MATOS, Olívia Gonçalves. **Efeito da ingestão dos óleos de soja e de peixe na alergia alimentar induzida experimentalmente em camundongos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

RESUMO

Observa-se, nas últimas décadas, um crescimento nas manifestações de doenças alérgicas, tanto em crianças quanto em adultos. Um desequilíbrio no consumo de óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (n-3PUFA) e ômega 6 (n-6PUFA) pode alterar a função imune e aumentar o risco de uma reação alérgica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o possível efeito protetor do óleo de peixe (rico em n-3PUFA), na alergia alimentar à ovalbumina induzida experimentalmente em camundongos. Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros: perda de peso corporal, níveis séricos de IgE e IgG1, infiltrado de eosinófilos, produção de muco pelas células caliciformes e adesão e rolamento de células no endotélio. No modelo utilizado os camundongos foram sensibilizados com OVA e desafiados colocando-se OVA na ração (PROTOCOLO 1) ou colocando-se uma solução de clara de ovo a 20% na mamadeira (PROTOCOLO 2). Em ambos os protocolos os lipídios utilizados na ração eram óleo de soja (ração 1 - controle), óleo de peixe (ração 2) ou uma mistura dos dois óleos (ração 3). Os níveis de IgE e IgG1 anti-OVA, o número de eosinófilos e a área de muco no intestino e o número de células em rolamento no endotélio foram menores nos animais alérgicos que consumiram ração constituída de óleo de peixe ou da mistura dos óleos em comparação com aqueles que consumiram ração constituída apenas de óleo de soja. Isso ocorreu apenas no PROTOCOLO 1, indicando que os efeitos benéficos dependem da via de administração do antígeno. Os resultados indicam que o óleo

de peixe utilizado nesse estudo é capaz de interferir de forma benéfica em alguns sinais da alergia observados nos animais alérgicos avaliados.

Palavras-chave: óleo de peixe, óleo de soja, n-3PUFA, n-6PUFA, função imune, alergia alimentar, ovalbumina.

MATOS, Olívia Gonçalves. **Effect of fish and soybean oil ingestion in experimental murine model of food allergy.** 2010. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ABSTRACT

The incidence of allergic disease is increasing in both children and adults. It is well accepted that an imbalance in the consumption of oil rich in long-chain omega 3 polyunsaturated fatty acids (n-3PUFA) and long-chain omega 6 polyunsaturated fatty acids (n-6PUFA) can modulate the immune function, increasing the risk of allergic reactions. We investigated in this study the protective effect of fish oil (rich in n-3PUFA) in a experimental model of food allergy induced in mice sensitized by ovalbumin (OVA). In order to evaluate the progress of the allergy, we assessed the weight loss over the time, serum levels of IgE and IgG1, eosinophil infiltration, intestinal mucus production by goblet cells and leukocyte recruitment in the GI microvasculature. Mice were sensitized with OVA and challenged orally by adding OVA to the chow (PROTOCOL 1) or by substituting the water source to an egg white solution (20%; PROTOCOL 2). In both protocols the lipid source in the chow was composed by soybean oil (chow 1 – control), fish oil (chow 2) or a mixture of the two oils (chow 3). The ingestion of a fish oil loaded chow or a mixture of two oils led to reduced levels of serum IgE and IgG, eosinophil infiltration, intestinal mucus production and reduced rolling cells in the GI microvasculature, in comparison to controls (soybean oil as lipid source). These results were found only in PROTOCOL 1, showing that the benefic effects depend of the antigen vehicle. Taken together, these data suggest that the regular consumption of fish oil may reduce several classic signals of food allergy.

Key-word: fish oil, soybean oil, n-3PUFA, n-6PUFA, immune function, food allergy, ovalbumin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alergia Alimentar

A alergia alimentar é a manifestação de uma resposta imune anormal aos antígenos introduzidos no organismo por via oral e pode ser mediada ou não mediada por IgE (NETTLETON *et al.,* 2009; MAYER, 2003). IgE é uma imunoglobulina que circula como um anticorpo bivalente e está presente normalmente no plasma, em concentrações abaixo de 1µg/mL. Ela é a marca de doenças atópicas já que, em condições de atopia grave, esse nível pode aumentar para mais de 1.000µg/mL (SAMPSON, 1999). Alergia alimentar tipicamente mediada pelo anticorpo IgE é uma desordem que tem inicio rápido e é desencadeada após a ingestão de determinados alimentos (SICHERER e SAMPSON, 2009), por indivíduos previamente sensibilizados. Esse tipo de reação alérgica pode afetar um ou mais órgãos: a pele (urticária), o trato respiratório (rinite e asma), o trato gastrointestinal (dor e diarréia) e o sistema cardiovascular (choque anafilático). Estas reações podem ser desencadeadas por exposição direta do órgão envolvido ou por distribuição sistêmica das proteínas após ingestão. Exemplos de reações por exposição direta às proteínas alergênicas são as reações gastrointestinais isoladas após alimentação, a asma e a rinite, que ocorrem após inalação e, também, a urticária após contato local com estas proteínas. Já a reação sistêmica mediada por IgE é denominada anafilaxia e é constituída por reações alérgicas severas e potencialmente fatais (SICHERER, 2002).

A propensão à produção de IgE sofre influência de vários genes hereditários. Provavelmente, mais de 20 genes estão envolvidos no desenvolvimento de doenças alérgicas (LEUNG, 1998). Relativamente, poucos alimentos são responsáveis pela

grande maioria dessas reações. Esses alimentos incluem leite, ovo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar. Alergias a ovos e a leite de vaca são observadas com maior freqüência em crianças, enquanto frutos do mar e amendoim são as causas mais comuns de alergia em adultos (SEIBOLD, 2005). Algumas características são comuns à maioria dos antígenos alimentares: eles são glicoproteínas hidrossolúveis, pequenas mas de alto peso molecular (tamanho entre 10 e 70 KD) e relativamente estáveis ao calor, à acidez e à ação das proteases (CIANFERONI e SPERGEL, 2009). Essas características estruturais provavelmente protegem os antígenos da desnaturação e degradação no trato gastrointestinal e permitem sua absorção intacta, o que lhe conferem atividade imunogênica. Mesmo assim, apenas esses fatores não explicam totalmente a alergenicidade do alimento (HELM *et al.*, 2002).

Para que a reação alérgica a um alimento ocorra, antígenos devem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal, interagir com o sistema imunológico e produzir uma resposta. Em condições normais, a reação alérgica a alimentos é evitada, pois o trato gastrointestinal e o sistema imunológico fornecem barreiras que impedem a absorção da maioria dos antígenos (SICHERER e SAMPSON, 2009). Isso leva a um quadro de "tolerância oral", definida como a supressão específica da resposta imune celular e/ou humoral a um antígeno por administração prévia deste antígeno pela via oral, sendo muito importante para prevenir reações de hipersensibilidade aos alimentos e aos antígenos bacterianos presentes na microbiota da mucosa intestinal (FARIA e WEINER, 2005).

O trato gastrointestinal compreende a maior área de superfície no corpo humano (aproximadamente 300m^2) e apresenta uma camada de células epiteliais que separa o ambiente interno do externo (SICHERER e SAMPSON, 2009). A

mucosa intestinal é um importante órgão de defesa que apresenta uma barreira contra antígenos que passam pelo intestino. Todos os dias o sistema digestório recebe uma considerável quantidade de proteína dietética. A exposição contínua a esses antígenos protéicos, além da exposição aos microorganismos, estimula o organismo a formar barreiras de proteção contra a entrada deles, ou mesmo um filtro seletivo. Dessa forma, em condições normais, esses fatores fazem com que a reação alérgica a alimentos não aconteça. Mesmo entrando proteínas ou peptídeos imunologicamente ativos, o ambiente celular regulador das mucosas leva a um estado de tolerância imunológica a essas proteínas, já que a barreira é mantida pelo sistema imune das mucosas (ISOLAURI, 1997).

As barreiras não imunológicas são formadas por: 1) Enzimas proteolíticas produzidas pelo trato gastrointestinal, responsáveis por degradar e transformar as proteínas ingeridas em substâncias menores para serem absorvidas pelos enterócitos; 2) pH ácido presente no estômago, destruindo patógenos ou deixando-os menos imunogênicos (SICHERER e SAMPSON, 2009; HEYMAN, 2005); 3) Junções oclusivas presentes na membrana apical e basal das células epiteliais e nos espaços paracelulares, responsáveis pela impermeabilidade de grandes macromoléculas (SICHERER e SAMPSON, 2009); 4) Muco produzido por células intestinais, responsáveis por aprisionar os antígenos e servir de reservatório para a IgA secretória (SICHERER e SAMPSON, 2009); e 5) Microbiota intestinal residente, que ajuda a quebrar componentes alimentares que não foram completamente digeridos e também auxiliam na defesa natural contra a colonização de patógenos (KUDSK, 2002; SUZUKI *et al.,* 2007).

Já a barreira imunológica é formada por: 1) Sistema imune inato (neutrófilos, macrófagos, células natural killer, células epiteliais e receptores toll-like); 2) Sistema

imune adaptativo (linfócitos, placas de Peyer, IgA secretória e citocinas) (SICHERER e SAMPSON, 2009). IgA é o anticorpo mais abundante produzido no organismo. Essa molécula pode aglutinar antígenos e aprisioná-los no muco intestinal, facilitando a remoção destes patógenos do organismo. A importância da IgA no controle da absorção dos antígenos alimentares pôde ser comprovada pela observação de aumento dos níveis circulantes de complexos antígeno-anticorpo, contendo antígenos derivados de alimentos em indivíduos portadores de deficiências congênitas na secreção de IgA. Entretanto, não se sabe se esta deficiência predispõe à alergia alimentar (MAYER, 2003; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.,* 2002). A IgA é importante para o estabelecimento da homeostasia imunológica do intestino e proteção imune (CERUTTI e RESCIGNO, 2008).

No entanto, mesmo com toda essa proteção, alguns fatores provocam a diminuição das barreiras imunológicas e não imunológicas da mucosa digestiva, ocorrendo uma absorção exacerbada de macromoléculas da dieta e a quebra da tolerância oral. Estima-se que a alergia alimentar mediada por IgE é encontrada em 1 a 2% da população, atingindo aproximadamente 8% das crianças (HELM e BURKS, 2000). Ela é mais comum em crianças já que as funções de barreira são incompletamente desenvolvidas na primeira infância, aumentando a propensão de reações alérgicas a alimentos (ISOLAURI, 1997). Estudos epidemiológicos recentes mostram que a alergia alimentar está aumentando e identificam o poder da influência ambiental na promoção desse desequilíbrio, aumentando a incidência da sensibilização oral (KIMBER e DEARMAN, 2002; PATEL *et al.,* 2009). Um fator potencialmente responsável por isso é a “hipótese da higiene” desenvolvida por David Strachan, em 1989, que verificou que o número reduzido de filhos em uma família poderia ter relação com o aumento na incidência de doenças atópicas já que

a maior higiene pessoal e ambiental prevenia infecções no começo da infância e, portanto, dificultava a transmissão pelo contato não higiênico com irmãos mais velhos (NETTLETON *et al.,* 2009; ADLER, 2005). A carência de infecções intensas em países industrializados devido ao aumento da higiene, vacinação e uso de antibióticos podem alterar o sistema imune que responde inapropriadamente a substâncias inócuas (YAZDANBAKHSH *et al.,* 2002). Kucukosmanoglu e col., em 2006, investigaram a correlação entre sarampo e atopia comparando dois grupos de crianças com e sem o sarampo. Eles concluíram que crianças com histórico de sarampo tinham menor freqüência de sintomas de doenças alérgicas e crianças que não tiveram sarampo desenvolveram sensibilidade. Da mesma forma, Foliaki et al., em 2009, encontraram uma associação de sintomas de asma, rinoconjutivite e eczema em crianças de 6 e 7 anos e uso de antibiótico no primeiro ano de vida. A hipótese para explicar tal fato é que a limitada exposição atual à patógenos, como vírus e bactérias, nos primeiros anos de vida resulta numa estimulação insuficiente de células do tipo Th1 (células associadas a infecções virais e bacterianas e doenças autoimunes) que contrabalancearia a resposta pró-alérgica das células Th2 (associadas com infecções helmínticas e doenças alérgicas), conseqüentemente, resultando na predisposição à alergia.

Outro fator para o aumento da alergia alimentar seria o aumento da permeabilidade intestinal, ocasionado por infecções e inflamações entéricas e pelo aumento do uso de antiácidos que interfere no pH gástrico. A destruição de epitopos potencialmente imunogênicos pelos ácidos gástricos e enzimas do lúmen provavelmente representa um mecanismo eficiente suficiente para garantir defesa imunológica contra antígenos dietéticos (SAURER e MUELLER, 2009). Dessa forma, o aumento no uso de medicamentos anti-úlceras, responsáveis pelo tamponamento

do pH gástrico e inativação da maioria das proteases gástricas, reduz essa defesa e aumenta a possibilidade do desenvolvimento da alergia (UNTERSMAYR *et al*., 2005).

Outra hipótese que explicaria o aumento na incidência de doenças atópicas, principalmente nos países ocidentais, seria a mudança nos hábitos alimentares dessa população, com o aumento no consumo alimentos ricos em ácidos graxos ômega 6 e redução no consumo de alimentos ricos em ácidos graxos ômega 3 e com a redução na ingestão de antioxidantes (PATEL *et al.,* 2009) contribuindo para maior produção de substâncias relacionadas à alergia. Além disso, a introdução de novos alimentos e alimentos modificados na alimentação atual poderia também gerar uma reação entre o anticorpo contra um diferente, mas similar, antígeno, provocando uma reação alérgica ao mesmo (NETTLETON *et al.,* 2009). Porém, o trabalho de Lee e col. (2006), demonstrou que a modificação genética da batata não aumentou o risco do potencial alergênico da mesma.

Outro fator importante para o aumento da incidência de doenças atópicas foi demonstrado por Yang e col., em 2006. Segundo ele, em indivíduos geneticamente suscetíveis, o estresse contribui para o desenvolvimento de alergias alimentares por aumentar a permeabilidade transepitelial em um evento dependente de liberação do hormônio corticotrópico (CRH).

Dessa forma, durante a disfunção da mucosa, causada por imaturidade, infecção ou hipersensibilidade, o padrão normal de tratamento do antígeno é prejudicado, levando a uma resposta imune anormal e à sensibilização (ISOLAURI, 1997).

Normalmente antígenos da dieta penetram na mucosa intestinal através das células M situadas nas placas de Peyer, estruturas linfóides que, em conjunto,

formam o GALT (Gut associated lymphoid tissue). As células M são adaptadas para interagirem diretamente com moléculas e partículas do lúmen intestinal e realizar a transcitose deste material para o interior da célula. O antígeno absorvido interage então com células apresentadoras de antígenos (APCs). Uma vez processadas por essas células, ocorre a apresentação dos antígenos provenientes destas moléculas para linfócitos T helper (Th). Na alergia alimentar, os antígenos levam a ativação de células T helper 2 (Th2) e síntese de IgE específico para o alérgeno. A apresentação destes peptídeos acontece por via de moléculas MHC classe II. Esta fase é conhecida como sensibilização alérgica (SAMPSON, 1999).

Os linfócitos Th2 e seus produtos, como as interleucinas (IL) IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 ativam linfócitos B específicos para os antígenos alergênicos. Sob a influência do ligante CD40 e das citocinas, principalmente IL-4, produzidas pelos linfócitos Th2, os linfócitos B sofrem a troca de isotipo da cadeia pesada e produzem IgE (BACHARIER e GEHA, 2000). A IgE específica para o alérgeno produzida pelos linfócitos B entra na circulação e se liga aos receptores Fc nos mastócitos dos tecidos, de modo que essas células ficam sensibilizadas e prontas para reagir a um encontro subseqüente com o alérgeno (SAMPSON, 1999).

Quando uma nova exposição ao antígeno acontece, ocorre uma reação imediata iniciada pelo *crosslinking* de IgE com o antígeno, seguido pela ativação e liberação de grânulos pelos mastócitos. Estes mediadores são responsáveis pelos sintomas das reações alérgicas tanto imediatas quanto tardios (Figura 1). Na reação alérgica imediata, os grânulos liberados são mediadores pré-formados, como histamina, prostaglandina D_2 (PGD_2), fator ativador de plaquetas (PAF) e outros (BINGHAM e AUSTEN, 2000). As primeiras modificações, como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, referem-se a eventos vasculares, com início

após 15 a 30 minutos. Isso gera eritema na pele e edema no subcutâneo do trato respiratório ou digestivo. Tanto no trato respiratório como no digestivo, mediadores podem estimular a produção de muco. No trato gastrointestinal estes mediadores geram um desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando a um estado de diarréia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (WASSERMAN, 1983).

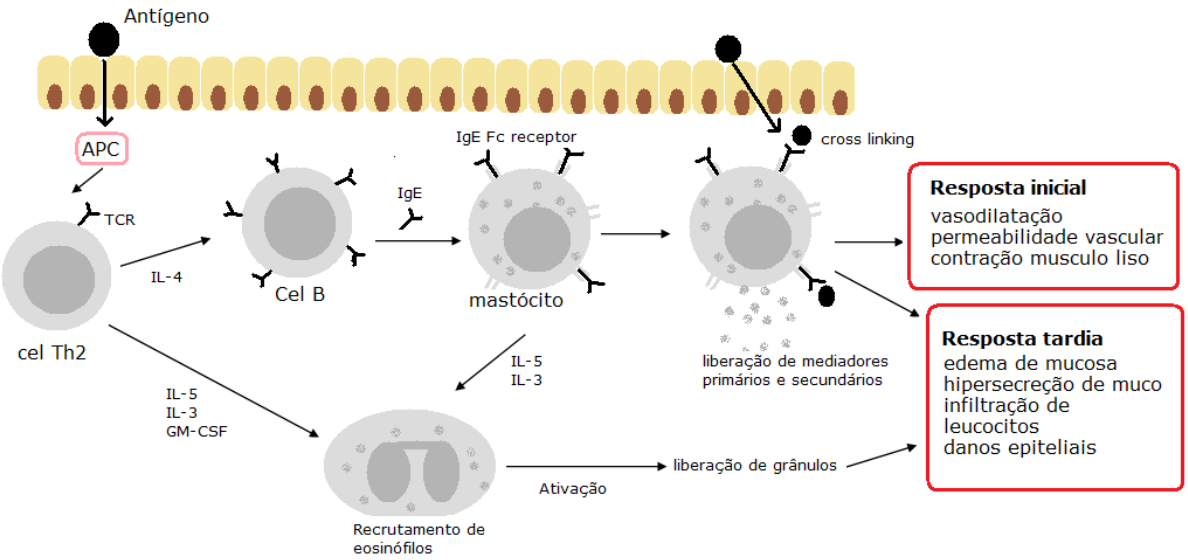

Figura 1: Mecanismo da alergia alimentar

A reação alérgica imediata é seguida por uma resposta de fase tardia que é causada pela liberação de leucotrienos (LT) (lipídios da família dos eicosanóides que participam do processo de inflamação crônica) e citocinas e quimiocinas (pequenas proteínas solúveis envolvidas na emissão de sinais em uma resposta imune) pelos mastócitos ativados. Esses mediadores recrutam outros leucócitos, incluindo eosinófilos e linfócitos Th2 para o local de inflamação (LUKACS, 2001).

Algumas citocinas são liberadas pelos mastócitos na inflamação alérgica e são responsáveis principais pela reação tardia. Elas incluem os fatores de necrose tumoral (TNF), as interleucinas, como IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, os fatores inibidores da migração de macrófagos (MIP), como MIP-1α, MIP-1β e os fatores

estimuladores de granulócitos-monócitos (GM-CSF). A IL-4 é primariamente envolvida na promoção da diferenciação e proliferação de células Th2 e na síntese de IgE (WILLS-KARP *e* FINKELMAN*,* 2008). Berin e col., em 1999, demonstraram que o aumento da produção de IL-4 em condições alérgicas pode ser um fator predisponente para inflamação, seguida de um aumento do acesso dos antígenos do lúmen intestinal ao sistema imune das mucosas sendo, portanto, importante na regulação da barreira intestinal. A IL-13 tem um papel importante na hipersecreção de muco pelas células epiteliais na reação alérgica (WILLS-KARP *e* FINKELMAN*,* 2008). O TNF ativa a expressão endotelial das moléculas de adesão responsáveis pelos infiltrados de células mononucleares e polimorfonucleares (BINGHAM e AUSTEN*,* 2000). A IL-5 regula o crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência dos eosinófilos e promove sinais essenciais para amplificação e recrutamento desse leucócito nos locais da inflamação alérgica (ROTHENBERG, 1998). Estudo realizado por Foster e col., em 1996, mostrou que camundongos deficientes em IL-5, a eosinofilia, danos no pulmão e hiperreatividade respiratória normalmente resultada de aeroalérgenos foi abolida, indicando que a IL-5 e os eosinófilos são mediadores centrais na patogênese da alergia respiratória.

Os eosinófilos são células que em condições normais estão espalhadas na lâmina própria da mucosa gástrica e intestinal. Entretanto, em pacientes com alergia alimentar, a distribuição, o número, a morfologia e também o comportamento funcional dessas células estão alterados (MISHRA *et al.,* 1999; SCHWAB *et al.,* 2003). No local da lesão, sob o estímulo de citocinas e quimiocinas, os eosinófilos podem liberar citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mediadores lipídicos. Essas moléculas podem induzir a produção de moléculas de adesão, o aumento da permeabilidade vascular e a produção de muco (ROTHENBERG *et al.,* 2006).

Desordens eosinofílicas gastrointestinais são desordens caracterizadas por um aumento no infiltrado inflamatório na mucosa gastrointestinal rico em eosinófilos. A patogênese parece envolver predisposição genética, exposição à alérgenos alimentares e ambientais e ativação do sistema imune mediada por IgE. Evidencias relacionam essas desordens à um grupo de desordens imunes, como alergia mediada por IgE (DEHLINK e FIEBIGER, 2009). Estudo realizado por Foroughi e col., em 2007, mostrou que terapia medicamentosa com anti-IgE reduziu a eosinofilia periférica e sintomas gastrointestinais e reduziu o número de eosinófilos no antro gástrico e duodeno em pacientes com desordens eosinofilicas gastrointestinais. Isso demonstrou que o processo mediado por IgE contribui para a geração da inflamação eosinofílica.

O aumento da transmigração de células sangüíneas através do endotélio vascular é considerado uma importante contribuição para a patogenia da doença inflamatória aguda e crônica (MORENO, 2009). O extravasamento dos leucócitos do sangue para o local da inflamação envolve interações adesivas entre as células e o endotélio. Inicialmente ocorre o rolamento das células, no qual o contato do leucócito com o endotélio é mediado pela família das selectinas, que são glicoproteínas expressas por leucócitos (L-selectina), plaquetas (P-selectina) e endotélio (P- e L-selectina). Logo em seguida, ocorre uma adesão firme dos leucócitos no endotélio sendo mediada por interações das integrinas β2, como Mac-1 e LFA-1, com receptores endoteliais da família das molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e das integrinas β1, VLA-4, ao receptor endotelial molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1). Após esses processos, os leucócitos usam processos de transmigração para ultrapassar a barreira endotelial e alcançar a circulação sanguínea e se direcionar aos locais da inflamação. Para isso, eles usam a rota transcelular,

passando dentro das células endoteliais, ou pela rota paracelular, por meio das junções endoteliais (LANGER e CHAVAKIS, 2009).

1.2 Modelo experimental de alergia alimentar

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

Várias metodologias experimentais têm sido utilizadas com o intuito de alterar os mecanismos de tolerância na mucosa intestinal e iniciar uma reação de hipersensibilidade que mimetize a alergia alimentar humana. Geralmente, o desenvolvimento destas metodologias requer a utilização de vias não fisiológicas de administração do antígeno, bem como o uso de adjuvantes indutores da produção de citocinas pelas células Th2. Na maioria dos modelos animais, incluindo pequenos animais de laboratório (camundongo e rato) e animais domésticos (cachorro e porco), são utilizadas via intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intradérmica para administração do antígeno com ou sem adjuvante (HELM *et al.,* 2003). Recentemente, Saldanha *et al*. 2004, desenvolveram um modelo de alergia crônica no qual a resposta imune do tipo Th2 é induzida para um antígeno alimentar. Nesse trabalho, camundongos da linhagem BALB/c recebem uma injeção subcutânea contendo o antígeno (ovalbumina) associado ao adjuvante hidróxido de alumínio. Após a sensibilização, os animais têm como única opção líquida uma solução contendo o mesmo antígeno. Esse desafio oral foi capaz de aumentar a produção de

IgE e IgG1 anti-ovalbumina, aumentar a permeabilidade vascular, aumentar o infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, hiperplasia de mastócitos e aumento da produção de muco. Um dos sinais sistêmicos mais marcantes e ainda sem explicação foi o emagrecimento acentuado dos animais uma semana após o início da ingestão do antígeno (SALDANHA *et al.,* 2004). Moreira, em 2006, em seu trabalho de mestrado, avaliou se a perda de peso corpóreo dos animais alérgicos era de origem nutricional, uma vez que eles consumiam além da proteína da ração comercial a proteína da solução de clara de ovo, ou seja, uma dieta desbalanceada. A partir de então a solução de clara de ovo foi substituída por uma dieta balanceada no qual a proteína ovalbumina era acrescentada à ração em substituição à proteína utilizada anteriormente. Concluiu-se que os animais continuavam a emagrecer, mostrando que a perda de peso corpóreo não era de origem nutricional.

1.3 Ácidos graxos poliinsaturados – características e fontes alimentares

A dieta humana contém vários tipos de ácidos graxos, consumidos em diferentes quantidades, de acordo com padrões e escolhas alimentares. Alguns desses ácidos graxos são considerados essenciais pelo fato de o homem não conseguir produzi-los em seu organismo, devendo, portanto, ser consumidos na dieta. A deficiência desses ácidos graxos pode causar alterações no crescimento, no desenvolvimento e no funcionamento adequado do organismo (CALDER, 2006b; LE *et al.,* 2009). Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) são gorduras que contém duas ou mais duplas ligações em sua cadeia carbônica (CALDER *et al.,* 2008). Eles fazem parte da membrana celular e são muito importantes para a fluidez e regulação da expressão gênica e função celular. Além disso, os PUFAS apresentam efeitos na imunidade inata e adaptativa por meio de vários mecanismos (CALDER, 2006b; LE

et al., 2009). PUFAS são classificados como n-3 (Omega 3) ou n-6 (Omega 6) de acordo com a localização da última dupla ligação em relação ao terminal metil, no final da molécula. Ácido linoléico (LA, 18:2n-6) e ácido linolênico (ALA, 18:3n-3), são ácidos graxos da família do n-6PUFA e n-3PUFA, respectivamente, e são exemplos de ácidos graxos essenciais (CALDER *et al.*, 2008; SHAIKH e EDIDIN, 2006). LA é encontrado em óleos vegetais, como óleo de milho, de soja e na margarina. ALA é encontrado em óleo de linhaça e canola (CALDER, 2006b; CALDER *et al.*, 2008). Alimentos ricos em LA e ALA constituem a maior parte dos PUFAS da dieta, principalmente após a introdução de óleos vegetais de cozinha e margarina na dieta ocidental, na década de 70 (CALDER *et al.*, 2008; SIMOPOULOS, 2002).

LA e ALA passam por vários passos de saturação, desaturação e elongação que resultam na formação de PUFAS de cadeia longa (SHAIKH e EDIDIN, 2006). LA pode ser convertido via ácido γ-linolênico (GLA, 18:3n-6) e ácido di-γ-linolênico (D-GLA, 20:3n-6) em ácido araquidônico (AA, 20:4n-6). Por uma série de reações análogas a essa do LA, por meio das mesmas enzimas, o ALA pode ser convertido em ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e, então, em ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3). Esses ácidos graxos também podem ser obtidos por meio da dieta: AA é encontrado em carnes e miúdos e serve como precursor de eicosanóides, fundamentais no processo inflamatório (CALDER, 2006b). GLA e D-GLA são encontrados, por exemplo, no óleo de prímula e exercem um efeito antiinflamatório, sendo um inibidor competitivo do AA no metabolismo dos eicosanóides (SHAIKH e EDIDIN, 2006); EPA e DHA são encontrados no peixe, principalmente nos óleos de peixes (atum, salmão, sardinha, arenque) (CALDER, 2006b) e apresentam maior atividade imunomodulatória do que ALA (SIMOPOULOS, 2002). No entanto, esse elongamento não é muito eficiente e, possivelmente limitado pela idade e doenças.

Por essas razões, EPA e DHA são considerados nutricionalmente essenciais (DE CATERINA e BASTA, 2001).

1.4 Ácidos graxos poliinsaturados e função imune

Numerosos trabalhos têm revelado o papel modulador dos ácidos graxos dietéticos na resposta imune. No entanto, o mecanismo celular e molecular dos efeitos imunomodulatórios ainda não foram totalmente entendidos (HWANG, 2000). Na década de 70 começou-se a publicar estudos mostrando o papel dos PUFA no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune e mostrando que havia diferenças entre o n-6 e n-3PUFA nesse sistema (FRITSCHE, 2006). Foi observado que esquimós nativos da Groelândia e Japoneses tinham alta ingestão dietética de n-3PUFA de cadeia longa advindos de peixes e tinham baixa incidência de infarto no miocárdio e inflamação crônica ou desordens auto-imunes, quando comparados com aqueles que foram viver no ocidente (SIMOPOULOS, 2002). É especulado que a razão de n-6PUFA para n-3PUFA pode ser um importante fator na modulação da inflamação e auto-imunidade (SHAIKH e EDIDIN, 2006). Há 40.000 anos atrás, na era paleolítica, a dieta humana era rica em ácidos graxos saturados. Era muito pobre em n-3 e n-6PUFA, porém apresentava quantidades similares desses ácidos graxos. Uma dramática mudança na dieta e estilo de vida humana ocorreu nos últimos 10.000 anos, com a revolução agrícola, no qual os cereais e grãos, ricos em n-6 PUFA, foram introduzidos. Isso causou um desequilíbrio no consumo de PUFA (RUSSO, 2009). Hipóteses mostram que a mudança na razão de n-3 para n-6PUFA, devido ao aumento no consumo de n-6PUFA na dieta ocidental, pode ser responsável pelo aumento na incidência de doenças inflamatórias relativas a populações no qual a ingestão de n-6PUFA é menor e a de n-3PUFA é maior, como

na dieta mediterrânea. A dieta ocidental apresenta uma razão de n-6PUFA para n-3PUFA de 20-30:1, enquanto em populações que apresentam o peixe como base dietética, a razão é de 1-2:1 (SHAIKH e EDIDIN, 2006). A razão ótima de ingestão de n-6 e n-3PUFA indicada varia de acordo com o tipo de patologia a ser considerada, como por exemplo, uma razão de 2-3:1 suprime inflamação em pacientes com artrite reumatóide e uma razão de 5:1 é benéfica em pacientes com asma (SIMOPOULOS, 2008). Ainda evidencias mostram que uma IDR (Ingestão Diária Recomendada) aceitável para EPA e DHA é uma ingestão de 250 a 500mg por dia (HARRIS et al., 2009). Esses achados levaram os profissionais a encorajarem a população geral a consumirem mais n-3PUFA. A indústria alimentícia subseqüentemente produziu um grande número de alimentos, como leite, ovos, queijos e pastas enriquecidos com n-3PUFA (RIEDIGER *et al*., 2009). Outra solução clínica para mudar a razão entre o consumo de n-3 e n-6PUFA tem sido a suplementação de óleo de peixe em cápsulas. Embora o mecanismo molecular do óleo de peixe em cápsula ainda não ser totalmente entendido, ela tem sido anunciada como benéfica para desordens inflamatórias (SHAIKH e EDIDIN, 2006).

Por vários anos numerosos estudos têm tentado descobrir mecanismos pelos quais os lipídios dietéticos promovem efeito na função imunológica. Algumas hipóteses têm sido sugeridas como possíveis mecanismos para isso: mudanças na expressão gênica e na sinalização celular, diferenças no metabolismo de eicosanóides, mudanças na organização e fluidez das membranas celulares e produção de peróxidos lipídicos (SHAIKH e EDIDIN, 2006).

A principal chave que liga os ácidos graxos à resposta imune e inflamação é a produção de certos metabólitos dos ácidos graxos, os eicosanóides (FRITSCHE, 2006; CALDER *et al.,* 2009). Eicosanóides, no qual incluem as prostaglandinas

(PG), os leucotrienos (LT), os tromboxanos (TX) e outros derivados, são mediadores lipídicos formados durante a estimulação tecidual pela ação de enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX). Eles atuam próximos aos receptores celulares e são inativados por enzimas catabólicas, tudo de maneira muito rápida. Essa combinação transitória deles os torna importantes na modulação da resposta fisiológica ao estímulo (LANDS, 2001; CALDER *et al.*, 2008). Eles estão envolvidos na regulação da inflamação, agregação plaquetária e vasoconstrição ou vasodilatação (RIEDIGER *et al.*, 2009). Além disso, alguns eicosanóides, por promoverem a sintese de IgE e de citocinas do tipo Th2, estão envolvidos na promoção da sensibilização a alérgenos (CALDER *et al.*, 2008).

Os eicosanóides são produzidos tanto por n-3 quanto por n-6PUFA, porém, devido a membrana das células inflamatórias conterem maiores concentrações de AA, pelo tipo de alimentação ocidental, este é usualmente o maior substrato para a síntese desses mediadores (RIEDIGER *et al.*, 2009; CALDER *et al.*, 2008). Esse AA é então mobilizado por enzimas, como a fosfolipase A2, liberando ácidos livres que atuam como substrato para as enzimas COX e LOX na síntese de eicosanóides. n-6 e n-3PUFA competem entre si na formação de PG, já que EPA e AA competem pelas mesmas enzimas COX e LOX. A razão n-6:n-3PUFA parece determinar o direcionamento das enzimas. O aumento no consumo de peixe e óleo de peixe resulta no aumento da proporção de n-3PUFA na membrana fosfolipídica de células inflamatórias em relação ao AA e, conseqüentemente, na diminuição na produção de PG e LT derivados do AA (PGE2, TXB2, LTB4, LTE4, 5-HETE). Comparado com EPA, AA produz eicosanóides potencialmente mais inflamatórios e pró-agregadores plaquetários. Esse fator é importante ser considerado devido à abundância de n-

6PUFA na dieta atual, em relação aos n-3PUFA (CALDER *et al.*, 2008; SIMOPOULOS, 2002; RIEDIGER *et al.*, 2009)

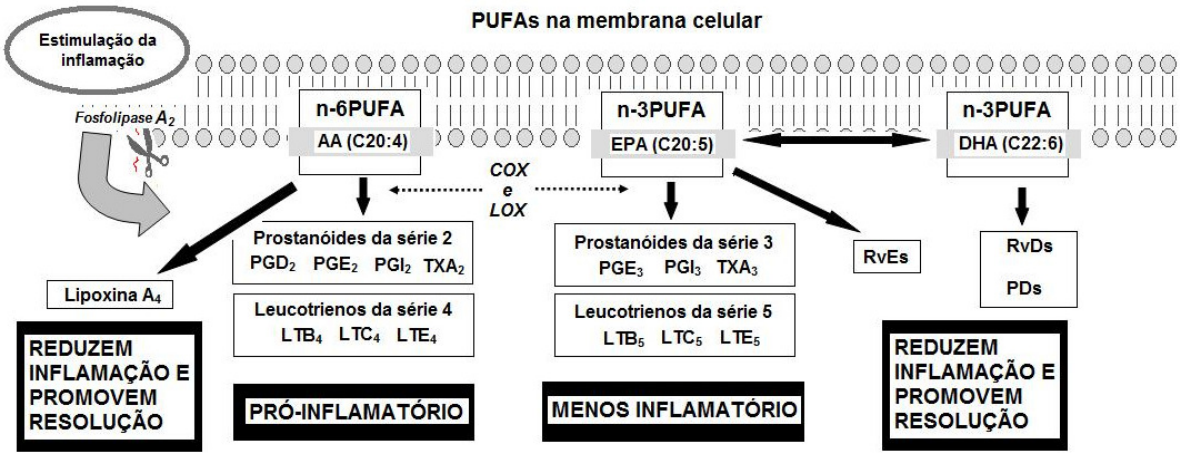

Figura 2: Ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular
Modificado de: HELLER et al., 2003; CALDER, 2006a; SERHAN et al., 2008.

Em adição, juntamente com os mediadores pró-inflamatórios PG e LT, o AA pode gerar as lipoxinas (LXs) e lipoxinas ativadas por aspirina. Estes são mediadores lipídicos que atuam reduzindo a inflamação e promovendo a resolução. Esse achado enfatiza que a visão das ações do n-6 e n-3PUFA na inflamação e homeostase está incompleta (SCHWAB *et al.*, 2006; SERHAN e CHIANG, 2008). Recentemente, descobriu-se que os n-3PUFA podem também gerar mediadores lipídicos que são potentes anti-inflamatórios e promovem a neuroproteção e pro-resolução. O EPA é precursor da resolvina da série E (RvEs) que promove a resolução da inflamação por parar a transmigração e recrutamento de leucócitos. O DHA é precursor da resolvina da serie D (RvDs) e das protectinas (PDs), responsáveis por bloquear o NFkB nas micróglias e limitar a infiltração de polimorfonucleares na inflamação do cérebro e da pele e nas peritonites e aceleram a resolução (SERHAN *et al.*, 2008). Essa nova família de mediadores químicos

derivados de EPA e DHA, resolvinas e protectinas, qualificadas como agonistas da resolução juntamente com os agonistas da resolução derivados do n-6PUFA, as lipoxinas, formam uma nova área da imunomodulação e proteção tecidual (SERHAN e CHIANG, 2008).

O papel funcional do peixe deve ser mais pesquisado, abrindo novos caminhos para terapias que controlam a inflamação e melhoram a resolução de patologias (SERHAN e CHIANG, 2008).

1.5 Ácidos graxos poliinsaturados e alergia alimentar

Paralelamente ao crescimento das doenças alérgicas (asma, rinite alérgica, alergia alimentar e dermatite atópica) em países ocidentais nas últimas décadas, observa-se a baixa ingestão de n-3PUFA nesses países (CALDER e PRESCOTT, 2004).

O aumento no consumo de n-6PUFA resulta no aumento da produção de eicosanóides derivados de AA, como a PGE_2. A PGE_2 é responsável pela síntese de IgE, como resultado da indução da diferenciação das células B na presença de IL-4 (CALDER, 2006b; LAITINEN e ISOLAURI, 2005). Também é responsável pela inibição da produção de citocinas tipo Th1, como IFN-γ e IL-2, e promoção da produção de citocinas tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Esse fenótipo tipo Th2 fundamenta a doença atópica. Além disso, AA aumenta produção de LTB_4, que induz um aumento significativo da expressão de moléculas de adesão (MORENO, 2009), promove atração, adesão e degranulação de leucócitos e produção de IgE por células B (CALDER, 2006b; SALA-VILA *et al.,* 2008).

Pelo fato do n-3PUFA atuar como antagonista da produção de mediadores derivados de AA surgiu-se a hipótese de que uma baixa ingestão de n-3PUFA,

juntamente com uma alta ingestão de n-6PUFA, está associada com as causas de doenças atópicas (SALA-VILA *et al*., 2008). Oddy e col., em 2004, por exemplo, demonstraram que dieta rica em n-3PUFA e pobre em n-6PUFA protege crianças com sintomas de asma. O aumento da transmigração de células sangüíneas através do endotélio vascular é considerado uma contribuição importante para a patogenia da doença inflamatória aguda e crônica (MORENO, 2009). Sperling e col., em 1993, reportaram que a suplementação de n-3PUFA reduz adesão e migração de neutrófilos. Moreno, em 2009, comparou o efeito do LTB4 (eicosanóide derivado de AA) e do LTB5 (eicosanóide derivado de EPA) na expressão das moléculas de adesão e encontrou uma menor indução da adesão de polimorfonucleares em células endoteliais pelo LTB5.

No entanto, descobertas mais recentes de que o AA também aumenta mediadores anti-inflamatórios e de resolução da inflamação, como a lipoxina A_4, podem explicar o motivo pelo qual uma pequena deficiência desse ácido graxo pode resultar num estado de atopia (CALDER, 2006b). De uma forma semelhante, resolvinas e protectinas, produzidas a partir do n-3PUFA, são importantes na fase de resolução da inflamação (SERHAN *et al*., 2008).

Estudos têm se mostrado controversos quanto à atuação dos PUFA nas doenças alérgicas. Gestantes e lactantes que consomem altas quantidades de n-3PUFA podem ter um efeito protetor contra o desenvolvimento de alergias em recém-nascidos. Isso foi demonstrado em estudo realizado por KRAUSS-ETSCHMANN *e col.,* em 2008, no qual observaram a redução da concentração de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-13) e aumento de TGF-β em cordões umbilicais de recém nascidos. Estudo publicado por Koch e col., em 2008, mostrou uma melhora nos sintomas de eczema atópico em pacientes que receberam suplementação de

DHA. Ainda, a suplementação de óleo de peixe apresentou-se benéfico para crianças com asma, reduzindo os sintomas da mesma (NAGAKURA *et al.*, 2000). No entanto, nenhum efeito na alergia e asma de crianças de cinco anos que consumiram grandes quantidades de n-3PUFA desde os seis meses de idade foi observado (ALMQVIST *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou um aumento na secreção de citocinas tipo Th2 por esplenócitos de ratos alimentados com dieta rica em óleo de peixe (PETURSDOTTIR e HARDARDOTTIR, 2008), indicando ainda mais a controvérsia nos resultados que associam os graxos e as doenças alérgicas.

Indivíduos que apresentam alergia alimentar devem fazer uma dieta eliminando os alimentos que provocam a reação, porém a retirada do antígeno da dieta não tem se mostrado satisfatória, podendo provocar inadequações nutricionais, principalmente em pacientes com alergias alimentares múltiplas (ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA *et al.,* 2008; LAITINEN e ISOLAURI, 2005). Estudos têm sido realizados com o intuito de se encontrar estratégias não invasivas para reduzir os sintomas da alergia ou preveni-la. Claramente, é importante que se saiba mais sobre o metabolismo dos ácidos graxos na atopia e também sobre a associação entre a biodisponibilidade dos ácidos graxos, a geração de mediadores eicosanóides específicos e a resposta inflamatória (SALA-VILA *et al.,* 2008).

Dessa forma, após perceber a importância de se estudar estratégias não invasivas para melhorar os sintomas da alergia e após observar estudos que relacionam os óleos alimentares com sistema imune, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos óleos de peixe e soja, vendidos comercialmente, na alergia alimentar à ovalbumina induzida experimentalmente em camundongos.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar o possível efeito protetor do óleo de peixe (rico em n-3PUFA), vendido comercialmente, na alergia alimentar à ovalbumina induzida experimentalmente em camundongos.

2.2 Objetivos específicos:

- Analisar o perfil lipídico do óleo de peixe utilizado no preparo das rações do presente estudo e compará-lo com o perfil lipídico do óleo de soja.
- Verificar se a ingestão dietética de óleo de peixe previne ou ameniza os efeitos da alergia alimentar em camundongos. Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros:

  1. Níveis séricos de IgG1 e IgE anti-ovalbumina;
  2. Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal;
  3. Produção de muco intestinal;
  4. Adesão e rolamento de células no endotélio intestinal;
  5. Peso corporal e gordura periuterina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Análise do perfil de lipídios do óleo de peixe utilizados na dieta

3.1.1 Análise do óleo de peixe

A análise foi realizada pelo Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG. Primeiramente foi realizada a hidrólise de lipídeos. Para isso, dissolveram-se, em tubo criogênico de capacidade de 2ml, aproximadamente 5 mg do óleo em 100 ul de uma solução de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1mol/l (5%). Após agitação em vórtex por 10 s, o óleo foi hidrolisado em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80W (Potencia 2), durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionaram-se 300µl de água. A fase aquosa foi então acidificada com 100 ul de ácido clorídrico concentrado e os ácidos graxos livres extraídos com 600 µl de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 s e repouso por 1 min, uma alíquota de 300µl da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres.

Os ácidos graxos livres foram metilados com 100 ul BF_3 / metanol 14%) e aquecidos durante 10 minutos em banho de água a 80ºC. Foram em seguida analisados por Cromatografia Gasosa. As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian CP-3380 equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna DB-wax (J%W Scientif) 30m X 0,25mm com gradiente de temperatura: 80ºC, 1min, 7ºC/min até 240ºC; injetor (split de 1/100) e detector a 260ºC. Hidrogênio como gás de arraste (2 ml/min) e volume de injeção

de 1μl. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados SUPELCO37.

3.1.2 Análise comparativa do óleo de peixe com óleo de soja

O perfil de ácidos graxos do óleo de peixe foi comparado com o perfil de ácidos graxos do óleo de soja da marca Lisa® usada nesse presente estudo. O perfil de ácidos graxos do óleo de soja foi obtido a partir do trabalho de SANIBAL e MANCINI FILHO (2004).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos, fêmeas, da linhagem BALB/c, recém desmamados, com quatro semanas de vida, em média. Os animais foram adquiridos do CEBIO (Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG) e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Geral em estantes com controle de luz e temperatura em gaiolas de plástico, contendo, no máximo, 5 animais/gaiola. Os procedimentos experimentais realizados neste projeto de mestrado foram executados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal –CETEA/UFMG (Protocolo 214/07).

Assim que os animais chegaram ao Biotério do Departamento de Patologia, eles receberam uma solução de 0,08% de Ivermectina (Ivomec ® - Bayer) colocada na mamadeira, durante uma semana. Esse é um protocolo de vermifugação, utilizado anteriormente ao inicio dos experimentos. A cada dois dias as gaiolas foram lavadas e a maravalha foi trocada.

3.3 Dieta e tratamento

A ração dos animais foi preparada de acordo com recomendações da *AIN93G.* A ração é composta de 20% de proteína (na forma de caseína), 62,95% de carboidrato (na forma de amido de milho e açúcar) e 7% de lipídios (na forma de óleo de soja e/ou óleo de peixe), além de celulose, minerais, vitaminas, BHT, colina e metionina (Tabela 1). Os animais iniciaram a dieta três semanas antes da indução da alergia alimentar.

Foram preparadas três rações no qual a diferença entre elas era o tipo de óleo que compunha a ração:

- Ração 1: Ração controle. O óleo utilizado no preparo desta é o óleo de soja, rico em n-6PUFA (7% de óleo de soja).

- Ração 2: Ração tratamento. Ração no qual o óleo de soja foi totalmente substituído pelo óleo de peixe, rico em n-3PUFA (7% de óleo de peixe).

- Ração 3: Ração tratamento. Ração no qual 40% do total do óleo de soja foi substituído pelo óleo de peixe (4,2% de óleo de soja + 2,8% de óleo de peixe). A proporção de n-6PUFA para n-3PUFA nessa ração é de 1,5:1.

As dietas foram conservadas em freezer a -20ºC e trocadas a cada 2 dias para evitar oxidação dos óleos. Foi adaptado nas gaiolas um papel protetor no local onde a ração é colocada, a fim de evitar incidência direta da luz sob a mesma.

Tabela 1: Ingredientes da ração (baseado na dieta AIN-93G)

Ingrediente	g/kg dieta
Fonte Protéica:	
Caseina (day 0-21)	200
ou	
Ovalbumina (dia 21 - 28)	200
Fonte lipídica:	
Óleo de soja (Ração 1)	70
ou	
Óleo de peixe (Ração 2)	70
ou	
Óleo soja/peixe (Ração 3)	42/28
Amido de milho	529.5
Sacarose	100
Fibra (Celulose)	50
Mineral mix (AIN-93G-MX)	35
Vitamina mix (AIN-93-VX)	10
L-Cisteína	3
Bitartarato de colina (41.1% choline)	2.5
4-butil-hidroquinona	0.014

3.4 Indução da alergia alimentar

A indução da alergia alimentar foi feita por meio da injeção de albumina da clara de ovo (OVA) (Five times crystallized, hen's egg albumin, Grade V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), na dose de 10µg, adsorvida em hidróxido de alumínio (1mg) e salina (0.2mL) por via sub-cutânea no dorso (dia 0). Estes animais receberam, 14 dias depois da primeira injeção de OVA, um reforço contendo o antígeno diluído em salina. Para o desafio alergênico, os camundongos sensibilizados receberam no dia 21 uma solução de 20% de clara de ovo desidratada, da marca comercial Luz alimentos LTDA, como única fonte de líquido, ou uma ração no qual a proteína caseína era substituída pela clara de ovo desidratada, constituindo a única fonte protéica.

O grupo controle recebeu uma solução de hidróxido de alumínio e salina no dia 0 e apenas salina no dia 14. A partir do dia 21, os animais receberam a mesma

solução de 20% de clara de ovo desidratada, como única fonte de líquido ou a ração com a clara de ovo no lugar da caseína. O tempo do desafio oral, no qual os animais ficaram ingerindo o antígeno, foi de 7 dias. No dia 28 ocorreu a eutanásia dos animais e retirada do material a ser analisado.

3.5 Elaboração do desenho experimental

Os animais foram subdivididos em: 1) grupo controle (animais não sensibilizados ou OVA-) e; 2) grupo alérgico (animais sensibilizados ou OVA+). Ambos os grupos apresentavam animais que consumiam as três diferentes rações preparadas.

Foram realizados dois protocolos. A diferença entre eles foi o meio pelo qual o antígeno foi oferecido, conforme a figura abaixo:

Dia - 21 – Início da ração balanceada, utilizando os diferentes óleos.

Dia 0 – Sensibilização.

Dia14 – Reforço imunológico.

Dia 21 – Desafio utilizando solução de clara de ovo (20%) como única fonte de líquido (PROTOCOLO 1) ou ração contendo a OVA (PROTOCOLO 2).

Dias 28 – Eutanásia dos animais para avaliação sorológica e histológica.

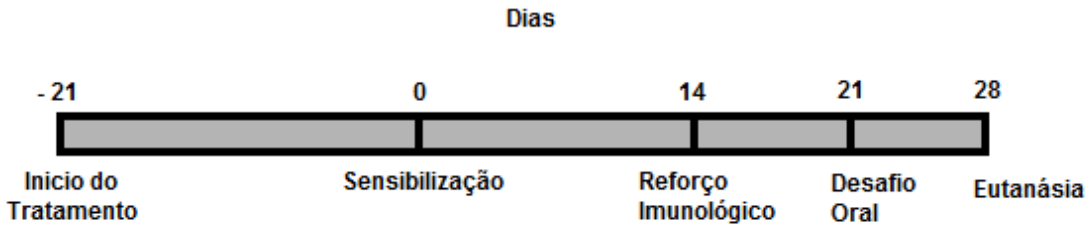

Figura 3: Desenho experimental

3.6 Avaliação do peso corporal e tecido adiposo periuterino.

O peso corporal foi avaliado uma vez por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o final (dia 28). Durante a eutanásia, o tecido adiposo periuterino foi retirado e pesado. O peso deste tecido foi correlacionado ao peso corpóreo do animal.

3.7 Obtenção de soro

Sangrias foram feitas ao término de cada experimento, a partir de vasos axilares, em animais anestesiados com xilasina (10 mg/kg) e ketamina (100 mg/kg). Após coagulação, o sangue foi centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos para retirada do soro que foi colocado em tubos individuais e congelados a -20°C para posteriores análises.

3.8 Dosagem dos anticorpos IgE anti-ovalbumina

A dosagem de anticorpos foi feita por meio do teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que segue a metodologia descrita a seguir: Microplacas de poliestireno foram incubadas a 4ºC, com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo na concentração de 1:250 diluídos em 50μL de tampão carbonato pH=9.6, por poço, durante uma noite. Posteriormente, as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora com 200μL de solução caseína a 0,25% em PBS, por poço, para bloqueio à temperatura ambiente. A solução foi desprezada e as placas incubadas por 2 horas com 50μL por poço de soro total dos animais a serem testados. As placas foram lavadas com solução salina-Tween e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com 1μL de OVA-Biotina em 50μL de PBS-caseína, por poço. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas, no

escuro, com 50µL por poço de estreptoavidina-peroxidase na concentração de 1:5000 por 45 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween, incubadas e protegidas da luz, por 15 minutos à temperatura ambiente com 100µL, por poço, de tampão citrato pH=5.0 contendo H_2O_2 e ortofenileno-diamino (OPD). As reações foram interrompidas, após 15 minutos, pela adição de 20µL por poço de H_2SO_4 2N. Em todas as placas foram colocados um controle positivo padrão (pool de plasmas de animais imunes), um controle negativo (pool de plasma de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica foi obtida em leitor de ELISA com filtro de 490 nm. Os resultados foram amostrados em unidades arbitrárias (UA) a partir do padrão positivo considerado como 1000 unidades.

3.9 Dosagem sérica dos anticorpos IgG1 anti-ovalbumina

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

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

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

3.10 Avaliação morfológica da alergia

O intestino foi lavado com salina fisiológica para retirada das fezes e então dividido em quatro partes: da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Este procedimento foi adotado por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, e foi utilizado o critério baseado em FERRARIS et al. (1992). A alergia alimentar foi avaliada morfologicamente pelo segmento do jejuno proximal,

que foi retirado e fixado em formol tamponado a 10%, desidratado em soluções decrescentes de alcoóis e incluído em parafina. Cortes de 4 μm foram obtidos e corados e posteriormente analisados usando microscópio óptico convencional.

3.10.1 Avaliação da presença de muco intestinal

A avaliação da presença de muco intestinal foi feita por meio do método de coloração por PAS (Periodic Acid Schiff). Neste método, os cortes foram desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados no Reativo de Schiff durante 10 minutos ou mais, até que atinjam uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes ficaram evidenciadas em um tom rosa escuro.

As lâminas foram montadas e foram capturadas imagens de três campos do jejuno proximal a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas com a utilização do software ImageJ loucher. Para a determinação da área das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subseqüente cálculo da área total. O resultado foi expresso em porcentagem de área de muco/área total.

3.10.2 Avaliação do número de eosinófilos

Para a identificação e contagem dos eosinófilos, os cortes do jejuno proximal foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (OLYMPUS B201). Dez campos foram escolhidos aleatoriamente, em um aumento de 40X (53.333μm2/campo) para a contagem do número de eosinófilos. O resultado foi expresso em número de eosinófilos/campo.

3.11 Avaliação de rolamento e adesão celular por Microscopia Intravital (MIV)

Para visualização do recrutamento de leucócitos in vivo, os animais foram anestesiados e submetidos a um acesso cirúrgico para exposição do intestino delgado. Os animais foram mantidos sob temperatura constante (34ºC) e os vasos intestinais foram visualizados utilizando microscopia intravital com microscópio de Epi-fluorescencia (OLYMPUS BX41). O corante rodamina foi usado para visualização do rolamento e adesão celular na vasculatura intestinal. O rolamento foi avaliado contando-se o número de células que passaram por um determinado ponto durante 3 minutos, expressando-se o número de células/minuto. Foi considerada aderente, a célula que permaneceu estacionária por pelo menos 30 segundos. Foi contado o número de células aderentes no espaço de 100µm durante 5 minutos, sendo o valor expresso em número de células/100µm.

3.12 Análise estatística

A análise das diferenças na resposta entre grupos relacionados foi feita pela análise de variância (ANOVA). Para comparações pareadas entre grupos foi usado ANOVA de Tukey. Nas análises das diferenças na resposta entre grupos relacionados foram feitas utilizando-se teste t de Student. O nível de significância foi considerado quando $p<0.05$. As análises foram realizadas com o auxílio dos softwares de estatística: GraphPad *InStat®* e GraphPad *Prisma*®3.