

Olívia Gonçalves de Matos

Efeito da ingestão dos óleos de soja e de peixe na alergia alimentar induzida experimentalmente em camundongos

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2010

Olívia Gonçalves de Matos

Efeito da ingestão dos óleos de soja e de peixe na alergia alimentar induzida experimentalmente em camundongos

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Patologia Geral.

Orientadora: Professora Dr^a Denise Carmona Cara Machado

Departamento de Morfologia – ICB - UFMG

Co-orientador: Dr Gustavo Batista de Menezes

Departamento de Morfologia – ICB - UFMG

Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte

2010

Este trabalho foi realizado no laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental (NIPE), do Departamento de Patologia Geral e no laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração, do Departamento de Morfologia, no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio financeiro: CNPq e FAPEMIG

"De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos fazer:

Da interrupção, um caminho novo
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro

E assim terá valido a pena existir! "

Fernando Sabino

Dedico esse trabalho a meus pais e à minha irmã, que sempre me apóiam e estão ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem ele nada seria possível.

Aos meus pais pelo amor, apoio e compreensão.

À minha irmã por me ouvir e me dar carinho nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Denise pela oportunidade, apoio, carinho e compreensão.

Ao meu co-orientador Gustavo por me mostrar o que é ter amor pela ciência.

À Mirna pela amizade e apoios fundamentais para minha conquista.

Ao Pedro e à Sylvinha, que me ajudaram e me ensinaram tanto.

Às colegas de grupo: Luana, Maria, Débora, Denise, Natalia, Renata, Juliana.
Pessoas muito importantes para meu aprendizado!

Às professoras Ana Faria e Jacqueline Leite pelas dicas no trabalho.

Às técnicas do Departamento de Patologia Vânia, Olinda e Jaqueline, pela ajuda e paciência, sempre com muito carinho.

A todos os colegas e professores do Departamento de Patologia Geral.

À Josy e aos colegas do Laboratório de Imunobiologia, que me auxiliaram em algumas técnicas.

Aos colegas do Laboratório de Morfologia, que me receberam tão bem!

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	1
1 INTRODUÇÃO	4
1.1 Alergia Alimentar.....	4
1.2 Modelo experimental de alergia alimentar.....	14
1.3 Ácidos graxos poliinsaturados – características e fontes alimentares	15
1.4 Ácidos graxos poliinsaturados e função imune	17
1.5 Ácidos graxos poliinsaturados e alergia alimentar	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Análise do perfil de lipídios do óleo de peixe utilizado na dieta.....	25
3.1.1 Análise do óleo de peixe	25
3.1.2 Análise comparativa do óleo de peixe com óleo de soja	26
3.2 Animais	26

3.3 Dieta e tratamento	27
3.4 Indução da alergia alimentar.....	28
3.5 Elaboração do desenho experimental.....	29
3.6 Avaliação do peso corporal e tecido adiposo periuterino.....	30
3.7 Obtenção de soro.....	30
3.8 Dosagem dos anticorpos IgE anti-ovalbumina.....	30
3.9 Dosagem sérica dos anticorpos IgG1 anti-ovalbumina.....	31
3.10 Avaliação morfológica da alergia.....	32
3.10.1 Avaliação da presença de muco intestinal	33
3.10.2 Avaliação do número de eosinófilos	33
3.11 Avaliação de rolamento e adesão celular por Microscopia Intravital (MIV)	34
3.12 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Análise do óleo de peixe e comparação com o perfil lipídico do óleo de soja	35
4.2 Protocolo 1: Ingestão do antígeno (OVA) por meio da ração	36
4.2.1 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA IgE e IgG1 após o desafio oral	36
4.2.2 Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal	38
4.2.3 Produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado	39
4.2.4 Avaliação de rolamento e adesão celular por Microscopia Intravital (MIV)	41
4.2.5 Avaliação da perda de peso corpóreo e tecido adiposo periuterino	43
4.3 Protocolo 2: Ingestão do antígeno por meio de uma solução de 20% de clara de ovo na mamadeira, como única fonte de líquido	44
4.3.1 Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA IgE e IgG1 após o desafio oral	44
4.3.2 Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal	46

4.3.3 Produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado	47
4.3.4 Avaliação da perda de peso corpóreo e gordura periuterina	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo da alergia alimentar	11
Figura 2: Ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular	20
Figura 3: Desenho experimental	29
Figura 4: Perfil cromatográfico do óleo de peixe	35
Figura 5: Avaliação da IgE anti-OVA, Protocolo 1	37
Figura 6: Avaliação da IgG1 anti-OVA, Protocolo 1	37
Figura 7: Avaliação histológica do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, Protocolo 1	38
Figura 8: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal	39
Figura 9: Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado, Protocolo 1	40
Figura 10: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal, Protocolo 1	41
Figura 11: Avaliação do rolamento e adesão celular, Protocolo 1	42
Figura 12: Avaliação peso corporal, Protocolo 1	44
Figura 13: Avaliação da gordura periuterina, Protocolo 1	45
Figura 14: Avaliação da IgE anti-OVA, Protocolo 2	46
Figura 15: Avaliação da IgG1 anti-OVA, Protocolo 2	46
Figura 16: Avaliação histológica do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, Protocolo 2	47
Figura 17: Infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, Protocolo 2	48
Figura 18: Avaliação histológica do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado, Protocolo 2	49

Figura 19: Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal, Protocolo 2	50
Figura 20: Avaliação peso corporal, Protocolo 2	51
Figura 21: Avaliação da gordura periuterina, Protocolo 2	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ingredientes da ração (baseado na dieta AIN-93G)	28
Tabela 2: Perfil dos ácidos graxos utilizados na dieta dos animais	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico

AGMI - ácidos graxos monoinsaturados

AGS - ácidos graxos saturados

Al(OH)₃ - hidróxido de alumínio

ALA - ácido α-linolênico

ANI 93G – American Institute Nutrition (ração balanceada)

APC – célula apresentadora de antígeno

ATP - adenosina trifosfato

BF₃ – trifluoreto de boro

BHT – *butylated hydroxytoluene* (conservante)

COX – ciclooxigenase

CRH – hormônio corticotrópico

DGLA - ácido di-γ-linolênico

DHA - ácido docosaexaenóico

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*

EPA - ácido eicosapentaenóico

EPM – erro padrão da média

GALT - tecido linfóide associado ao intestino

GLA - ácido γ-linolênico

GM-CSF – fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

HE - hematoxilina-eosina

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1

IFN- γ – interferon- γ

Ig – imunoglobulina

IgAS – imunoglobulina A secretória

IL – interleucina

LA - ácido linoléico

LFA-1 – antígeno 1 associado à função leucocitária

LOX - lipooxigenase

LT - leucotrieno

LXs – lipoxinas

MDA - malondialdeído

MHC-II – complexo de histocompatibilidade principal tipo II

MIP - fatores inibidores da migração de macrófagos

n-3PUFA - ácidos graxos poliinsaturados ômega 3

n-6PUFA - ácidos graxos poliinsaturados ômega 6

NF- κ B – fator nuclear κ B

OP - óleo de peixe

OPD - ortofenileno-diamino

OS - óleo de soja

OSP - óleo de soja + peixe

OVA- - animais não sensibilizados por ovalbumina

OVA - ovalbumina

OVA+ - animais sensibilizados por ovalbumina

PAF – fator ativador de plaquetas

PAS - *Periodic acid Schiff*

PBS - salina tamponada com fosfato

PDs - protectinas

PG - prostaglandina

PUFAS - ácidos graxos poliinsaturados

RPM – rotações por minuto

RvDs – resolvina da série D

RvEs - resolvina da série E

TBARS - *Thiobarbituric acid reagents substances*

TGF- β – fator transformador de crescimento β

TGI – trato gastrointestinal

Th – linfócito T helper

TNF – fator de necrose tumoral

TX - tromboxano

UA – unidade arbitrária

VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular 1

VLA-4 - antígeno de ativação muito tardio