócitos, o que aponta para um processo de dessensibilização. Assim, ao passo que protege de reações alérgicas indesejáveis, a aversão impede a dessensibilização voluntária de camundongos.



1µg OVA
1mg Al(OH)₃

1µg OVA

Água
Solução de Clara de Ovo



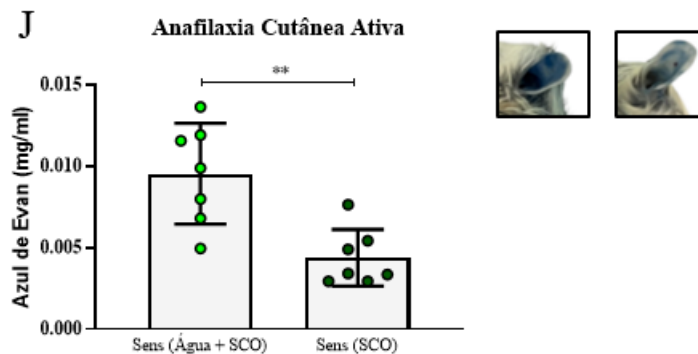


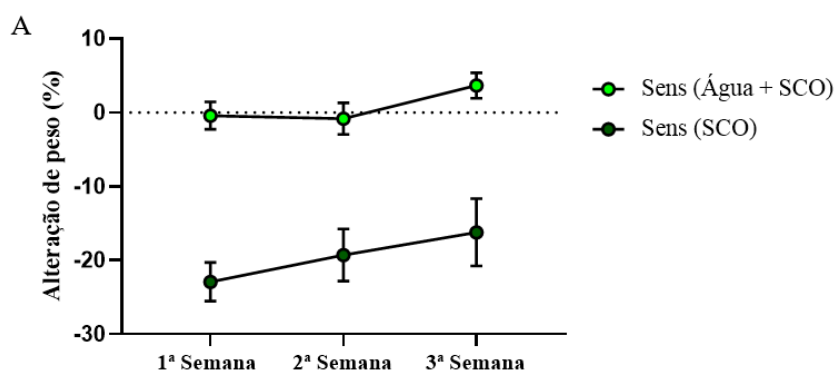
Figura 7. A aversão impede o contato crônico com o antígeno e, conseqüentemente, a dessensibilização. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c dos grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) foram sensibilizados com 1 µg de OVA adsorvida em 1 mg de Al(OH)₃, por via subcutânea, no dia 0. No dia 14, os camundongos receberam um boost com a mesma dose de antígeno, sem o adjuvante. Camundongos do grupo Ctrl (Água + SCO) receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, durante duas semanas, os grupos Sens (Água + SCO) e Ctrl (Água + SCO) puderam escolher entre ingerir água e SCO adoçada com 8% de sacarose, enquanto o grupo Sens (SCO) ingeriu apenas SCO adoçada com 8% de sacarose. Em um experimento a parte, contendo apenas os grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO), o desafio oral foi estendido para três semanas. (B) Média da ingestão diária de SCO ao longo do desafio oral. (C e E) Níveis séricos de IgE anti-OVA ao longo do desafio oral. (D e F) Níveis séricos de IgG1 anti-OVA ao longo do desafio oral. (G) Níveis séricos de IgE anti-OVA após três semanas de desafio oral. (H) Níveis séricos de IgG1 anti-OVA após três semanas de desafio oral. (I) Níveis séricos de IgG2a anti-OVA após três semanas de desafio oral. (J) Extravasamento de Azul de Evan pós ensaio de anafilaxia cutânea ativa. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

4.6 Apesar do benefício da dessensibilização, a exposição crônica ao antígeno no contexto de alta aversão tem elevado custo fisiológico e não é duradoura

É importante ressaltar que esse processo de dessensibilização, apesar de benéfico, possui um alto custo fisiológico. Após a primeira semana de desafio oral, os animais do grupo Sens (SCO) perderam, em média, 22% do peso corporal (Fig. 8A). Mesmo que essa porcentagem tenha diminuído ao passo que os animais dessensibilizavam, eles ainda apresentaram cerca de 16% de perda de peso ao final do protocolo. Já os animais do grupo Sens (Água + SCO) estavam protegidos desse efeito (Fig. 8A).

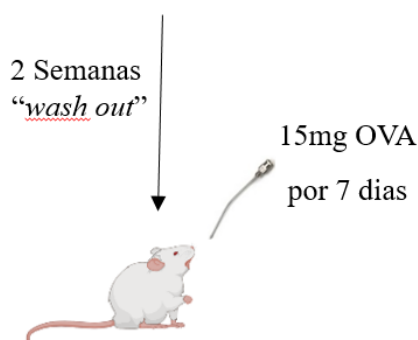
Além disso, investigou-se a durabilidade do benefício dessa dessensibilização. Após as três semanas de desafio oral, deixou-se os animais Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) sem contato com a SCO por 2 semanas (período *wash out*) (Fig. 8B). Em seguida, ofertou-se aos animais, por sete dias, 15mg de OVA por gavagem. Essa dose foi equivalente à quantidade de OVA que o grupo Sens (SCO), em média, ingeriu na semana anterior ao período *wash out*. Após as gavagens, o grupo Sens (SCO) apresentou uma

tendência a ter uma resposta anafilática cutânea mais grave do que o grupo Sens (Água + SCO) (Fig. 8C). Além disso, o grupo Sens (SCO) perdeu mais peso do que o grupo SCO (Água + SCO) durante a reexposição ao antígeno (Fig. 8D). Por fim, ao analisar subpopulações de linfócitos T CD4⁺ nos linfonodos mesentéricos proximais, o grupo Sens (SCO) apresentou maior frequência de linfócitos Th2, assim como uma tendência a ter maior frequência de linfócitos Treg, do que o grupo SCO (Água + SCO) (Fig. 8E e F). Ou seja, além do impacto fisiológico durante as três semanas de contato constante com o antígeno (evidenciado pela perda de peso e provável alteração comportamental), os benefícios da dessensibilização parecem ser perdidos após descontinuação da SCO, evidenciado por sinais clínicos e imunológicos de maior gravidade.



B

Sensibilização seguida de 3 semanas de Desafio Oral



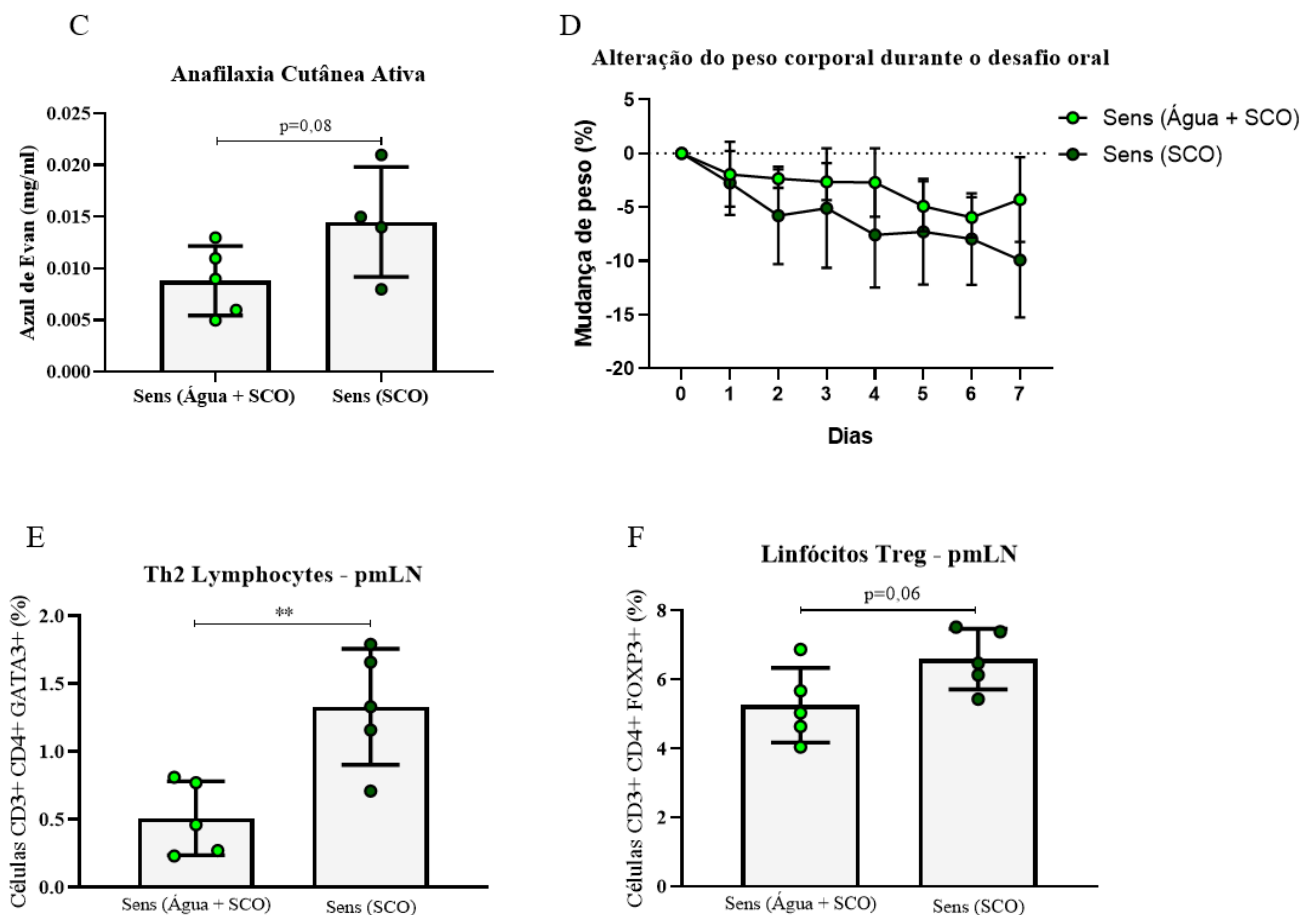


Figura 8. A dessensibilização à OVA mediante a ingestão crônica de SCO tem alto custo fisiológico e não é duradoura. Camundongos BALB/c dos grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) foram sensibilizados com 1µg de OVA adsorvida em 1mg de Al(OH)₃, por via subcutânea, no dia 0. No dia 14, os camundongos receberam um boost com a mesma dose de antígeno, sem o adjuvante. Camundongos do grupo Ctrl (Água + SCO) receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, durante duas semanas, os grupos Sens (Água + SCO) e Ctrl (Água + SCO) puderam escolher entre ingerir água e SCO adoçada com 8% de sacarose, enquanto o grupo Sens (SCO) ingeriu apenas SCO adoçada com 8% de sacarose. Em um experimento a parte, contendo apenas os grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO), o desafio oral foi estendido para três semanas. (A) Variação do peso corporal ao longo do desafio oral. (B) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Após serem sensibilizados e desafiados por três semanas, os grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) passaram por duas semanas de um período wash out, onde ingeriram apenas água. Após isso, ambos os grupos receberam gavagens diárias de 15mg de OVA por 7 dias. (C) Extravasamento de Azul de Evan em ensaio de anafilaxia cutânea ativa, (D) variação do peso corporal, (E) frequência de linfócitos Th2 e (F) frequência de linfócitos Treg após as gavagens. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

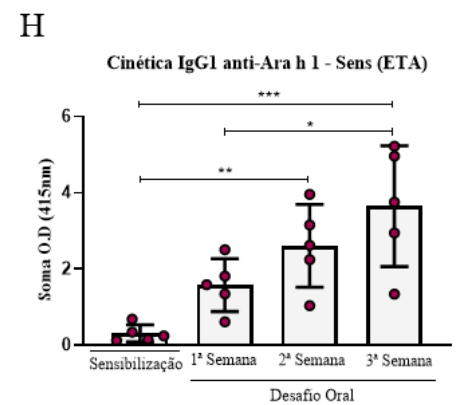
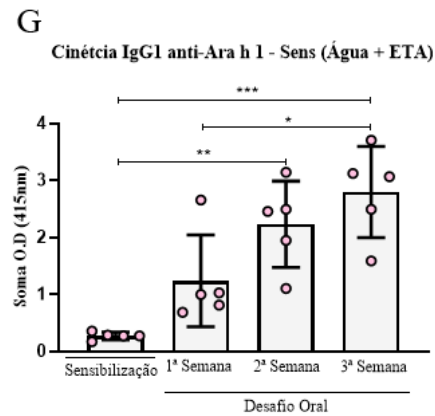
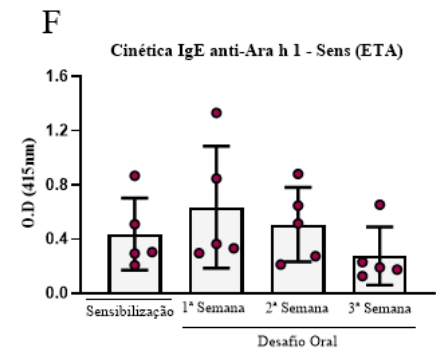
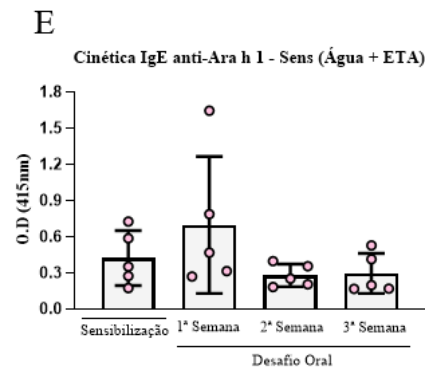
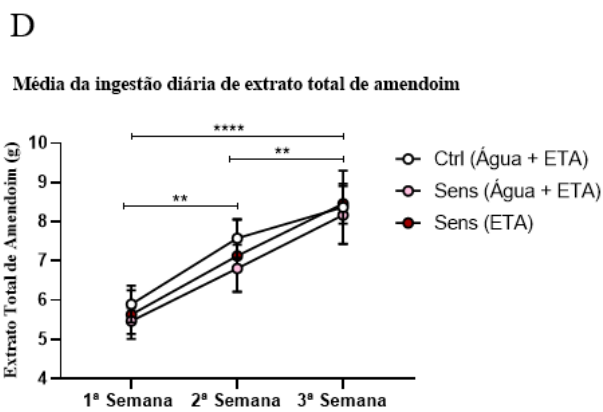
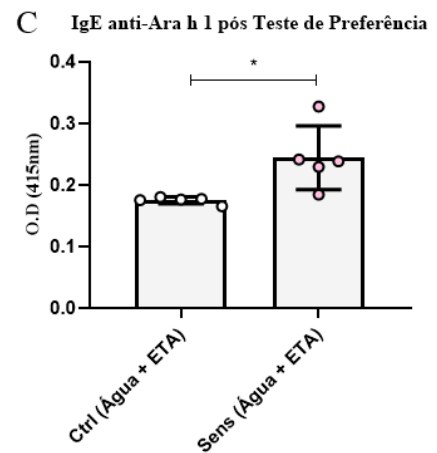
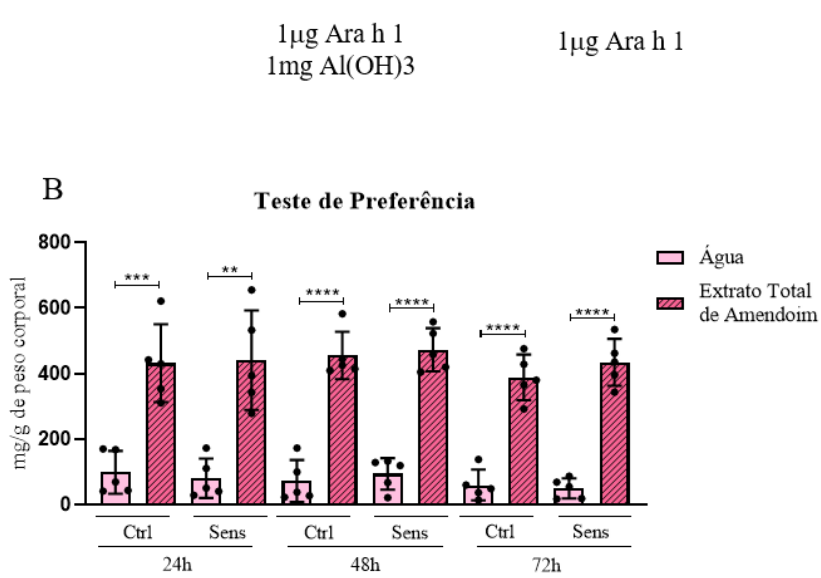
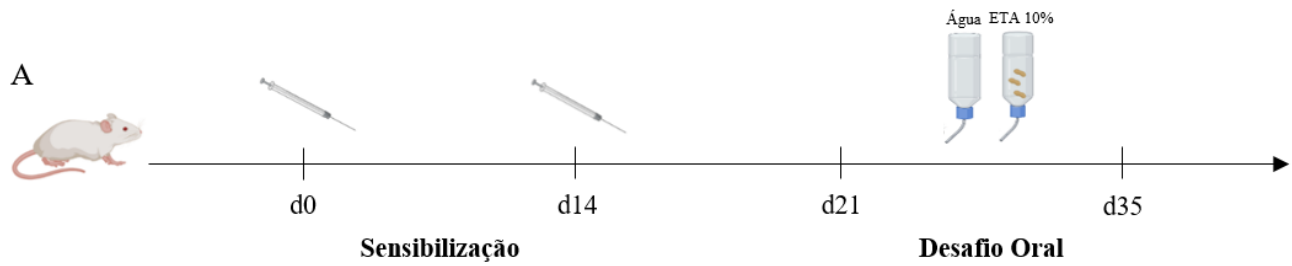
4.7 A ausência de aversão possibilita a dessensibilização espontânea

Seguindo a mesma lógica da abordagem experimental no contexto da alergia ao ovo, testou-se a hipótese de que a ausência da aversão permite o contato crônico com o antígeno e, conseqüentemente, o desenvolvimento da dessensibilização. Para que o

protocolo experimental ficasse equivalente ao apresentado nas sessões passadas, camundongos BALB/c foram sensibilizados com 1µg de Ara h 1, um dos principais alérgenos do amendoim (Palladino e Breiteneder, 2018), e divididos em dois grupos: Sens (Água + ETA) e Sens (ETA). Assim como o grupo Ctrl (Água + ETA), o grupo Sens (Água + ETA) pôde escolher entre ingerir água ou ETA durante três semanas de desafio oral (Fig. 9A). O grupo Sens (ETA), em contrapartida, só tinha a opção do ETA. Nesse experimento, usou-se o ETA na concentração de 10% para que a concentração proteica da solução antigênica ficasse equivalente à SCO. Antes do início do desafio oral, submetemos os camundongos dos grupos Ctrl (Água + ETA) e Sens (Água + ETA) a um teste de preferência durante 72h, para averiguar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no protocolo de sensibilização com o EPA (Fig. 9B). Observou-se uma alta preferência pelo ETA 10% por ambos os grupos, durante os três dias de teste de preferência (Fig. 9B), a despeito da produção de IgE anti-Ara h 1 pelo grupo Sens (Água + ETA) (Fig. 9C). Prosseguiu-se, então, para o desafio oral. Ao longo das três semanas, não houve diferença na ingestão de ETA 10% entre os grupos experimentais (Fig. 9D). Ou seja, ainda que pudesse ingerir água, o grupo Sens (Água + ETA) ingeriu ETA 10% tanto quanto os demais grupos experimentais. A quantidade de ETA 10% ingerida ao longo das semanas aumentou gradativamente, mostrando que, com o passar do tempo, a busca pelo ETA 10% se tornou mais expressiva. Diferentemente do modelo de alergia ao ovo, a cinética da produção de IgE e IgG1 não diferiu entre os grupos Sens (Água + ETA) e Sens (ETA). Em ambos, ao longo do desafio oral, não houve alterações na produção de IgE anti-Ara h 1 (Fig. 9E e F), mas um aumento progressivo na produção de IgG1 anti-Ara h 1 (Fig. 9G e H). Ao final do protocolo experimental, a concentração de IgE, IgG1 e IgG2a anti-Ara h 1 não diferiu entre os dois grupos (Fig. 9I-K). Por fim, ao expor os mastócitos da pele ao EPA (que contém Ara h 1), não observamos diferença no extravasamento vascular local entre os grupos Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) (Fig. 9L). Isso mostra que, tanto em relação à ingestão do antígeno, quanto à dinâmica na produção de imunoglobulinas, ter a opção da água não faz diferença para camundongos sensibilizados.

Sabendo-se da possível ausência de diferença entre os dois grupos sensibilizados e desafiados (Sens (Água + ETA) e Sens (ETA)), e para que houvesse mais clareza na investigação da dessensibilização, incluiu-se também um grupo sensibilizado com a mesma dose de Ara h 1 (1µg), e que ingeriu apenas água durante todo o desafio oral (Sens (Água)). Ao compará-lo aos demais grupos sensibilizados, o grupo Sens (Água) tinha

níveis maiores de IgE anti-Ara h 1 do que o grupo Sens (ETA) (Fig. 9I). Similarmente, o grupo Sens (Água) apresentou uma tendência a ter maiores níveis de IgE anti-Ara h 1 do que o grupo Sens (Água + ETA) (Fig. 9I). No entanto, não houve diferença nos níveis de IgG1 e IgG2a anti-Ara h 1 entre os três grupos (Fig. 9J e K). Em relação ao ensaio de anafilaxia cutânea, o grupo Sens (Água) apresentou apenas uma tendência a desenvolver reação mais grave do que o grupo Sens (ETA) (Fig. 9L). Por fim, ao avaliar a frequência de linfócitos Treg e Th2 nos linfonodos mesentéricos proximais, o grupo Sens (Água) apresentou uma maior frequência de linfócitos Treg do que o grupo Sens (Água + ETA) (Fig. 9M), assim como uma menor frequência de linfócitos Th2 do que o grupo Sens (ETA) (Fig. 9N). Sendo assim, o contato crônico com o antígeno nos grupos Sens (Água + ETA) e Sens (ETA) produziu uma redução nos níveis de IgE e uma pequena modulação na ativação de mastócitos em comparação ao grupo Sens (Água), o que aponta para um provável processo de dessensibilização, ainda que em meio à menor frequência de linfócitos Treg e maior frequência de linfócitos Th2.



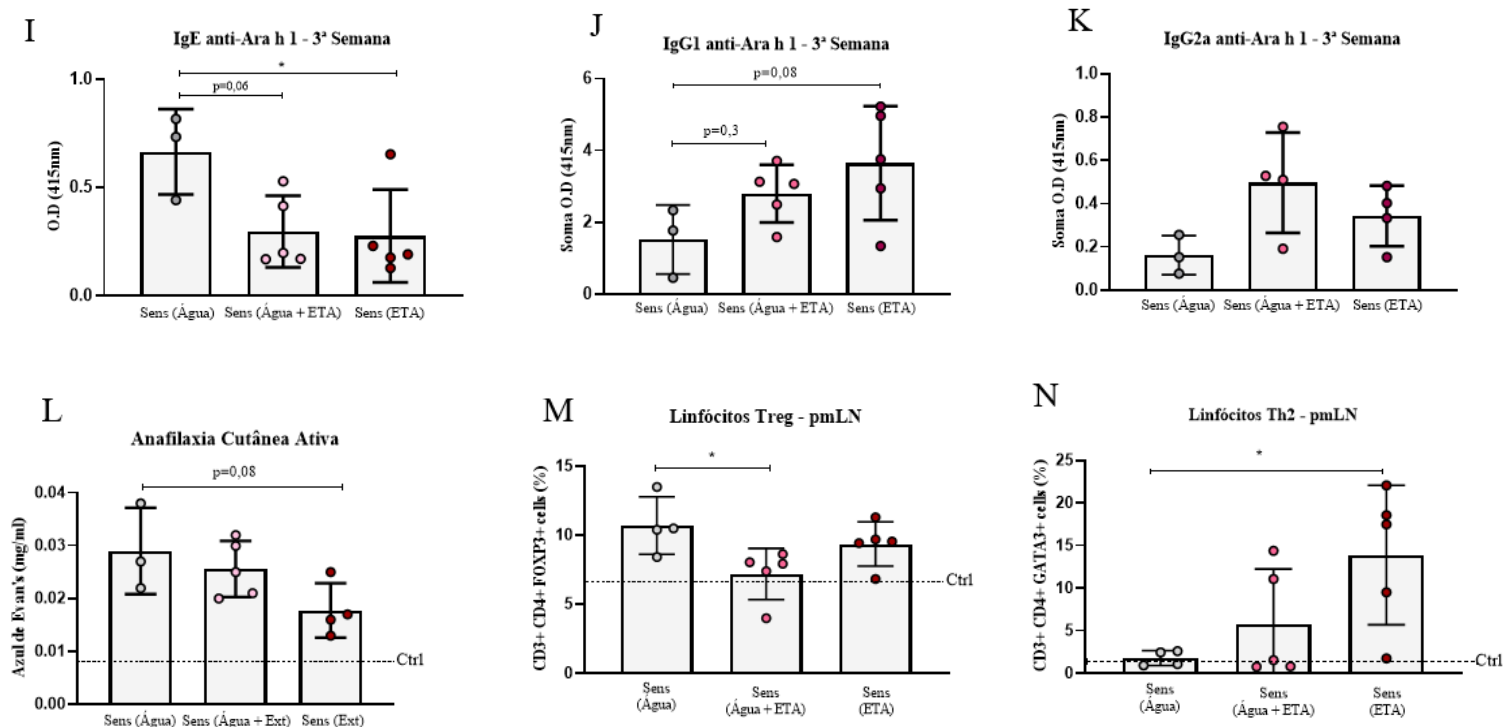


Figura 9. A ausência de aversão contribui para o contato crônico com o antígeno, favorecendo o processo de dessensibilização. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c dos grupos Sens (Água), (Água + ETA) e Sens (ETA) foram sensibilizados com 1 µg de Ara h 1 adsorvida em 1mg de Al(OH)₃, por via subcutânea, no dia 0. No dia 14, os camundongos receberam um boost com a mesma dose de antígeno, sem o adjuvante. Camundongos do grupo Ctrl (Água + ETA) receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, durante três semanas, os grupos Sens (Água + ETA) e Ctrl (Água + ETA) puderam escolher entre ingerir água e ETA 10%, enquanto o grupo Sens (Água) ingeriu apenas água e o grupo Sens (ETA) ingeriu apenas ETA 10%. (B) Antes do desafio oral, no dia 21, os camundongos dos grupos Sens (Água + ETA) e Ctrl (Água + ETA) passaram por um teste de preferência por 72h, (C) e após o teste, dosou-se os níveis séricos de IgE anti-Ara h 1. (D) Média da ingestão diária de ETA 10%, (E e F) níveis séricos de IgE anti-Ara h 1, (G e H) e níveis séricos de IgG1 anti-OVA ao longo do desafio oral. (L) Extravasamento de Azul de Evan's em ensaio de anafilaxia cutânea ativa após o desafio oral. (M) Frequência de linfócitos Treg e (N) Th2 nos linfonodos mesentéricos proximais após o desafio oral. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

4.8 A exposição crônica ao antígeno num contexto de ausência de aversão não está associada a um elevado custo fisiológico, mas gera alterações comportamentais

Ao contrário do modelo da alergia ao ovo, os camundongos sensibilizados ao Ara h 1 não perderam peso mediante a ingestão de ETA 10% ao longo das três semanas de desafio oral (Fig. 10A). No entanto, ao final do desafio oral, eles apresentaram alterações comportamentais. No teste campo aberto, ambos os grupos sensibilizados que ingeriram o ETA 10% entraram mais no centro do aparato que os grupos Sens (Água) e Ctrl (Água + ETA) (Fig. 10B). Em relação ao tempo de permanência no centro, apenas o grupo Sens (Água + ETA) apresentou um aumento em relação aos grupos Sens (Água) e Ctrl (Água

+ ETA) (Fig. 10C). Logo, o contato crônico com o antígeno o comportamento do tipo ansioso nos grupos Sens (Água + ETA) e Sens (ETA). Assim, na alergia ao amendoim, os custos do contato com o antígeno até o momento em que se alcança mudanças associadas à dessensibilização não são elevados como no contexto da alergia ao ovo, mas gera alterações comportamentais.

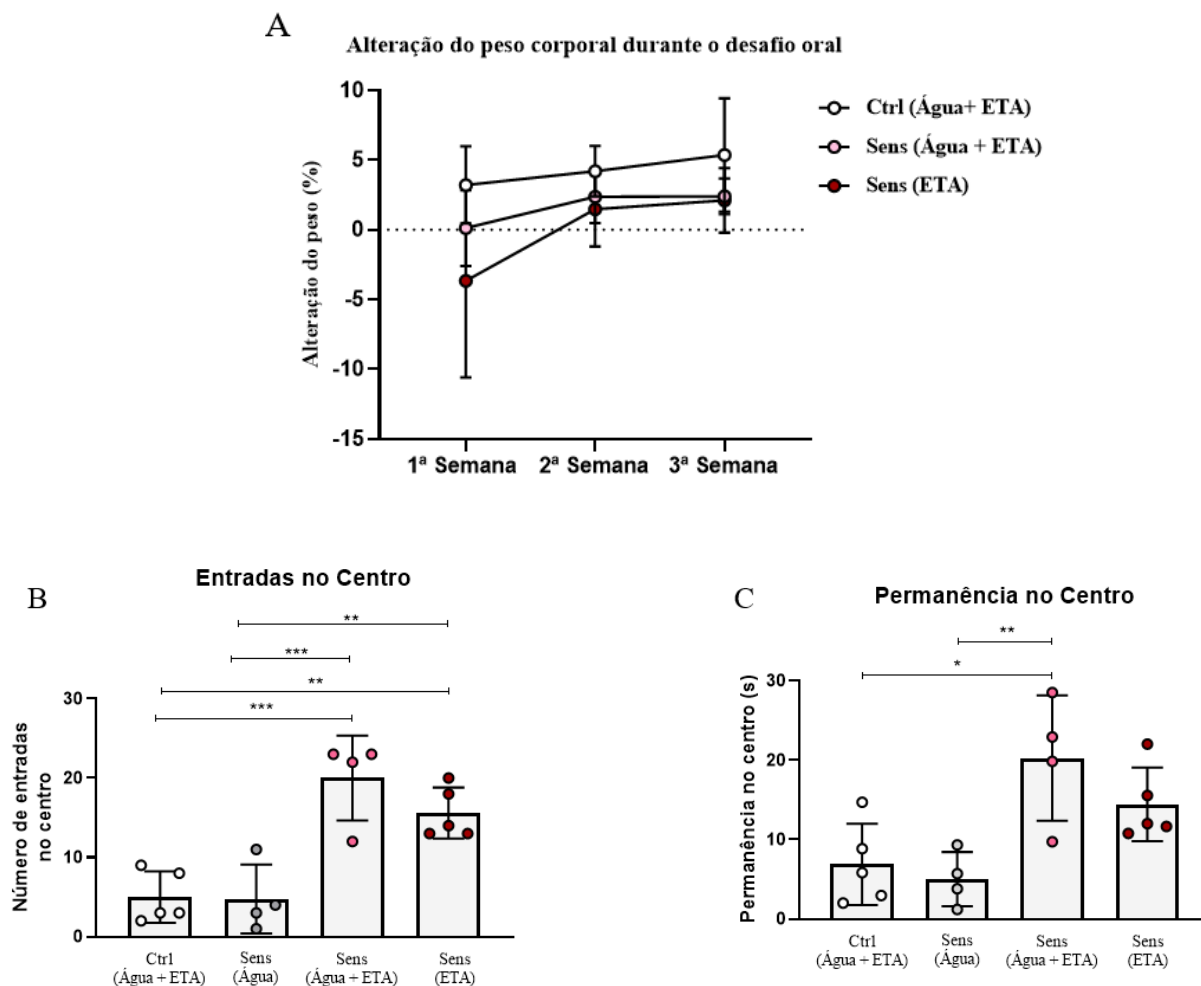


Figura 10. A dessensibilização ao Ara h 1 mediante a ingestão crônica de ETA não tem alto custo fisiológico, mas leva a alterações comportamentais. Camundongos BALB/c dos grupos Sens (Água), (Água + ETA) e Sens (ETA) foram sensibilizados com 1 µg de Ara h 1 adsorvida em 1 mg de Al(OH)₃, por via subcutânea, no dia 0. No dia 14, os camundongos receberam um boost com a mesma dose de antígeno, sem o adjuvante. Camundongos do grupo Ctrl (Água + ETA) receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, durante três semanas, os grupos Sens (Água + ETA) e Ctrl (Água + ETA) puderam escolher entre ingerir água e ETA 10%, enquanto o grupo Sens (Água) ingeriu apenas água e o grupo Sens (ETA) ingeriu apenas ETA 10%. (A) Variação de peso ao longo do desafio oral. (B) Após o desafio oral, os grupos Ctrl (Água + ETA), Sens (Água), Sens (Água + SCO) e Sens (SCO) foram submetidos ao teste Campo Aberto, no qual se mediu (B) o número de entradas no centro do aparato, (C) assim como o tempo de permanência no centro do aparato. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

4.9 O alto nível de aversão e o impacto da exposição ao antígeno no modelo de alergia à OVA pode estar relacionado a maior ativação de mastócitos

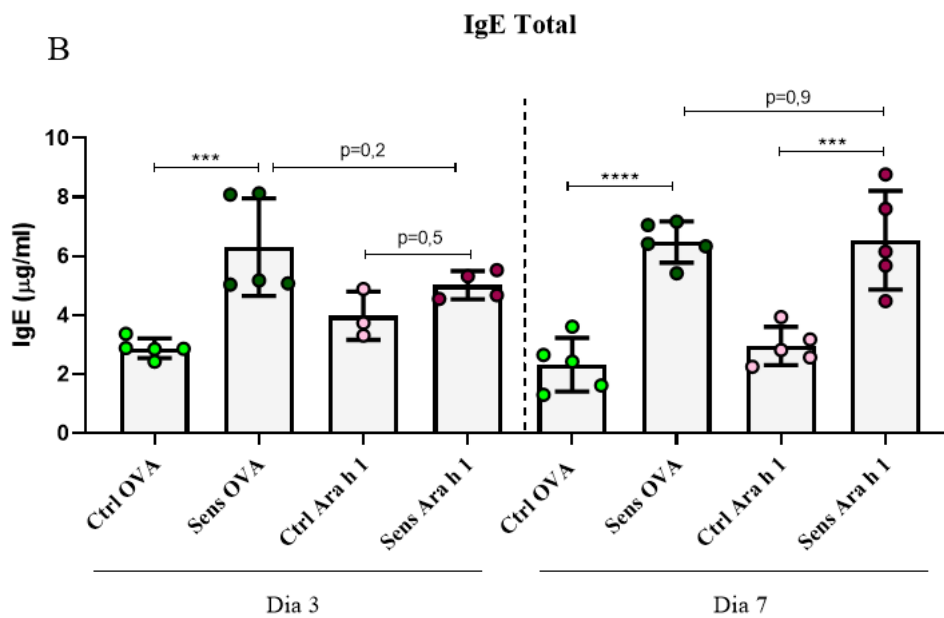
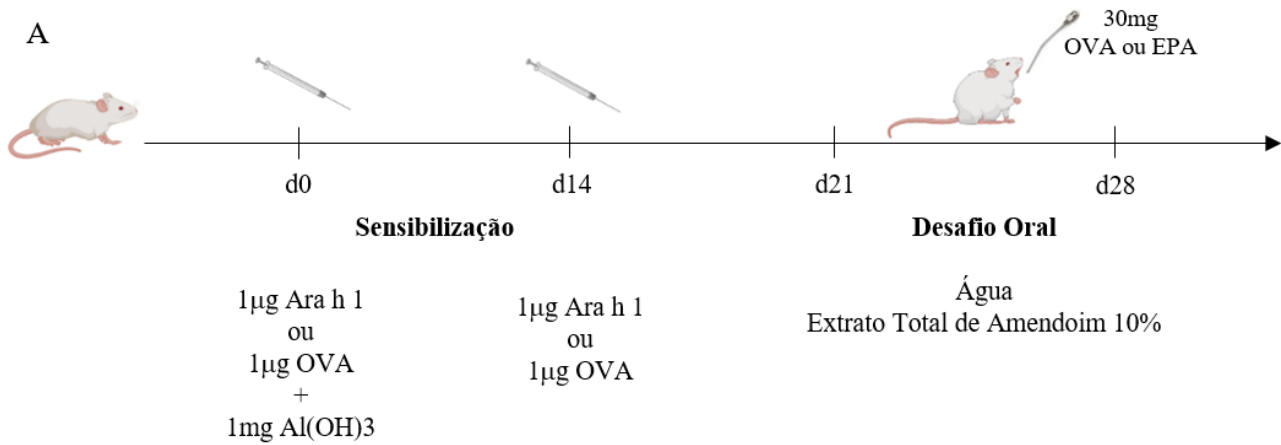
Até o presente momento, viu-se que camundongos alérgicos à OVA têm alto grau de aversão à SCO, fazendo com que haja exclusão desse alimento na dieta dos animais por um longo período. Em contrapartida, camundongos alérgicos ao Ara h 1 não apresentam aversão ao ETA 10%, o que favorece a manutenção desse alimento na dieta dos animais por um longo tempo. Sendo assim, pensou-se que essa diferença na relação entre os camundongos e o alimento alergênico deve-se a magnitude da resposta alérgica a nível de IgE e mastócitos, os quais são pivô da aversão e da inflamação. Para testar essa hipótese, assim como nos experimentos anteriores, sensibilizou-se camundongos BALB/c com 1µg de OVA ou 1µg de Ara h 1 (Sens OVA e Sens Ara h 1), e gavou-se 30mg de antígeno (OVA ou EPA, respectivamente) diariamente, por sete dias (Fig. 11A). Após três e sete dias, dosou-se IgE total e MCPT-1 para comparar ambos os grupos sensibilizados. Após 3 dias de desafio, não houve diferença nos níveis de IgE total entre os grupos Sens OVA e Sens Ara h 1, ao passo que apenas o grupo Sens OVA se diferenciou do seu grupo controle (Ctrl OVA) (Fig. 11B). Em relação ao MCPT-1, o grupo Sens OVA apresentou maiores níveis séricos do que o grupo Sens Ara h 1 e, da mesma forma, só ele se diferenciou do seu grupo controle (Ctrl OVA) (Fig. 11C).

Após sete dias de gavagem, a ausência de diferença nos níveis de IgE total e o maior nível de MCPT-1 manteve-se no grupo Sens OVA comparado ao grupo Sens Ara h 1 (Fig. 11B e C). No entanto, assim como o grupo Sens OVA, o grupo Sens Ara h 1 apresentou maiores níveis de IgE total e MCPT-1 do que seu grupo controle (Ctrl Ara h 1).

Por fim, investigou-se os níveis séricos de GDF-15 nesse mesmo contexto. No entanto, após três e sete dias de gavagem, não houve diferença entre os grupos Sens OVA e Sens Ara h 1 (Fig. 11D). Surpreendentemente, mesmo mediante maiores níveis de IgE e MCPT-1, nenhum dos grupos sensibilizados apresentou diferença nos níveis de GDF-15 em comparação aos seus respectivos controles, em nenhum dos pontos de análise.

Logo, apesar de não apresentar diferença nos níveis de IgE total, a maior concentração de MCPT-1 no grupo Sens OVA em relação ao Sens Ara h 1 indica uma maior ativação de mastócitos e, conseqüentemente, uma resposta alérgica mais robusta.

Isso pode explicar, em parte, a diferença da relação dos camundongos sensibilizados com o alimento alergênico entre os dois modelos.



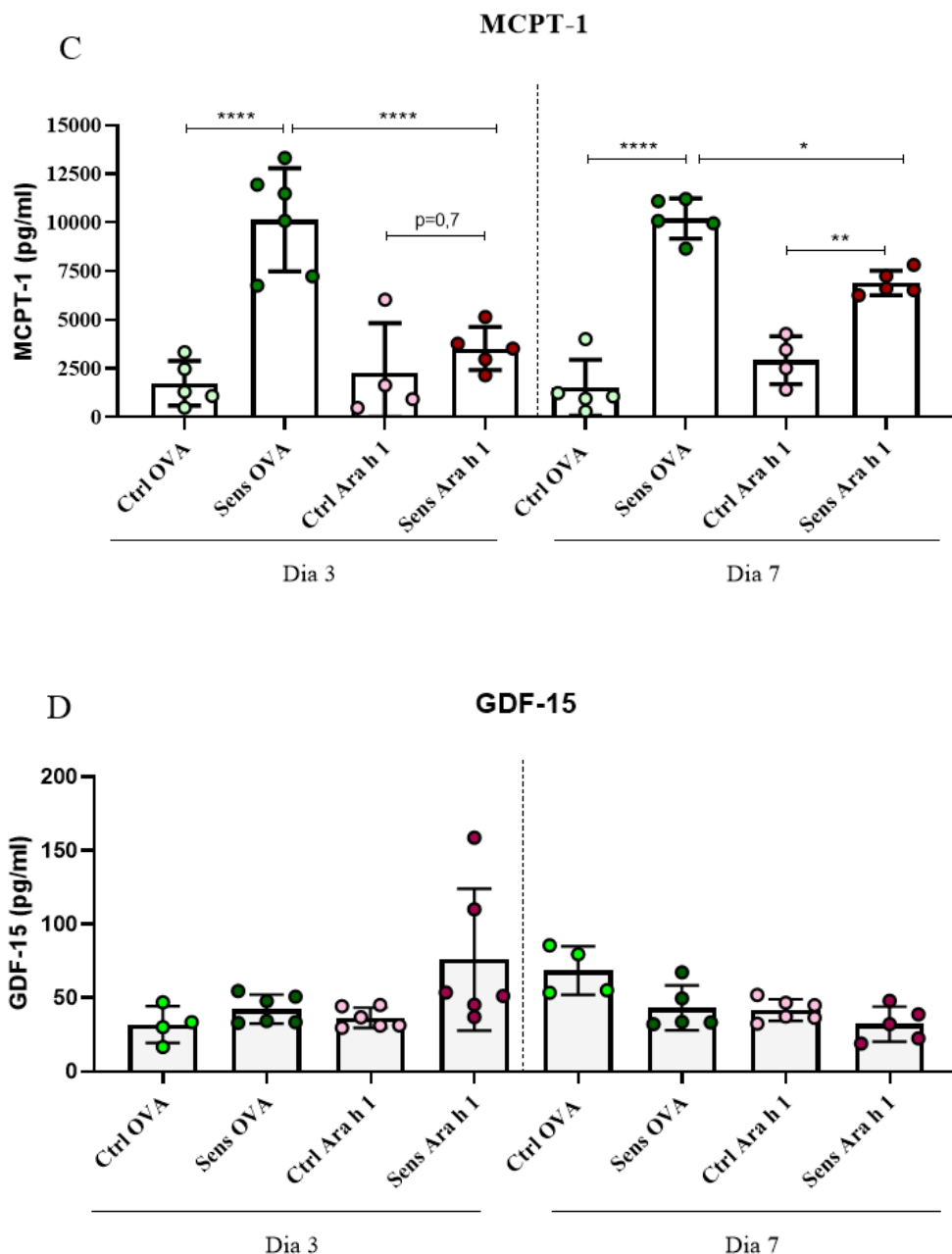


Figura 11. Camundongos sensibilizados à OVA apresentam maior ativação de mastócitos do que camundongos sensibilizados ao Ara h 1. (A) Imagem ilustrativa do protocolo experimental. Camundongos BALB/c dos grupos Sens OVA e Sens Ara h 1 foram sensibilizados com 1µg de OVA ou 1µg de Ara h 1, respectivamente, adsorvido em 1mg de Al(OH)₃, por via subcutânea, no dia 0. No dia 14, os mesmos grupos receberam um boost com a mesma dose de antígeno, sem o adjuvante. Camundongos dos grupos Ctrl OVA e Ctrl Ara h 1 receberam as mesmas injeções, sem o antígeno. A partir do dia 21, os grupos Sens OVA e Ctrl OVA receberam gavagens diárias de 30mg de OVA, enquanto os grupo Sens Ara h 1 e Ctrl Ara h 1 receberam gavagens diárias de 30mg de EPA. Ao final, dosou-se os níveis séricos de (B) IgE, (C) MCPT-1 e (D) GDF-15 de todos os grupos experimentais. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O modelo de alergia ao amendoim desenvolvido a partir da sensibilização com o EPA, seguida de desafio oral com o ETA, foi capaz de induzir a produção de IgE específica e a degranulação de mastócitos, eventos centrais nas alergias alimentares. Isso ocorreu tanto na linhagem BALB/c, quanto na linhagem C57BL/6. Alguns estudos apontam algumas diferenças nessas linhagens em modelos de alergia ao amendoim. Teixeira et al. (2008) mostraram que a sensibilização subcutânea com extrato proteico de amendoim leva a maiores níveis de Ig total em camundongos C57BL/6 comparados à linhagem BALB/c. Em um modelo de sensibilização oral, Smit et al. (2011) mostraram que, apesar de produzirem níveis similares de IgE e IgG1, camundongos C57BL/6 desafiados com extrato de amendoim desenvolveram anafilaxia mais grave do que camundongos BALB/c. No entanto, outro estudo utilizando sensibilização intraperitoneal mostrou que nenhuma das duas linhagens desenvolveram anafilaxia, principalmente quando comparado à linhagem C3H (Paolucci et al., 2023). No entanto, ao transferir o soro imune de camundongos C3H para camundongos BALB/c, mas não C57BL/6, foi possível observar uma resposta anafilática após desafio nos animais recipientes.

Apesar dessas diferenças, no presente estudo não houve a intenção de comparar a resposta imune ao EPA entre as linhagens BALB/c e C57BL/6. Na verdade, mostrou-se que, no modelo apresentado aqui, ambas as linhagens desenvolveram resposta imune condizente com a alergia alimentar, principalmente em relação à produção de IgE e à ativação de mastócitos. Baseado nisso, os fatores básicos e *upstream* da cascata de eventos que leva ao desenvolvimento da aversão (Florsheim et al., 2023), principal interesse do presente estudo, estavam presentes em ambas as linhagens. Sendo assim, pôde-se seguir com o estudo da relação entre camundongos sensibilizados e o alimento alergênico tanto na linhagem BALB/c, quanto na linhagem C57BL/6.

No modelo de alergia ao ovo, os camundongos já apresentam aversão logo após o ciclo de sensibilização (duas imunizações), sem passarem por contato prévio com o antígeno por via oral (Cara et al., 1994; Basso et al., 2003; Florsheim et al., 2023). Ao submeter os camundongos BALB/c e C57BL/6 ao teste de preferência logo após a sensibilização, os camundongos sensibilizados não apresentaram aversão ao ETA, a despeito da ativação dos mastócitos, os quais já se encontram sensibilizados com IgE anti-EPA nesse momento. Eles, na verdade, exibem uma preferência pela solução antigênica.

A ausência de aversão e de ativação da região da amígdala no cérebro após gavagem com EPA sugere que a magnitude da ativação dos mastócitos mediante ingestão do ETA logo após sensibilização não foi grande o suficiente. Em outras palavras, pode ser que a produção de IgE anti-EPA pré-desafio oral não esteja alta o suficiente para que o fenômeno da aversão aconteça. Ao fazer uma cinética da produção de IgE no modelo de alergia ao ovo, Batista et al. (2014) mostrou que os níveis séricos dessa imunoglobulina aumentam consideravelmente durante o desafio oral, alcançando valores maiores do que aqueles logo após a sensibilização. Logo, é possível que no modelo de alergia ao amendoim, o dia 21 do protocolo experimental não seja o melhor momento para se investigar o fenômeno da aversão.

Pensando nisso, os camundongos BALB/c e C57BL/6 foram submetidos a um teste de preferência após o desafio oral, quando os níveis circulantes de IgE se encontram, de fato, mais altos em comparação aos grupos controles. Nesse momento, apenas os camundongos BALB/c sensibilizados apresentaram aversão ao ETA 3%, o que coincidiu com maior ativação de mastócitos, maior produção de GDF-15, citocina essencial para a aversão, e, conseqüentemente, maior ativação da amígdala. É provável que, após o desafio oral, os níveis de IgE anti-EPA estejam mais elevados e, assim, a magnitude da ativação dos mastócitos tenha sido suficiente para que o fenômeno da aversão pudesse ser visualizado. Além disso, a inflamação da mucosa intestinal após o desafio oral (Oliveira, 2021) também pode ter somado ao efeito da produção de GDF-15. Na mucosa intestinal, os mastócitos se encontram próximos a neurônios sensoriais, havendo uma forte interação entre essas células (Stead et al., 1989; Veigas-Fernandes e Mucida, 2016). Apesar de não reverter, já foi mostrado que o uso de capsaicina para destruição de fibras do tipo C é capaz de diminuir a magnitude da aversão na alergia ao ovo (Basso et al., 2001). Assim, é possível que a ativação dos mastócitos e, conseqüentemente, de fibras sensoriais na mucosa intestinal ao longo dos dias de ingestão de ETA tenha contribuído, também, para o aparecimento da aversão após o desafio oral.

Diferentemente dos camundongos BALB/c, os camundongos C57BL/6 não apresentaram aversão após o desafio oral, o que coincidiu com ausência de diferença nos níveis de MCPT-1, GDF-15 e ativação da amígdala. Florsheim et al. (2023) mostraram que camundongos C57BL/6 aumentam a produção de IgE ao serem sensibilizados com OVA, possuem níveis mais altos de MCPT-1 no soro após repetidas gavagens, mas não são capazes de aumentar a produção de GDF-15. Conseqüentemente, eles não evitam a

ingestão de ovalbumina diluída em água. Os nossos achados corroboram esses dados. Por outro lado, outros estudos relataram aversão à SCO em camundongos C57BL/6 sensibilizados com OVA (Mirotti et al., 2010; Plum et al., 2023). O uso de um coquetel de citocinas do tipo dois (IL-3, IL-4 e IL-9) para otimizar a sensibilização, inclusive, aumenta a magnitude da aversão nessa linhagem (Plum et al., 2023). Logo, a aversão pode ser observada em camundongos C57BL/6. No entanto, essa aversão é facilmente contornada pela adição de sacarose à solução antigênica (Mirotti et al., 2010; Plum et al., 2023). Assim, como proposto por Mirotti et al. (2010) e Lemos et al. (2022), há um equilíbrio (ou desequilíbrio) entre sinais negativos (inflamação mediada por IgE) e positivos (sabor, valor biológico do alimento) que podem gerar conflito e, assim, interferir na escolha entre ingerir ou evitar o alimento alergênico. E isso pode ser mais facilmente modulado na linhagem C57BL/6. Isso ajuda a explicar o fato de que, no teste de preferência entre água e ETA 3% após o desafio oral, apesar desses camundongos não apresentarem aversão, o grupo Sens C57BL/6 também não apresentou preferência e não conseguiu ingerir a mesma quantidade de ETA 3% do que o grupo Ctrl.

A lógica da percepção dos valores negativos e positivos do alimento também pode explicar como o aumento da concentração do ETA de 3% para 10% restaurou a preferência pela solução antigênica em ambas as linhagens, mas de forma mais expressiva na linhagem BALB/c, que saiu da aversão para a preferência. O aumento da concentração de amendoim pode ter melhorado o sabor e as qualidades nutritivas do ETA, fazendo com que os camundongos sensibilizados insistam no contato com essa solução. Sendo assim, tomando como base o grupo Sens BALB/c, pode ser que logo após a sensibilização, os valores negativos provenientes da ativação de mastócitos não ultrapassem os valores positivos da experiência inicial com o ETA 3%. Porém, após o desafio oral, com o provável aumento dos níveis de IgE e inflamação da mucosa, os valores negativos sobressaem e a aversão se concretiza. No entanto, nesse mesmo contexto, ao aumentar a concentração de amendoim, mesmo que aumentando a disponibilidade de antígenos para interagir com os mastócitos, os valores positivos voltam a sobressair os negativos e, assim, a preferência é reestabelecida. Algo similar é observado em camundongos BALB/c sensibilizados à OVA. Apesar de não reverter a aversão, a adição de sacarose (4% ou 8%) à SCO ou de β -lactoglobulina à uma solução de ovalbumina melhora a aceitação da solução antigênica por camundongos sensibilizados (Mirotti et al., 2010; Lemos et al., 2022). Por fim, em um contexto mais dramático, a indução de choque elétrico não impede

a procura por bebida açucarada em modelos de compulsão alimentar (Oswald et al., 2011; Li et al., 2021), ilustrando bem a perspectiva da motivação pelo que é prazeroso.

Lemos et al. (2022) mostraram que camundongos sensibilizados à β -lactoglobulina preferem ingerir soro de leite à água em teste de preferência, e apresentam ativação do NAc, região essencial para o processamento de estímulos prazerosos, após desafio oral com β -lactoglobulina diluída em água. Baseado nisso, pensou-se que o valor hedônico (positivo) do amendoim é o que sustenta a preferência pela solução antigênica, mesmo que no contexto da sensibilização. Logo, investigamos a ativação do NAc após gavagem (pré-desafio oral) e após quatorze dias de ingestão de ETA 3% (pós-desafio oral). No entanto, não encontramos evidência de maior ativação do NAc nos camundongos sensibilizados, apenas nos grupos Ctrl. Isso pode se relacionar com o momento em que os cérebros foram coletados para análise. Através da técnica de optometria, Liu et al. (2024) mostraram que neurônios DR1⁺ (receptor de dopamina 1) e *Serpina2*⁺ na concha do NAc são ativados no início e diminuem sua atividade ao final de uma refeição. Além disso, esses neurônios projetam para hipotálamo lateral e contribuem para o controle da alimentação. De fato, ao ofertar a mamadeira com ETA 3% ou 10% aos animais Ctrl e Sens de ambas as linhagens, era perceptível a avidez com que os animais procuravam a mamadeira. Assim, é possível que o melhor momento para análise da ativação do NAc em camundongos Sens seja durante a ingestão do ETA.

Além disso, a insistência na ingestão do ETA 10% pelos camundongos BALB/c do grupo Sens aconteceu a despeito da maior ativação da amígdala. Em modelo de compulsão alimentar, Li et al. (2021) mostraram que ratos compulsivos bebem alta quantidade de bebida açucarada mesmo diante de condições que provocam medo e induzem a ativação da amígdala. Isso foi explicado por uma maior motivação pela sacarose em comparação ao medo dos estímulos estressores, por um efeito ansiolítico do açúcar, e por uma ativação persistente do NAc e do hipotálamo lateral. Logo, uma análise mais cuidadosa dessas demais áreas cerebrais relacionadas à motivação por um alimento hedônico ajudará a compreender a insistência no contato com o antígeno no modelo de alergia ao amendoim.

Uma mudança comportamental amplamente observada em modelos de alergia alimentar é o comportamento do tipo ansioso (Basso et al., 2003; Smith et al., 2021; Hu et al., 2025; Germundson et al., 2018; Germundson et al., 2020). No teste Campo Aberto,

camundongos sensibilizados e desafiados com β -lactoglobulina ou OVA, por exemplo, evitam entrar e ficar no centro do aparato (Smith et al., 2021; Hu et al., 2025), evidenciando um aumento da ansiedade em decorrência da resposta imune alérgica. No presente modelo, após serem desafiados, camundongos sensibilizados BALB/c e C57BL/6 apresentaram o oposto. Eles entraram mais e permaneceram por mais tempo no centro do aparato comparado aos grupos controles. Isso sugere que o ETA possui um efeito ansiolítico no contexto da alergia.

Algo parecido foi observado em modelo de alergia ao leite, no qual camundongos que ingeriram soro de leite apresentaram uma redução no comportamento do tipo ansioso (Lemos et al., 2022). De fato, estudos mostraram que a administração oral de leite de vaca ou intraperitoneal de hidrolisado triptico de caseína em camundongos e ratos, respectivamente, diminuem o comportamento do tipo ansioso de maneira similar a fármacos como o diazepam (dela Peña et al., 2015; Miclo et al., 2001). Sendo assim, é possível que a ingestão de ETA tenha efeitos similares. Em um estudo randomizado com 63 indivíduos adultos saudáveis, aqueles que consumiram 25g de amendoim por dia, durante seis meses, apresentaram um menor escore de ansiedade comparado ao grupo controle (Parilli-Moser et al., 2021). Esse efeito se associou a compostos funcionais do amendoim, como polifenóis, e à produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino. Em um estudo com camundongos, o extrato etanólico da casca do amendoim foi capaz de diminuir o comportamento do tipo depressivo, e modular a produção de neurotransmissores e a expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro (Gao et al., 2023). Não há informação se a semente do amendoim tem o mesmo efeito em camundongos, mas esses dados mostram como o amendoim e suas estruturas podem ter efeito sobre transtornos de humor.

Observando-se que a aversão ao ETA pode ser moldada para que o camundongos sensibilizado continue a ingerir o alimento alergênico, e que o contato crônico com o antígeno pode gerar dessensibilização, pensou-se que a baixa aversão pode contribuir para a dessensibilização voluntária. Em contrapartida, a alta aversão pode impedir a concretização desse processo. Assim, testou-se essas hipóteses com os modelos de alergia ao amendoim e ao ovo, respectivamente.

No modelo de alergia ao ovo, primeiramente foi determinado o protocolo de sensibilização que geraria a maior produção de IgE e, conseqüentemente, o maior nível

de aversão. A partir disso, testou-se a hipótese citada anteriormente. De maneira intrigante, a menor dose de OVA (1µg) foi a que gerou a maior produção de IgE. Esse fenômeno foi descrito na década de 70 por Vaz et al. (1971) e diversos outros estudos confirmaram esse achado (Sakai et al., 1999; Lee et al., 2013; Chudakov et al., 2020). Apesar disso, o mecanismo por trás desse fenômeno permanece pouco claro. Linfócitos T foliculares 13 (Tfh13), produtores de IL-4 e IL-13, controlam a reação do centro germinativo e promovem a produção de IgE de alta afinidade em respostas alérgicas (Gowthaman et al., 2019; Chandrakar et al., 2025). Os Tfh são gerados a partir da interação com células apresentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas. Comparando-se a dispersão de antígeno nos linfonodos após administração de baixa ou alta dose de antígeno, Gerner et al. (2017) mostraram que no contexto de baixas doses, os antígenos se concentram nas margens dos linfonodos, onde há um número maior de células dendríticas especializadas em apresentar antígenos via MHC II. Assim, é possível que em baixas doses, os antígenos sejam preferencialmente captados por células dendríticas capazes de gerar linfócitos T CD4⁺, a partir dos quais as células Tfh são geradas. No entanto, como isso se traduz em uma indução preferencial de linfócitos Tfh13 e em uma dinâmica no centro germinativo favorável à troca de isotipo para IgE, permanece desconhecido.

Os camundongos do grupo Sens (SCO) dessensibilizaram mediante a ingestão crônica do antígeno. Isso só ocorreu porque eles não tinham outra escolha a não ser ingerir a SCO. A opção da água, no entanto, impediu que o grupo Sens (Água + SCO) passasse pelo mesmo processo. Isso mostra que a aversão, ao passo que protege contra a inflamação, impede a dessensibilização voluntária. Nas alergias alimentares, a dessensibilização tem papel importante, pois além de aumentar a tolerabilidade ao antígeno (permitindo a ingestão de alimentos desejados que contenha baixa quantidade do alérgeno), diminui a possibilidade de reações anafiláticas mediante exposição acidental ao antígeno em níveis que, antes da sensibilização, causariam esse problema.

Nos camundongos, esse processo de dessensibilização foi caracterizado por uma diminuição na produção de IgE, um aumento na produção de anticorpos do tipo IgG (IgG1 e IgG2a), e uma menor ativação de mastócitos. A queda na produção de IgE da primeira para a segunda semana pós-desafio oral pode ter relação com a apoptose de plasmócitos produtores de IgE. Vecchione et al. (2024) mostraram que plasmócitos IgE⁺ de vida curta

surtem nos linfonodos drenantes em menos de três semanas pós-sensibilização, e essas células são passíveis de sofrer apoptose mediante ativação persistente (Newman e Tolar et al., 2021). Assim, é possível que, durante a sensibilização com 1µg de OVA e a primeira semana de desafio oral, haja um acúmulo de plasmócitos IgE⁺. Durante a segunda semana, com a persistência do antígeno, esses plasmócitos de vida curta podem sofrer apoptose, diminuindo a quantidade de células produtoras de IgE, e permanecendo apenas os plasmócitos de vida longa.

Além da curta vida de plasmócitos IgE⁺, outros fatores podem ter contribuído para a queda na produção desse anticorpo. Linfócitos T reguladores foliculares (Tfr) são capazes de diminuir a troca de isotipo para IgE através da produção de neuritina e interação via CTLA-4 (Gonzalez-Figueroa et al., 2021; Wing et al., 2014). A produção de IL-21 por Tfh também interfere nesse processo a partir de uma interação direta com linfócitos B (Yang et al., 2020). Há, também, evidência de que oligômeros de CD23 são importantes para a regulação da produção de IgE (Kilmon et al., 2001). Assim, alguns desses processos podem aumentar durante a exposição crônica ao antígeno para que haja um controle na produção de IgE.

Concomitantemente à diminuição de IgE, houve um aumento na produção de anticorpos do tipo IgG (IgG1 e IgG2a). Utilizando um modelo animal e amostra de humanos, Burton et al. (2014) mostrou que a fração de IgG do soro de camundongos ou humanos que passaram por protocolos de OIT foi capaz de inibir a ativação de mastócitos ou basófilos sensibilizados com soro rico em IgE. Essa inibição acontece principalmente pela ativação do receptor inibitório FcγRII, mas também pode ocorrer pelo bloqueio de epitopos que estariam disponíveis para interação com a IgE. No entanto, os autores não descreveram qual subclasse de IgG é mais importante nesse processo.

Além de ser inibido por anticorpos do tipo IgG, os mastócitos também apresentam alterações favoráveis pós-OIT. Eles apresentaram expressão reduzida de CD63, molécula envolvida na degranulação, produzem menores níveis de IL-4 e maiores de IL-10 (Takasato et al., 2020). Além disso, a presença dessas células durante a OIT é essencial para a geração de linfócitos Treg supressores da resposta alérgica, provavelmente mediado pela produção de IL-2. Assim, além de modular a produção de anticorpos, a exposição crônica ao antígeno pode causar alterações favoráveis na função de mastócitos, tornando-os menos suscetíveis à degranulação e propagação da inflamação alérgica.

Esses mecanismos ajudam a explicar a anafilaxia cutânea menos grave no grupo Sens (SCO).

Ao contrário do que foi observado no modelo de alergia ao ovo, a presença da água durante três semanas de desafio oral não impediu que camundongos sensibilizados ao Ara h 1 ingerissem o ETA. Sendo assim, ambos os grupos Sens (Água + ETA) e Sens (ETA), de maneira voluntária ou não, respectivamente, foram cronicamente expostos ao antígeno. Em decorrência disso, os camundongos apresentaram mudanças que apontam para um provável processo de dessensibilização. Logo, nesse contexto, a ausência da aversão possibilitou a provável dessensibilização espontânea dos animais. A palavra provável foi aplicada aqui porque, apesar de ambos os grupos Sens (Água + ETA) e Sens (ETA) apresentarem um aumento progressivo nos níveis de IgG1 e uma diminuição nos níveis de IgE anti-Ara h 1 comparados ao grupo Sens (Água), apenas o grupo Sens (ETA) teve uma menor reação anafilática cutânea em comparação ao grupo Sens (Água). Os mecanismos envolvidos nessa dessensibilização podem ser explicados pelo que já foi discutido anteriormente sobre os mastócitos e os anticorpos do tipo IgG e IgE.

A dessensibilização pós ingestão crônica de ETA não foi relacionada a um aumento na frequência de linfócitos Treg nos linfonodos mesentéricos proximais. Apesar de um aumento na frequência dessa subpopulação ser comumente detectado após OIT (Takasato et al., 2020), esse efeito não é consistente em todos os estudos. Em um modelo de alergia ao ovo, a OIT com múltiplos epitopos do antígeno foi capaz de diminuir IgE, IL-4 e os sinais clínicos da alergia sem alterações na frequência de linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ (Rupa e Mine, 2012). A ausência de um aumento detectável na frequência de Tregs não quer dizer que Treg antígeno-específicas não tenham sido geradas ao longo do contato crônico com o antígeno. Além disso, células Treg específicas obtidas após OIT apresentam atividade supressora mais robusta do que aquelas obtidas na ausência de OIT (Syed et al., 2014). Dessa maneira, no presente estudo, a função dos linfócitos Treg pode estar aumentada sem que ocorra mudanças na sua frequência. Por fim, os camundongos do grupo Sens (ETA) apresentaram maior frequência de linfócitos Th2, a despeito da dessensibilização. Vonk et al. (2017) relataram que camundongos dessensibilizados por OIT também apresentaram maior frequência dessas células nos linfonodos mesentéricos. No entanto, esses animais produziam níveis reduzidos de IL-5 e IL-13, citocinas do tipo 2. A análise da produção de citocinas em cultura de linfonodos mesentéricos, a marcação intracelular de citocinas em linfócitos Th2, e a investigação de marcadores de ativação

ou exaustão celular podem ajudar a entender melhor a função desses linfócitos Th2 com frequência aumentada.

A diferença na relação entre os camundongos sensibilizados e os alimentos alergênicos nos modelos de alergia à OVA e ao Ara h 1 sugere diferença na gravidade dessas duas condições. É possível que nesses modelos, a alergia ao ovo seja mais grave do que a alergia ao amendoim. Como descrito anteriormente e reproduzido nesse estudo, camundongos alérgicos ao ovo perdem uma alta porcentagem de peso corporal durante o desafio oral (Dourado et al., 2011), sinal clínico associado à gravidade de diversas condições patológicas. Além disso, como já discutido anteriormente, a alergia ao ovo leva os animais a desenvolverem um comportamento do tipo ansioso (Basso et al., 2003; Hu et al., 2025). Já no modelo de alergia ao amendoim, não foi detectado perda de peso ao longo do desafio oral, nem aquisição de comportamento do tipo ansioso. Assim, os custos fisiológicos do contato com o antígeno no contexto da alergia ao ovo parecem ser mais altos do que na alergia ao amendoim. Logo, na alergia ao ovo, a aversão pode ser o comportamento mais adequado perante a SCO, ainda que na presença de estímulos prazerosos (sacarose). Já na alergia ao amendoim, a preferência ou insistência na ingestão do ETA pode fazer mais sentido para o animal do que a aversão, do ponto de vista fisiológico, pois trata-se de um alimento palatável com alto valor biológico que não causa sintomas clínicos exacerbados. Ou seja, os animais conseguem sustentar, “pagar o preço” pela inclusão do ETA em sua dieta, mesmo estando sensibilizados.

Para melhor investigar essa diferença na gravidade das duas alergias em camundongos BALB/c, eles foram sensibilizados com OVA ou Ara h 1 e, em seguida, desafiados com a mesma dose de antígeno (OVA ou EPA) por sete dias. Apesar de não haver diferença na produção de IgE, os camundongos sensibilizados com OVA apresentaram maiores níveis de MCPT-1 no soro, indicando maior degranulação de mastócitos e, assim, maior gravidade. Como isso foi observado com níveis similares de IgE entre as duas condições de sensibilização, pode ser que camundongos BALB/c produzam IgE anti-OVA com afinidade mais elevada do que IgE anti-Ara h 1. De fato, a afinidade da IgE é crucial para a ativação de mastócitos (Xiong et al., 2012). No entanto, esse dado também pode ser explicado pela diferença no antígeno do desafio. Enquanto os camundongos sensibilizados com OVA foram desafiados com 30mg do próprio antígeno (OVA), os camundongos sensibilizados com Ara h 1 foram desafiados com 30mg de EPA, o qual contém diversas outras proteínas além do Ara h 1. Pode ser que a quantidade

de antígenos disponíveis para interagir com os mastócitos tenha sido um fator determinante para a diferença notada na produção de MCPT-1. Assim, ainda não está claro o quanto os resultados observados nesse trabalho têm relação com a gravidade das alergias ao ovo e ao amendoim.

Por fim, Florsheim et al. (2021) propõem que a aversão no contexto da alergia alimentar reflete a integração do sistema imune no Sistema de Controle de Qualidade de Alimentos do organismo. Segundo eles, substâncias nocivas que são incapazes de ser detectadas pelo olfato, sabor ou receptores no epitélio do trato gastrointestinal são marcados indiretamente pela produção de IgE reativa às proteínas do alimento que carrega essas substâncias nocivas. Ou seja, a proteína alimentar se torna a representação das substâncias nocivas. Dessa maneira, a aversão ao alimento seria uma forma de evitar o contato com aquelas substâncias nocivas associadas a ele, um processo análogo ao condicionamento pavloviano. Segundo os autores, esse é um processo fisiológico, não patológico; o que faz sentido, uma vez que a aversão é um fenômeno altamente agudo, já detectável nos primeiros dez minutos de exposição ao antígeno (Florsheim et al., 2023), sem que haja a necessidade de grande inflamação para que ele aconteça. Assim, para os autores que propõem essa lógica, a alergia alimentar é uma exacerbação da aversão e, portanto, o espelho patológico desse fenômeno fisiológico ligado ao Sistema de Controle de Qualidade de Alimentos do organismo.

Apesar de muito bem embasada e logicamente sólida, os dados obtidos no presente trabalho e por outros (Lemos et al., 2022) aponta lacunas nessa proposição que tenta explicar o sentido biológico da aversão e das alergias alimentares. Primeiramente, no presente modelo de alergia ao amendoim e em modelo similar de alergia ao leite (Lemos et al., 2022), a sensibilização nem sempre gera aversão. Os camundongos escolhem ingerir a solução que contém o antígeno a despeito da produção de IgE e da ativação de mastócitos. Além disso, como observado em estudos clínicos, existem indivíduos que possuem IgE para antígenos da dieta, mas não apresentam sintomas mediante seu consumo (Dor-Wojnarowska et al., 2017; Rockmann et al., 2014) e, assim, não teriam motivo aparente para rejeitar o alimento. No entanto, segundo a hipótese de Florsheim et al. (2021), os camundongos citados anteriormente deveriam apresentar aversão, e esses indivíduos que possuem um quadro fisiológico (não patológico) de sensibilização deveriam rejeitar o alimento alergênico, o que é pouco provável. Essas observações sugerem que a aversão pode ser parte de um contexto patológico que antecipe

a nível cognitivo os perigos de uma alergia especificamente grave. Em outras palavras, pode ser que nem toda alergia gere aversão, mas toda aversão esteja associada à alergia potencialmente grave, num contexto já patológico, não fisiológico.

Além disso, até o momento, não há evidência científica da associação entre sensibilização a proteínas dietéticas e substâncias nocivas carregadas pelo alimento ou por uma refeição. Levando em consideração que intoxicações alimentares não são frequentes, seria um desperdício, do ponto de vista biológico, sacrificar a inclusão de um alimento na dieta por período indeterminado por causa de um evento esporádico.

Por fim, isso nos leva ao último ponto, que é valor biológico do alimento. A hipótese da aversão mediada pelo sistema imune como parte do Sistema de Controle de Qualidade de Alimentos leva em consideração o valor negativo da ingestão do alimento a partir da IgE, mas reflete pouco sobre os valores positivos ofertados pelo alimento alergênico, como o sabor e o conteúdo de nutrientes. Os resultados apresentados aqui trazem essa nova perspectiva. Pode ser que em contextos nos quais é possível suportar as consequências da resposta imune alérgica, o valor negativo atribuído a partir da produção de IgE seja secundário aos valores positivos da experiência de ingerir o alimento alergênico. Possivelmente, esses sinais são integrados no sistema nervoso central, levando os animais a escolher o que faça mais sentido biológico para eles: ingerir ainda que haja um custo. Nesse contexto, a dessensibilização se torna um mecanismo imunológico favorável, pois diminui a resposta inflamatória a partir da geração de mecanismos que inibem o início da principal via de ativação da aversão: a degranulação de mastócitos. Assim, no Sistema de Controle de Qualidade de Alimentos, o sistema imune pode ser fonte de sinais que favoreçam tanto a exclusão quanto inclusão de alimentos na dieta. Nas alergias, ao passo que a IgE “atribui valor negativo” ao alimento, esse valor pode ir se tornando cada vez menor com o aumento da produção de IgG, um possível “atribuidor de valor positivo” ao alimento. Isso pode ser observado pelo fato de que, tanto nos camundongos sensibilizados à OVA e ao Ara h 1, a ingestão persistente e o aumento da aceitação do alimento alergênico ocorrem concomitantemente à elevação dos níveis séricos de IgG1. Logo, o valor biológico do alimento pode desempenhar um papel importante na escolha entre a aversão e a inclusão do alimento na dieta nas alergias alimentares. Em ambos os contextos, o sistema imune possui ferramentas que auxiliam os animais a fazer e manter sua escolha.

6. CONCLUSÃO

No presente modelo de alergia ao amendoim, os camundongos sensibilizados apresentam pouca aversão alimentar, pois ela é facilmente moldada pelo aumento da palatabilidade do extrato total de amendoim, mesmo mediante a ativação de mastócitos. Isso favorece a inclusão do alimento alergênico na dieta, o que, a longo prazo, leva a um provável processo de dessensibilização.

7. REFERÊNCIAS

- Albert-Bayo, M.; Paracuellos, I.; González-Castro, A.M.; Rodríguez-Urrutia, A.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Alonso-Cotoner C.; Santos, J.; Vicario, M. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells*, v. 8, n. 2, 2019.
- Apostolovic, D.; Stanic-Vucinic, D.; de Jongh, H.H.; de Jong, G.A.; Mihailovic, J.; Radosavljevic, J.; Radibratovic, M.; Nordlee, J.A.; Baumert, J.L.; Milcic, M.; Taylor, S.L.; Garrido Clua, N.; Cirkovic Velickovic, T.; Koppelman, S.J. Conformational stability of digestion-resistant peptides of peanut conglutins reveals the molecular basis of their allergenicity. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–12, 2016.
- Ashley SE, Lloyd M, Loke P, Orsini F, Lozinsky AC, O'Sullivan MD, Quinn P, Gold M, Tang MLK. Allergen-Specific IgE is a Stronger Predictor of Remission Following Peanut Oral Immunotherapy Than Age in Children Aged 1-10 Years. *Allergy*. 2025 Mar;80(3):843-848. doi: 10.1111/all.16451. Epub 2024 Dec 26. PMID: 39723600.
- Bai L, Sivakumar N, Yu S, Mesgarzadeh S, Ding T, Ly T, Corpuz TV, Grove JCR, Jarvie BC, Knight ZA. Enteroendocrine cell types that drive food reward and aversion. *Elife*. 2022 Aug 1;11:e74964. doi: 10.7554/eLife.74964. PMID: 35913117; PMCID: PMC9363118.
- Baik JH. Dopaminergic Control of the Feeding Circuit. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2021 Apr;36(2):229-239. doi: 10.3803/EnM.2021.979. Epub 2021 Apr 6. PMID: 33820393; PMCID: PMC8090468.
- Bannon, G.A. What makes a food protein an allergen? *Curr Allergy Asthma Rep*, v. 4, n. 1, 2004.
- Basso AS, de Sá-Rocha LC, Palermo-Neto J. Immune-induced flavor aversion in mice: modification by neonatal capsaicin treatment. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9(2):88-94. doi: 10.1159/000049011. PMID: 11549890.
- Basso, A.S.; Pinto, F.A.; Russo, M.; Britto, L.R.; De Sá-Rocha, L.C.; Palermo-Neto, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *Journal of Neuroimmunology*, v. 140, n. 1–2, p. 69–77, 2003.
- Batista NV, Pereira RV, Noviello ML, Dourado LP, Perez DA, Foureaux G, Ferreira AJ, Ferreira AV, Cara DC. Prolonged ingestion of ovalbumin diet by sensitized mice improves the metabolic consequences induced by experimental food allergy. *Clin Exp Immunol*. 2014 Dec;178(3):416-27. doi: 10.1111/cei.12435. PMID: 25112154; PMCID: PMC4238869.
- Beeler JA, McCutcheon JE, Cao ZF, Murakami M, Alexander E, Roitman MF, Zhuang X. Taste uncoupled from nutrition fails to sustain the reinforcing properties of food. *Eur J Neurosci*. 2012 Aug;36(4):2533-46. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08167.x. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22712685; PMCID: PMC3424366.

Burton OT, Logsdon SL, Zhou JS, Medina-Tamayo J, Abdel-Gadir A, Noval Rivas M, Koleoglou KJ, Chatila TA, Schneider LC, Rachid R, Umetsu DT, Oettgen HC. Oral immunotherapy induces IgG antibodies that act through Fc γ RIIb to suppress IgE-mediated hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Dec;134(6):1310-1317.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.042. Epub 2014 Jul 16. PMID: 25042981; PMCID: PMC4261076.

Campbell, D. E.; Mehr, S. Fifty years of allergy: 1965-2015. *Journal of Paediatrics and Child Health*, v. 51, n. 1, p. 91–93, 2015.

Cara, D. C.; Conde, A. A.; Vaz, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1994.

Cara, D. C.; Conde, A. A.; Vaz, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 45, n. 1, p. 16–20, 1997.

Cardoso V, Chesné J, Ribeiro H, García-Cassani B, Carvalho T, Bouchery T, Shah K, Barbosa-Morais NL, Harris N, Veiga-Fernandes H. Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature*. 2017 Sep 14;549(7671):277-281. doi: 10.1038/nature23469. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28869974; PMCID: PMC5714273.

Chambers KC. Conditioned taste aversions. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2018 May 5;4(1):92-100. doi: 10.1016/j.wjorl.2018.02.003. PMID: 30035267; PMCID: PMC6051479.

Chandrakar P, Nelson CS, Podestà MA, Cavazzoni CB, Gempler M, Lee JM, Richardson S, Zhang H, Samarpita S, Ciofani M, Chatila T, Kuchroo VK, Sage PT. Progressively differentiated T_{FH}13 cells are stabilized by JunB to mediate allergen germinal center responses. *Nat Immunol*. 2025 Mar;26(3):473-483. doi: 10.1038/s41590-025-02077-y. Epub 2025 Jan 31. PMID: 39891019; PMCID: PMC12169414.

Chinthrajah, R.S.; Hernandez, J.D.; Boyd, S.D.; Galli, S.J.; Nadeau, K.C. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J Allergy Clin Immunol*, v. 137, n. 4, p. 984-997, 2016.

Chu, D.K.; Llop-Guevara, A.; Walker, T.D.; Flader, K.; Goncharova, S.; Boudreau, J.E.; Moore, C.L.; Seunghyun In, T.; Wasserman, S.; Coyle, A.J.; Kolbeck, R.; Humbles, A.A.; 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.

Chudakov DB, Ryasantsev DY, Tsaregorotseva DS, Kotsareva OD, Fattakhova GV, Svirshchevskaya EV. Tertiary lymphoid structure related B-cell IgE isotype switching and secondary lymphoid organ linked IgE production in mouse allergy model. *BMC Immunol*. 2020 Aug 7;21(1):45. doi: 10.1186/s12865-020-00376-7. PMID: 32767965; PMCID: PMC7412793.

Cohen CG, Zhao WW, Ke D, Beaudette L, Lejtenyi D, McCusker C, Zhang X, Chan ES, Upton JEM, Grunebaum E, Clarke AE, Mazer BD, Ben-Shoshan M. Elevated Cow's Milk-Specific IgE Levels Prior to Oral Immunotherapy Decrease the Likelihood of Reaching the Maintenance Dose. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2022 Jan;10(1):215-221.e2. doi: 10.1016/j.jaip.2021.11.005. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34793979.

Coil JD, Norgren R. Taste aversions conditioned with intravenous copper sulfate: attenuation by ablation of the area postrema. *Brain Res*. 1981 May 18;212(2):425-33. doi: 10.1016/0006-8993(81)90474-1. PMID: 7225877.

Costa-Pinto, F.A.; Basso, A.S.; De Sá-Rocha, L.C.; Britto, L.R.; Russo, M.; Palermo-Neto J. Neural correlates of IgE-mediated allergy. *Ann N Y Acad Sci*, p. 116-131, 2006.

Darby M, Schnoeller C, Vira A, Culley FJ, Bobat S, Logan E, Kirstein F, Wess J, Cunningham AF, Brombacher F, Selkirk ME, Horsnell WG. The M3 muscarinic receptor is required for optimal adaptive immunity to helminth and bacterial infection. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 28;11(1):e1004636. doi: 10.1371/journal.ppat.1004636. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2015 Mar 19;11(3):e1004727. doi: 10.1371/journal.ppat.1004727.. Culley, Fiona [corrected to Culley, Fiona Jane]. PMID: 25629518; PMCID: PMC4309615.

dela Peña IJ, Hong E, de la Peña JB, Kim HJ, Botanas CJ, Hong YS, Hwang YS, Moon BS, Cheong JH. Milk Collected at Night Induces Sedative and Anxiolytic-Like Effects and Augments Pentobarbital-Induced Sleeping Behavior in Mice. *J Med Food*. 2015 Nov;18(11):1255-61. doi: 10.1089/jmf.2015.3448. Epub 2015 Jun 4. PMID: 26501383; PMCID: PMC4638207.

Dor-Wojnarowska A, Liebhart J, Miecielica J, Rabski M, Fal A, Samoliński B, Nittner-Marszalska M. The Impact of Sex and Age on the Prevalence of Clinically Relevant Sensitization and Asymptomatic Sensitization in the General Population. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017 Jun;65(3):253-261. doi: 10.1007/s00005-016-0425-7. Epub 2016 Sep 20. PMID: 27652380; PMCID: PMC5434121.

Dourado, L.P.; Saldanha, J.C.; Gargiulo, D.L.; Noviello, M.L.; Brant, C.C.; Reis, M.L.; Souza, R.M.; Faria, A.M.; Souza, D.G.; Cara, D.C. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. *Cellular Immunology*, v. 262, n. 1, p. 62–68, 2010.

Egecioglu E, Jerlhag E, Salomé N, Skibicka KP, Haage D, Bohlooly-Y M, Andersson D, Bjursell M, Perrissoud D, Engel JA, Dickson SL. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol*. 2010 Jul;15(3):304-11. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00216.x. Epub 2010 May 6. PMID: 20477752; PMCID: PMC2901520.

El Ansari YS, Kanagaratham C, Burton OT, Santos JV, Hollister BA, Lewis OL, Renz H, Oettgen HC. Allergen-Specific IgA Antibodies Block IgE-Mediated Activation of Mast Cells and Basophils. *Front Immunol*. 2022 Jul 5;13:881655. doi: 10.3389/fimmu.2022.881655. PMID: 35865546; PMCID: PMC9294179.

Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ AP, Urban JF Jr, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity*. 2007

Feb;26(2):191-203. doi: 10.1016/j.immuni.2006.12.006. Epub 2007 Feb 8. PMID: 17292640; PMCID: PMC1892589.

Esterházy, D.; Canesso, M.C.C.; Mesin, L.; Muller, P.A.; de Castro, T.B.R.; Lockhart, A.; ElJalby, M.; Faria, A.M.C.; Mucida, D. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. *Nature*, v. 569, n. 7754, p. 126–130, 2019.

Florsheim, E.B.; Sullivan, Z.A.; Khoury-Hanold, W.; Medzhitov, R. Food allergy as a biological food quality control system. *Cell*, v. 184, n. 6, p. 1440-1454, 2021.

Florsheim EB, Bachtel ND, Cullen JL, Lima BGC, Godazgar M, Carvalho F, Chatain CP, Zimmer MR, Zhang C, Gautier G, Launay P, Wang A, Dietrich MO, Medzhitov R. Immune sensing of food allergens promotes avoidance behaviour. *Nature*. 2023 Aug;620(7974):643-650. doi: 10.1038/s41586-023-06362-4. Epub 2023 Jul 12. PMID: 37437602; PMCID: PMC10432274.

Gao AX, Xia TC, Peng ZT, Wu QY, Zhu Y, Dong TT, Tsim KW. The ethanolic extract of peanut shell attenuates the depressive-like behaviors of mice through modulation of inflammation and gut microbiota. *Food Res Int*. 2023 Jun;168:112765. doi: 10.1016/j.foodres.2023.112765. Epub 2023 Mar 27. PMID: 37120215.

Germundson, D.L.; Smith, N.A.; Vendsel, L.P.; Kelsch, A.V.; Combs, C.K.; Nagamoto-Combs, K. Oral sensitization to whey proteins induces age- and sex-dependent behavioral abnormality and neuroinflammatory responses in a mouse model of food allergy: a potential role of mast cells. *J Neuroinflammation*, v. 15, n. 1, 2018.

Germundson, D.L.; Vendsel, L.P.; Nagamoto-Combs, K. Region-specific regulation of central histaminergic H3 receptor expression in a mouse model of cow's milk allergy. *Brain Res*, 2020.

Gerner MY, Casey KA, Kastenmuller W, Germain RN. Dendritic cell and antigen dispersal landscapes regulate T cell immunity. *J Exp Med*. 2017 Oct 2;214(10):3105-3122. doi: 10.1084/jem.20170335. Epub 2017 Aug 28. PMID: 28847868; PMCID: PMC5626399.

Ghobadi Dana V, Fallahpour M, Shoormasti RS, Nabavi M, Bemanian MH, Fateh M, Zaker Z, Torabizadeh M, Aghapour SA, Arshi S. Oral Immunotherapy in Patients with IgE Mediated Reactions to Egg White: A Clinical Trial Study. *Immunol Invest*. 2022 Apr;51(3):630-643. doi: 10.1080/08820139.2020.1863979. Epub 2021 Jul 26. PMID: 34309462.

Gonzalez-Figueroa P, Roco JA, Papa I, Núñez Villacís L, Stanley M, Linterman MA, Dent A, Canete PF, Vinuesa CG. Follicular regulatory T cells produce neuritin to regulate B cells. *Cell*. 2021 Apr 1;184(7):1775-1789.e19. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.027. Epub 2021 Mar 11. PMID: 33711260.

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*. 2019 Aug 30;365(6456):eaaw6433. doi: 10.1126/science.aaw6433. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31371561; PMCID: PMC6901029.

Han W, Tellez LA, Perkins MH, Perez IO, Qu T, Ferreira J, Ferreira TL, Quinn D, Liu ZW, Gao XB, Kaelberer MM, Bohórquez DV, Shammah-Lagnado SJ, de Lartigue G, de Araujo IE. A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. *Cell*. 2018 Oct 18;175(3):665-678.e23. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.049. Epub 2018 Sep 20. Erratum in: *Cell*. 2018 Oct 18;175(3):887-888. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.018. PMID: 30245012; PMCID: PMC6195474.

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

Hu S, Zhou C, Zhang Y, Li L, Yu X. OVA-Induced Food Allergy Leads to Neurobehavioral Changes in Mice and the Potential Role of Gut Microbiota and Metabolites Dysbiosis. *Int J Mol Sci*. 2025 May 16;26(10):4760. doi: 10.3390/ijms26104760. PMID: 40429903; PMCID: PMC12111871.

Ibiza S, García-Cassani B, Ribeiro H, Carvalho T, Almeida L, Marques R, Misic AM, Bartow-McKenney C, Larson DM, Pavan WJ, Eberl G, Grice EA, Veiga-Fernandes H. Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature*. 2016 Jul 21;535(7612):440-443. doi: 10.1038/nature18644. Epub 2016 Jul 13. PMID: 27409807; PMCID: PMC4962913.

Ingram DK. Lithium chloride-induced taste aversion in C57BL/6J and DBA/2J mice. *J Gen Psychol*. 1982 Apr;106(2d Half):233-49. PMID: 6284873.

Jacobson, A.; Yang, D.; Vella, M.; Chiu, I.M. The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal Immunol*, v. 14, n. 3, p. 555-565, 2021.

Jerlhag E, Janson AC, Waters S, Engel JA. Concomitant release of ventral tegmental acetylcholine and accumbal dopamine by ghrelin in rats. *PLoS One*. 2012;7(11):e49557. doi: 10.1371/journal.pone.0049557. Epub 2012 Nov 14. PMID: 23166710; PMCID: PMC3498203.

Júnior REM, Pedersen ASB, Ferreira RM, de Asevedo GH, Mendes GL, Ribeiro K, Maioli TU, de Faria AMC, Brunialti-Godard AL. Behavioral changes and transcriptional regulation of mesolimbic dopaminergic genes in a mouse model of binge eating disorder by diet intermittent access. *J Nutr Biochem*. 2025 Jan;135:109784. doi: 10.1016/j.jnutbio.2024.109784. Epub 2024 Oct 18. PMID: 39426552.

Kaushik A, Dunham D, Han X, Do E, Andorf S, Gupta S, Fernandes A, Kost LE, Sindher SB, Yu W, Tsai M, Tibshirani R, Boyd SD, Desai M, Maecker HT, Galli SJ, Chinthrajah RS, DeKruyff RH, Manohar M, Nadeau KC. CD8⁺ T cell differentiation status correlates with the feasibility of sustained unresponsiveness following oral immunotherapy. *Nat Commun*. 2022 Nov 4;13(1):6646. doi: 10.1038/s41467-022-34222-8. PMID: 36333296; PMCID: PMC9636180.

- Kayyal H, Yiannakas A, Kolatt Chandran S, Khamaisy M, Sharma V, Rosenblum K. Activity of Insula to Basolateral Amygdala Projecting Neurons is Necessary and Sufficient for Taste Valence Representation. *J Neurosci*. 2019 Nov 20;39(47):9369-9382. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0752-19.2019. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31597726; PMCID: PMC6867822.
- Keswani T, LaHood NA, Marini-Rapoport O, Karmakar B, Andrieux L, Reese B, Sneed SL, Pedersen LC, Mueller GA, Patil SU. Neutralizing IgG₄ antibodies are a biomarker of sustained efficacy after peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2024 Jun;153(6):1611-1620.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2024.02.017. Epub 2024 Mar 7. PMID: 38460677; PMCID: PMC11894811.
- Kilmon MA, Ghirlando R, Strub MP, Beavil RL, Gould HJ, Conrad DH. Regulation of IgE production requires oligomerization of CD23. *J Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3139-45. doi: 10.4049/jimmunol.167.6.3139. PMID: 11544299.
- Kobayashi, T.; Iijima, K.; Dent, A.L.; 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, 2017.
- Kulis M, Yue X, Guo R, Zhang H, Orgel K, Ye P, Li Q, Liu Y, Kim E, Burks AW, Vickery BP. High- and low-dose oral immunotherapy similarly suppress pro-allergic cytokines and basophil activation in young children. *Clin Exp Allergy*. 2019 Feb;49(2):180-189. doi: 10.1111/cea.13256. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30126028; PMCID: PMC6353702.
- Lee HS, S, Khandelwal P, Saban DR. Ocular allergy modulation to hi-dose antigen sensitization is a Treg-dependent process. *PLoS One*. 2013 Sep 27;8(9):e75769. doi: 10.1371/journal.pone.0075769. PMID: 24086630; PMCID: PMC3785421.
- Lemos, L.; Assis, H.C.; Alves, J.L.; Reis, D.S.; Campos Canesso, M.C.; Almeida Oliveira, M.; Moreira, T.G.; Miranda Sato, B.K.; Batista, L.A.; Gomes Lenzi, J.; Moraes, M.A.; Melo, L.; Resende, B.; Aguiar, D.; Rezende Souza, B.; Cara, D.C.; Gomes-Santos, A.C.; Faria, A.M.C. Neuroimmune circuits involved in β -lactoglobulin-induced food allergy. *Brain Behav Immun Health*, v. 23, n. 100471, 2022.
- Lewis RG, Florio E, Punzo D, Borrelli E. The Brain's Reward System in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1344:57-69. doi: 10.1007/978-3-030-81147-1_4. PMID: 34773226; PMCID: PMC8992377.
- Li ZF, Chometton S, Guèvremont G, Timofeeva E, Timofeev I. Compulsive Eating in a Rat Model of Binge Eating Disorder Under Conditioned Fear and Exploration of Neural Mechanisms With *c-fos* mRNA Expression. *Front Neurosci*. 2021 Nov 29;15:777572. doi: 10.3389/fnins.2021.777572. PMID: 34912190; PMCID: PMC8666959.
- Lin JY, Arthurs J, Reilly S. Conditioned taste aversions: From poisons to pain to drugs of abuse. *Psychon Bull Rev*. 2017 Apr;24(2):335-351. doi: 10.3758/s13423-016-1092-8. PMID: 27301407; PMCID: PMC5857059.

Liu Y, Wang Y, Zhao ZD, Xie G, Zhang C, Chen R, Zhang Y. A subset of dopamine receptor-expressing neurons in the nucleus accumbens controls feeding and energy homeostasis. *Nat Metab.* 2024 Aug;6(8):1616-1631. doi: 10.1038/s42255-024-01100-0. Epub 2024 Aug 15. Erratum in: *Nat Metab.* 2025 Apr;7(4):856. doi: 10.1038/s42255-025-01285-y. PMID: 39147933; PMCID: PMC11349581.

Ma, L.; Danoff, T. M.; 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, abr. 2014.

Meachum CL, Bernstein IL. Conditioned responses to a taste conditioned stimulus paired with lithium chloride administration. *Behav Neurosci.* 1990 Oct;104(5):711-5. doi: 10.1037//0735-7044.104.5.711. PMID: 2173933.

Miclo L, Perrin E, Driou A, Papadopoulos V, Boujrad N, Vanderesse R, Boudier JF, Desor D, Linden G, Gaillard JL. Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha(s1)-casein with benzodiazepine-like activity. *FASEB J.* 2001 Aug;15(10):1780-2. doi: 10.1096/fj.00-0685fje. PMID: 11481228.

Mirotti, L.; Castro, J.; Costa-Pinto, F.A.; Russo M. Neural pathways in allergic inflammation. *J Allergy (Cairo)*, 2010.

Mirotti L, Mucida D, de Sá-Rocha LC, Costa-Pinto FA, Russo M. Food aversion: a critical balance between allergen-specific IgE levels and taste preference. *Brain Behav Immun.* 2010 Mar;24(3):370-5. doi: 10.1016/j.bbi.2009.12.006. Epub 2009 Dec 24. PMID: 20035860.

Monian B, Tu AA, Ruitter B, Morgan DM, Petrossian PM, Smith NP, Gierahn TM, Ginder JH, Shreffler WG, Love JC. Peanut oral immunotherapy differentially suppresses clonally distinct subsets of T helper cells. *J Clin Invest.* 2022 Jan 18;132(2):e150634. doi: 10.1172/JCI150634. PMID: 34813505; PMCID: PMC8759778.

Montalban E, Giralt A, Taing L, Nakamura Y, Pelosi A, Brown M, de Pins B, Valjent E, Martin M, Nairn AC, Greengard P, Flajolet M, Hervé D, Gambardella N, Roussarie JP, Girault JA. Operant Training for Highly Palatable Food Alters Translating Messenger RNA in Nucleus Accumbens D₂ Neurons and Reveals a Modulatory Role of Ncdn. *Biol Psychiatry.* 2024 May 15;95(10):926-937. doi: 10.1016/j.biopsych.2023.08.006. Epub 2023 Aug 12. PMID: 37579933; PMCID: PMC11059129.

Mora JR, von Andrian UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol.* 2008 Mar;1(2):96-109. doi: 10.1038/mi.2007.14. Epub 2008 Jan 23. PMID: 19079167.

Moriyama S, Brestoff JR, Flamar AL, Moeller JB, Klose CSN, Rankin LC, Yudanin NA, Monticelli LA, Putzel GG, Rodewald HR, Artis D. β_2 -adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. *Science.* 2018 Mar 2;359(6379):1056-1061. doi: 10.1126/science.aan4829. PMID: 29496881.

Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, Mortha A, Leboeuf M, Li XM, Mucida D, Stanley ER, Dahan S, Margolis KG, Gershon MD, Merad M, Bogunovic M. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*. 2014 Jul 17;158(2):300-313. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.050. Erratum in: *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1210. Dosage error in article text. PMID: 25036630; PMCID: PMC4149228.

Newman R, Tolar P. Chronic calcium signaling in IgE⁺ B cells limits plasma cell differentiation and survival. *Immunity*. 2021 Dec 14;54(12):2756-2771.e10. doi: 10.1016/j.immuni.2021.11.006. Epub 2021 Dec 7. PMID: 34879220.

Nozawa A, Okamoto Y, Movérare R, Borres MP, Kurihara K. Monitoring Ara h 1, 2 and 3-sIgE and sIgG4 antibodies in peanut allergic children receiving oral rush immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014 Jun;25(4):323-8. doi: 10.1111/pai.12243. PMID: 24953293.

Oliveira, MFA. Novo modelo murino de alergia alimentar ao amendoim. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2021.

Oswald KD, Murdaugh DL, King VL, Boggiano MM. Motivation for palatable food despite consequences in an animal model of binge eating. *Int J Eat Disord*. 2011 Apr;44(3):203-11. doi: 10.1002/eat.20808. PMID: 20186718; PMCID: PMC2941549. Palladino, C.; Breiteneder, H. Peanut allergens. *Molecular Immunology*, v. 100, n. April, p. 58–70, 2018.

Palosuo K, Karisola P, Savinko T, Fyhrquist N, Alenius H, Mäkelä MJ. A Randomized, Open-Label Trial of Hen's Egg Oral Immunotherapy: Efficacy and Humoral Immune Responses in 50 Children. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021 May;9(5):1892-1901.e1. doi: 10.1016/j.jaip.2021.01.020. Epub 2021 Jan 30. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2021 Jun;9(6):2553. doi: 10.1016/j.jaip.2021.05.002. PMID: 33529723.

Paolucci M, Wullemin N, Homère V, Bieli D, Köhli A, Ballmer-Weber B, Waeckerle-Men Y, Pengo N, Kundig TM, Sonati T, Johansen P. Targeting Ara h 2 with human-derived monoclonal antibodies prevents peanut-induced anaphylaxis in mice. *Allergy*. 2023 Jun;78(6):1605-1614. doi: 10.1111/all.15659. Epub 2023 Feb 7. PMID: 36704937.

Parilli-Moser I, Domínguez-López I, Trius-Soler M, Castellví M, Bosch B, Castro-Barquero S, Estruch R, Hurtado-Barroso S, Lamuela-Raventós RM. Consumption of peanut products improves memory and stress response in healthy adults from the ARISTOTLE study: A 6-month randomized controlled trial. *Clin Nutr*. 2021 Nov;40(11):5556-5567. doi: 10.1016/j.clnu.2021.09.020. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34656952.

Patil SU, Ogunniyi AO, Calatroni A, Tadigotla VR, Ruitter B, Ma A, Moon J, Love JC, Shreffler WG. Peanut oral immunotherapy transiently expands circulating Ara h 2-specific B cells with a homologous repertoire in unrelated subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Jul;136(1):125-134.e12. doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.026. Epub 2015 May 16. PMID: 25985925; PMCID: PMC4494892.

Patriarca G, Nucera E, Roncallo C, Pollastrini E, Bartolozzi F, De Pasquale T, Buonomo A, Gasbarrini G, Di Campli C, Schiavino D. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Feb;17(3):459-65. doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01468.x. Erratum in: *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 May 1;17(9):1205. PMID: 12562461.

Patriarca C, Romano A, Venuti A, Schiavino D, Di Rienzo V, Nucera E, Pellegrino S. Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol (Madr).* 1984 Jul-Aug;12(4):275-81. PMID: 6507224.

Pinhas A, Aviel M, Koen M, Gurgov S, Acosta V, Israel M, Kakuriev L, Guskova E, Fuzailov I, Touzani K, Sclafani A, Bodnar RJ. Strain differences in sucrose- and fructose-conditioned flavor preferences in mice. *Physiol Behav.* 2012 Jan 18;105(2):451-9. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.010. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21945373; PMCID: PMC3225606.

Plum T, Binzberger R, Thiele R, Shang F, Postrach D, Fung C, Fortea M, Stakenborg N, Wang Z, Tappe-Theodor A, Poth T, MacLaren DAA, Boeckxstaens G, Kuner R, Pitzer C, Monyer H, Xin C, Bonventre JV, Tanaka S, Voehringer D, Vanden Berghe P, Strid J, Feyerabend TB, Rodewald HR. Mast cells link immune sensing to antigen-avoidance behaviour. *Nature.* 2023 Aug;620(7974):634-642. doi: 10.1038/s41586-023-06188-0. Epub 2023 Jul 12. PMID: 37438525; PMCID: PMC10432277.

Purswani P, Kim EH. Food allergy: History, definitions and treatment approaches. *J Food Allergy.* 2022 Jul 1;4(2):22-27. doi: 10.2500/jfa.2022.4.220007. PMID: 39021846; PMCID: PMC11250212.

Rao, M.; Gershon, M.D. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, v. 13, n. 9, p. 517-528, 2016.
Renz, H.; Allen, K.J.; Sicherer, S.H.; Sampson, H.A.; Lack, G.; Beyer, K.; Oettgen, H.C. Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, 2018.

Röckmann H, van Geel MJ, Knulst AC, Huiskes J, Bruijnzeel-Koomen CA, de Bruin-Weller MS. Food allergen sensitization pattern in adults in relation to severity of atopic dermatitis. *Clin Transl Allergy.* 2014 Mar 28;4(1):9. doi: 10.1186/2045-7022-4-9. PMID: 24679244; PMCID: PMC4022323.

Rupa P, Mine Y. Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. *Allergy.* 2012 Jan;67(1):74-82. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02724.x. Epub 2011 Sep 27. PMID: 21950267.

Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin Exp Immunol.* 1999 Oct;118(1):9-15. doi: 10.1046/j.1365-2249.1999.01036.x. PMID: 10540153; PMCID: PMC1905391.
Sampson, H. A. Food allergy: Past, present and future. *Allergology International*, v. 65, n. 4, p. 363–369, 2016.

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.

Santos AF, James LK, Kwok M, McKendry RT, Anagnostou K, Clark AT, Lack G. Peanut oral immunotherapy induces blocking antibodies but does not change the functional characteristics of peanut-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jan;145(1):440-443.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2019.09.005. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31676085.

Savilahti EM, Kuitunen M, Savilahti E, Mäkelä MJ. Specific antibodies in oral immunotherapy for cow's milk allergy: kinetics and prediction of clinical outcome. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;164(1):32-9. doi: 10.1159/000361023. Epub 2014 May 17. PMID: 24853260.

Sclafani A, Ackroff K. Flavor preference conditioning by different sugars in sweet ageusic Trpm5 knockout mice. *Physiol Behav*. 2015 Mar 1;140:156-63. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.12.027. Epub 2014 Dec 12. PMID: 25497884; PMCID: PMC4313566.

Sclafani A, Ackroff K. Flavor preferences conditioned by nutritive and non-nutritive sweeteners in mice. *Physiol Behav*. 2017 May 1;173:188-199. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.02.008. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28192132; PMCID: PMC5357161.

Shreffler, W.G.; Castro, R.R.; Kucuk, Z.Y.; Charlop-Powers, Z.; Grishina, G.; Yoo, S.; Burks, A.W.; 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, S. H.; Sampson, H. A. 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, R.P.; de Castro, R.O.; Barbu, E.A.; 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.

Skripak JM, Nash SD, Rowley H, Brereton NH, Oh S, Hamilton RG, Matsui EC, Burks AW, Wood RA. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Dec;122(6):1154-60. doi: 10.1016/j.jaci.2008.09.030. Epub 2008 Oct 25. PMID: 18951617; PMCID: PMC3764488.

Smit JJ, Willemsen K, Hassing I, Fiechter D, Storm G, van Bloois L, Leusen JH, Pennings M, Zaiss D, Pieters RH. Contribution of classic and alternative effector pathways in peanut-induced anaphylactic responses. *PLoS One*. 2011;6(12):e28917. doi: 10.1371/journal.pone.0028917. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22194949; PMCID: PMC3237567.

Smith NA, Germundson DL, Gao P, Hur J, Floden AM, Nagamoto-Combs K. Anxiety-like behavior and intestinal microbiota changes as strain-and sex-dependent sequelae of mild food allergy in mouse models of cow's milk allergy. *Brain Behav Immun*. 2021 Jul;95:122-141. doi: 10.1016/j.bbi.2021.03.002. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33705867; PMCID: PMC8525516.

Smith DV, Theodore RM. Conditioned taste aversions: generalization to taste mixtures. *Physiol Behav*. 1984 Jun;32(6):983-9. doi: 10.1016/0031-9384(84)90289-0. PMID: 6494312.

Spear ET, Holt EA, Joyce EJ, Haag MM, Mawe SM, Hennig GW, Lavoie B, Applebee AM, Teuscher C, Mawe GM. Altered gastrointestinal motility involving autoantibodies in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neurogastroenterol Motil*. 2018 Sep;30(9):e13349. doi: 10.1111/nmo.13349. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29644797; PMCID: PMC6153444.

St John SJ, Pour L, Boughter JD Jr. Phenylthiocarbamide produces conditioned taste aversions in mice. *Chem Senses*. 2005 Jun;30(5):377-82. doi: 10.1093/chemse/bji032. Epub 2005 Mar 30. PMID: 15800216.

Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Bienenstock J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1989 Sep;97(3):575-85. doi: 10.1016/0016-5085(89)90627-6. PMID: 2666250.

Sugimoto M, Kamemura N, Nagao M, Irahara M, Kagami S, Fujisawa T, Kido H. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016 May;27(3):276-82. doi: 10.1111/pai.12535. Epub 2016 Feb 5. PMID: 26764899.

Syed A, Garcia MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, Berglund JP, Tsai M, Maecker H, O'Riordan G, Galli SJ, Nadeau KC. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Feb;133(2):500-10. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1037. PMID: 24636474; PMCID: PMC4121175.

Takasato Y, Kurashima Y, Kiuchi M, Hirahara K, Murasaki S, Arai F, Izawa K, Kaitani A, Shimada K, Saito Y, Toyoshima S, Nakamura M, Fujisawa K, Okayama Y, Kunisawa J, Kubo M, Takemura N, Uematsu S, Akira S, Kitaura J, Takahashi T, Nakayama T, Kiyono H. Orally desensitized mast cells form a regulatory network with Treg cells for the control of food allergy. *Mucosal Immunol*. 2021 May;14(3):640-651. doi: 10.1038/s41385-020-00358-3. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33299086; PMCID: PMC8075951.

Talbot J, Hahn P, Kroehling L, Nguyen H, Li D, Littman DR. Feeding-dependent VIP neuron-ILC3 circuit regulates the intestinal barrier. *Nature*. 2020 Mar;579(7800):575-580. doi: 10.1038/s41586-020-2039-9. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32050257; PMCID: PMC7135938.

Tan AH, Lim SY, Lang AE. The microbiome-gut-brain axis in Parkinson disease - from basic research to the clinic. *Nat Rev Neurol*. 2022 Aug;18(8):476-495. doi: 10.1038/s41582-022-00681-2. Epub 2022 Jun 24. PMID: 35750883.

Teixeira G, Paschoal PO, de Oliveira VL, Pedruzzi MM, Campos SM, Andrade L, Nóbrega A. Diet selection in immunologically manipulated mice. *Immunobiology*. 2008;213(1):1-12. doi: 10.1016/j.imbio.2007.08.001. Epub 2007 Sep 10. PMID: 18207023.

Tordesillas, L.; Berin, M.C.; Sampson, H.A. *Immunology of Food Allergy*. Immunity, v. 47, n. 1; p. 32-50, 2017.

Varshney P, Jones SM, Scurlock AM, Perry TT, Kemper A, Steele P, Hiegel A, Kamilaris J, Carlisle S, Yue X, Kulis M, Pons L, Vickery B, Burks AW. A randomized controlled study of peanut oral immunotherapy: clinical desensitization and modulation of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Mar;127(3):654-60. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1111. PMID: 21377034; PMCID: PMC3060783.

Vaz, E. M.; Vaz, N. M.; Levine, B. B. Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin. *Immunology*, v. 21, n. 1, p. 11–15, 1971.

Vecchione A, Devlin JC, Tasker C, Ramnarayan VR, Haase P, Conde E, Srivastava D, Atwal GS, Bruhns P, Murphy AJ, Sleeman MA, Limnander A, Lim WK, Asrat S, Orenco JM. IgE plasma cells are transcriptionally and functionally distinct from other isotypes. *Sci Immunol*. 2024 Sep 6;9(99):eadm8964. doi: 10.1126/sciimmunol.adm8964. Epub 2024 Sep 6. PMID: 39241058.

Veiga-Fernandes, H.; Mucida, D. *Neuro-Immune Interactions at Barrier Surfaces*. *Cell*, v. 165, n.4, p. 801-811, 2016.

PALISADE Group of Clinical Investigators; Vickery BP, Vereda A, Casale TB, Beyer K, du Toit G, Hourihane JO, Jones SM, Shreffler WG, Marcantonio A, Zawadzki R, Sher L, Carr WW, Fineman S, Greos L, Rachid R, Ibáñez MD, Tilles S, Assa'ad AH, Nilsson C, Rupp N, Welch MJ, Sussman G, Chinthrajah S, Blumchen K, Sher E, Spergel JM, Leickly FE, Zielen S, Wang J, Sanders GM, Wood RA, Cheema A, Bindslev-Jensen C, Leonard S, Kachru R, Johnston DT, Hampel FC Jr, Kim EH, Anagnostou A, Pongracic JA, Ben-Shoshan M, Sharma HP, Stillerman A, Windom HH, Yang WH, Muraro A, Zubeldia JM, Sharma V, Dorsey MJ, Chong HJ, Ohayon J, Bird JA, Carr TF, Siri D, Fernández-Rivas M, Jeong DK, Fleischer DM, Lieberman JA, Dubois AEJ, Tsoumani M, Ciaccio CE, Portnoy JM, Mansfield LE, Fritz SB, Lanser BJ, Matz J, Oude Elberink HNG, Varshney P, Dilly SG, Adelman DC, Burks AW. AR101 Oral Immunotherapy for Peanut Allergy. *N Engl J Med*. 2018 Nov 22;379(21):1991-2001. doi: 10.1056/NEJMoa1812856. Epub 2018 Nov 18. PMID: 30449234.

Vonk MM, Diks MAP, Wagenaar L, Smit JJ, Pieters RHH, Garssen J, van Esch BCAM, Knippels LMJ. Improved Efficacy of Oral Immunotherapy Using Non-Digestible Oligosaccharides in a Murine Cow's Milk Allergy Model: A Potential Role for Foxp3+ Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 2017 Sep 29;8:1230. doi: 10.3389/fimmu.2017.01230. PMID: 29033945; PMCID: PMC5626810.

Wagenaar L, Bol-Schoenmakers MWHC, Giustarini G, Garssen J, Smit JJ, Pieters RHH. Mouse strain differences in response to oral immunotherapy for peanut allergy. *Immun Inflamm Dis*. 2019 Mar;7(1):41-51. doi: 10.1002/iid3.242. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30838819; PMCID: PMC6416762.

Wang, H.; Foong, J.P.P.; Harris, N.L.; Bornstein, J.C. Enteric neuroimmune interactions coordinate intestinal responses in health and disease. *Mucosal Immunol*, v. 15, n. 1, p. 28 – 39, 2021.

Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity*. 2014 Dec 18;41(6):1013-25. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.006. Epub 2014 Dec 6. PMID: 25526312.

Wood RA. Oral Immunotherapy for Food Allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2017;27(3):151-159. doi: 10.18176/jiaci.0143. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28102823. 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. *J Exp Med*. 2012 Feb 13;209(2):353-64. doi: 10.1084/jem.20111941. Epub 2012 Jan 16. PMID: 22249450; PMCID: PMC3280879.

Yang Z, Wu CM, Targ S, Allen CDC. IL-21 is a broad negative regulator of IgE class switch recombination in mouse and human B cells. *J Exp Med*. 2020 May 4;217(5):e20190472. doi: 10.1084/jem.20190472. PMID: 32130409; PMCID: PMC7201927.

Yissachar N, Zhou Y, Ung L, Lai NY, Mohan JF, Ehrlicher A, Weitz DA, Kasper DL, Chiu IM, Mathis D, Benoist C. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):1135-1148.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.009. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28262351; PMCID: PMC5396461.

Zukerman S, Ackroff K, Sclafani A. Post-oral appetite stimulation by sugars and nonmetabolizable sugar analogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Oct 1;305(7):R840-53. doi: 10.1152/ajpregu.00297.2013. Epub 2013 Aug 7. PMID: 23926132; PMCID: PMC3798804.