

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Enfermagem
Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde

Isabella Moreira e Silva

**MODELO DE ALERGIA A OVALBUMINA EM ANIMAIS NÃO OBESOS
DIABÉTICOS (NOD)**

Belo Horizonte

2025

Isabella Moreira e Silva

**MODELO DE ALERGIA A OVALBUMINA EM ANIMAIS NÃO OBESOS
DIABÉTICOS (NOD)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde, seguindo a linha de pesquisa em Nutrição Clínica e Experimental da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Nutrição e Saúde.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Coorientadora: Dra. Lícia Torres

Belo Horizonte

2025

Silva, Isabella Moreira e.
SI586m Modelo de Alergia a Ovalbumina em Animais Não Obesos Diabéticos (NOD) [recurso eletrônico]. / Isabella Moreira e Silva. - - Belo Horizonte: 2025.
74f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Ana Maria Caetano Faria.
Coorientador (a): Lícia Torres.
Área de concentração: Nutrição e Saúde.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Diabetes Mellitus Tipo 1. 2. Hipersensibilidade Alimentar. 3. Camundongos Endogâmicos NOD. 4. Teste de Tolerância a Glucose. 5. Alergia e Imunologia. 6. Dissertação Acadêmica. I. Faria, Ana Maria Caetano. II. Torres, Lícia. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: QW 904

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

ATA DE NÚMERO 128 (CENTO E VINTE E OITO) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA ISABELLA MOREIRA E SILVA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.


Aos 23 (vinte e três) dias do mês de outubro de dois mil e vinte e cinco, às 10:00 horas, realizou-se no por meio de videoconferência, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "**MODELO DE ALERGIA A OVOALBUMINA EM ANIMAIS NÃO OBESOS DIABÉTICOS (NOD)**", da aluna **Isabella Moreira e Silva**, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Nutrição Clínica e Experimental". A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores doutores Ana Maria Caetano de Faria, Mariana Camila Gonçalves Miranda e Momtchilo Russo, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

- APROVADO;
 APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;
 REPROVADO.


O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Ana Maria Caetano de Faria, Presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 23 de outubro de 2025.


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

Documento assinado digitalmente
 ANA MARIA CAETANO DE FARIA
Data: 13/12/2025 23:39:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Mariana Camila Gonçalves Miranda
Coorientadora (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York)

Documento assinado digitalmente
 MARIANA CAMILA GONCALVES MIRANDA
Data: 18/12/2025 13:34:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Momtchilo Russo
Membro Titular (USP)

Documento assinado digitalmente
 MOMTCHILLO RUSSO
Data: 18/12/2025 17:45:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela dádiva da vida, repleta de motivos de sublime felicidade, pela fé que me dá força nos momentos difíceis e pela luz que sempre guiou e iluminou meu caminho durante essa trajetória.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por acreditarem em mim, apoiando-me constantemente. Vocês são minha base e inspiração diária. À minha família, pelo incentivo e pelas orações.

À professora Ana Maria Caetano, por quem tenho grande admiração. Obrigada pela confiança, por me ajudar a crescer e por permitir que eu fizesse parte da equipe incrível que é o Laboratório de Imunobiologia.

À Lícia Torres, pela paciência, orientação e amizade. Por acreditar em mim e por compartilhar seus conhecimentos e sabedoria com a menina “naive” que chegou ao laboratório sem saber nada. Você foi parte fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Tatiani Maioli, que é para mim grande inspiração, por estar sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos e por incentivar a buscar o melhor.

Aos meus amigos libianos, por tantos momentos de trabalho, aprendizado, conselhos, companheirismo e descontração. Gostaria de citar o nome de cada um de vocês, mas essa tarefa é difícil, já que o LIB tem crescido tanto, sendo contemplado cada vez mais com pessoas especiais e dedicadas. Saibam que cada um de vocês, com suas particularidades, trouxe inspiração tanto profissional quanto pessoal.

Aos amigos que, com gestos simples e até inconscientes, me fortalecem. Obrigada pela escuta, apoio e presença em minha vida.

Às amigas e companheiras que tive o privilégio de conhecer nas disciplinas do Departamento de Nutrição, com quem compartilhei inseguranças e conquistas. Torço sempre pelo merecido sucesso de vocês.

À Ildinha, Hermes, Patrícia e demais funcionários do ICB, por manterem nosso laboratório, biotério e departamento em funcionamento, permitindo melhores condições para a realização das pesquisas, além de serem pessoas tão acolhedoras e amáveis.

Aos laboratórios parceiros, que tantas vezes nos ajudaram, cedendo apoio e recursos.

Aos professores do Departamento de Nutrição, por contribuírem para minha formação e por estarem sempre empenhados em manter a qualidade do ensino.

Ao Mateus Pedrosa, da equipe do Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde, pela disponibilidade em sanar todas as minhas frequentes dúvidas, sempre com atenção e paciência.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realizar este mestrado e por me fazer sentir em casa durante esses anos de estudo.

Às agências de fomento à pesquisa, pelo investimento em meu trabalho e em minha formação acadêmica.

E, finalmente, à ciência e à pesquisa, que nos proporcionam não apenas respostas, mas também novas perguntas, fortalecendo a construção do conhecimento por meio da dedicação, da curiosidade e do esforço coletivo

Resumo

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença autoimune crônica caracterizada pela destruição seletiva das células β pancreáticas localizadas nas ilhotas de *Langerhans* e responsáveis pela produção de insulina. Esse processo, mediado principalmente por linfócitos T autorreativos, resulta em deficiência absoluta de insulina, hormônio essencial para a captação de glicose pelos tecidos. O desenvolvimento da doença envolve a interação de fatores genéticos, ambientais, alterações da microbiota intestinal e componentes dietéticos, que contribuem para a quebra da tolerância imunológica. Além das alterações metabólicas, o diabetes tipo 1 está associado a complicações agudas e crônicas, sendo considerado um importante problema de saúde pública. Estudos recentes mostram que camundongos NOD que desenvolvem espontaneamente o diabetes do tipo 1 apresentam várias alterações na mucosa intestinal interferindo inclusive no estabelecimento da tolerância oral. A mucosa intestinal é a maior superfície de contato com o meio externo entrando em contato contínuo com antígenos da dieta e com a microbiota comensal. Os mecanismos de tolerância oral são responsáveis pela manutenção da homeostase da mucosa intestinal e por impedir reações imunes inflamatórias contra os antígenos da dieta e da microbiota. Sabe-se que a quebra da tolerância oral pode resultar no surgimento de alergias alimentares. Nesse cenário, a hipótese desse trabalho é que as alterações presentes na mucosa intestinal dos camundongos NOD poderiam interferir com a indução de alergia alimentar nesses animais. Avaliamos a indução de alergia alimentar em camundongos NOD comparando-os com camundongos BALB/c. Curiosamente, embora os camundongos NOD apresentem defeitos na mucosa intestinal assim como na indução de tolerância oral e contrariamente ao que se descreve na literatura sobre a sensibilização alérgica com baixas doses de alérgenos, a dose do alérgeno ovoalbumina (OVA) necessária para induzir a produção de IgE específica nesses animais precisa ser mais alta (100 ug) que aquela utilizada (10 ug) para induzir a mesma doença em camundongos BALB/c. A sensibilização dos camundongos NOD com 100 ug de OVA, mas não com 1 ou 10 ug de OVA, adsorvida em $AL(OH)_3$ levou ao aumento dos níveis de IgE sérica após o desafio oral. O teste de anafilaxia cutânea ativa também mostrou que a dose alta foi a mais eficaz para a degranulação dos mastócitos levando ao aumento da permeabilidade vascular. Na análise histopatológica do intestino, mostramos que essa dose induziu o aumento na frequência de linfócitos intraepiteliais e no número de eosinófilos na lâmina própria

caracterizando um perfil inflamatório alérgico. Além disso, a alta dose acelerou o processo de insulite, intensificando o desenvolvimento da doença. Os achados deste trabalho reforçam a importância do modelo NOD como ferramenta experimental para compreender possíveis mecanismos que podem conectar a predisposição autoimune ao desenvolvimento de respostas alérgicas alimentares e como essas respostas acontecem.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 1; Camundongos NOD; Alergia alimentar

Abstract

Type 1 diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease characterized by the selective destruction of pancreatic beta cells located in the islets of Langerhans and responsible for insulin production. This process, mediated primarily by autoreactive T lymphocytes, results in absolute insulin deficiency, a hormone essential for glucose uptake by tissues. The development of the disease involves the interaction of genetic and environmental factors, alterations in the intestinal microbiota, and dietary components, which contribute to the breakdown of immunological tolerance. In addition to metabolic alterations, type 1 diabetes is associated with acute and chronic complications and is considered a major public health problem. Recent studies show that NOD mice that spontaneously develop type 1 diabetes exhibit several alterations in the intestinal mucosa, including interfering with the establishment of oral tolerance. The intestinal mucosa is the largest surface in contact with the external environment, coming into continuous contact with dietary antigens and the commensal microbiota. Oral tolerance mechanisms are responsible for maintaining intestinal mucosal homeostasis and preventing inflammatory immune responses to dietary and microbiota antigens. It is known that a breakdown in oral tolerance can result in the development of food allergies. In this scenario, the hypothesis of this study is that alterations in the intestinal mucosa of NOD mice could interfere with the induction of food allergies in these animals. We evaluated the induction of food allergies in NOD mice by comparing them to BALB/c mice. Interestingly, although NOD mice exhibit defects in the intestinal mucosa and in the induction of oral tolerance, and contrary to what is described in the literature regarding allergic sensitization with low doses of allergens, the dose of the allergen ovalbumin (OVA) required to induce specific IgE production in these animals must be higher (100 µg) than that used (10 µg) to induce the same disease in BALB/c mice. Sensitization of NOD mice with 100 µg of OVA, but not with 1 or 10 µg of OVA adsorbed to AL(OH)₃, led to increased serum IgE levels after oral challenge. The active cutaneous anaphylaxis test also showed that the high dose was most effective for mast cell degranulation, leading to increased vascular permeability. In histopathological analysis of the intestine, we showed that this dose induced an increase in the frequency of intraepithelial lymphocytes and the number of eosinophils in the lamina propria, characterizing an allergic inflammatory profile. Furthermore, the high dose accelerated the insulinitis process, intensifying disease progression. The findings of this study reinforce the importance of the NOD model as an experimental tool for

understanding possible mechanisms that may link autoimmune predisposition to the development of food allergic responses and how these responses occur.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus; NOD mice; Food allergy

Lista de Figuras

Figura 1: Representação da ilhota pancreática e mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese do diabetes mellitus tipo 1

Figura 2: Organização do sistema imune associado a mucosa intestinal

Figura 3: Mecanismos imunológicos da alergia alimentar

Figura 4: Desenho Experimental do modelo

Figura 5: Níveis de IgE específica no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA por via oral

Figura 6: Níveis de IgE total no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA por via oral

Figura 7: Níveis de IgG1 total no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA por via oral

Figura 8: Peso corporal dos camundongos ao longo do experimento

Figura 9: Consumo de ração em gramas dos camundongos ao longo do experimento

Figura 10: Porcentagem do consumo da solução contendo OVA ao longo do experimento

Figura 11: Ensaio de anafilaxia cutânea ativa em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA.

Figura 12: Avaliação histopatológica e morfométrica das vilosidades intestinais de camundongos BALB/c e NOD sensibilizados e desafiados com OVA

Figura 13: Frequência de linfócitos intraepiteliais no intestino delgado de camundongos NOD e BALB/c

Figura 14: Frequência de células caliciformes no intestino delgado de camundongos NOD e BALB/c

Figura 15: Número de eosinófilos infiltrados na mucosa do intestino delgado.

Figura 16: Percentual de ilhotas pancreáticas com diferentes graus de insulite nos grupos experimentais

Figura 17: Valores de glicemia (mg/dl) de camundongos BALB/c e NOD

Lista de Abreviaturas

Ag – Antígeno

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

APC – Célula apresentadora de antígeno

BALB/c Linhagem isogênica de camundongos

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

ELISA – Ensaio Imunoenzimático indireto

FcεRI – Receptor de alta afinidade para IgE

Foxp3 Forkhead Box P3 – fator de transcrição de células T regulatórias

GALT – Tecido linfoide associado ao intestino

HE – Hematoxilina/Eosina

IEL – Linfócito intraepitelial

Ig – Imunoglobulina

IgA – (Imunoglobulina A)

IgE – (Imunoglobulina E)

IL – Interleucina

ILF – Folículos linfoides isolados

LAP – Peptídeo Associado à Latência

MALT – Tecido linfoide associado a mucosa

Mg – Miligrama

mL – Mililitros

NOD – Não obeso diabético

OVA – Ovalbumina

PAF – Fator de agregação plaquetária

PBS – Salina Tamponada

RPM – Rotações por minuto

sIgA – Imunoglobulina secretória A

TGF – Fator de transcrição e crescimento

Th – Linfócito T auxiliar

Th2 – Linfócito T auxiliar do tipo 2

Treg – Células T Reguladoras Específicas

μg – microgramas

μL – microlitro

μm – micrômetro

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Panorama da Diabetes Mellitus Tipo 1	15
1.2 Componentes Genéticos e Patogênese da Diabetes Mellitus Tipo	16
1.3 Modelo Experimental: NOD (Non-Obese Diabetic), Um Modelo Espontâneo e Autoimune de Diabetes Mellitus Tipo 1	17
1.4 Diabetes Mellitus tipo 1: A Interface entre o Sistema Imunológico e a Mucosa Intestinal	19
1.5 Bases Imunológicas da Mucosa Intestinal e o Desenvolvimento da Tolerância Oral	21
1.6 A Quebra da Homeostase Intestinal e Mecanismos Imunológicos da Alergia Alimentar	24
1.7 Alergia Alimentar	26
1.8 O Fenômeno da Aversão Imunológica	29
1.9 Modelo Experimental	29
Justificativa	31
2 Objetivos	32
3 Material e Métodos	33
3.1 Animais	33
3.2 Indução da Alergia Alimentar	33
3.3 Ingestão Alimentar	34
3.4 Consumo da Solução	34
3.5 Delta Peso dos Animais	34
3.6 Avaliação da Incidência de Diabetes Autoimune	35
3.7 Coleta do Soro	35
3.8 Protocolo de Anafilaxia Ativa	35
3.9 Obtenção das Amostras	35
3.10 Método Swiss-rolling	36
3.11 Processamento Histológico e Digitalização das Lâminas	36
3.12 Altura das Vilosidades	36
3.13 Contagem de Linfócitos Intraepiteliais (IEL)	37
3.14 Contagem de Células Caliciformes	37
3.15 Contagem de Eosinófilos	37
3.16 Avaliação das Ilhotas Pancreáticas	37

3.17	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de IgE Total	38
3.18	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de IgE anti-OVA	38
3.19	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de IgG1 Total	39
3.20	Análise Estatística	39
4	Resultados	41
4.1	Camundongos NOD apresentaram aumento dos títulos de IgE somente com altas dose de antígeno	41
4.2	Avaliação clínica na indução de alergia por OVA em camundongos NOD	43
4.3	Avaliação do consumo dietético durante o desafio oral	44
4.4	Camundongos NOD desafiados com baixa dose consumiram menor volume de OVA durante o desafio oral	45
4.5	Camundongos NOD tratados com 100mg de OVA apresentaram aumento da permeabilidade vascular	46
4.6	Histologia do intestino em animais NOD tratados com OVA	46
4.7	O tratamento com OVA aumenta a frequência de insulite em animais NOD	49
4.8	Animais NOD não apresentaram diferenças na glicemia após o tratamento	51
5	Discussão	52
6	Conclusão	60
7	Referencias	61

1. Introdução

1.1 Panorama da Diabetes Mellitus Tipo 1

A Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1) é considerada uma doença endócrina autoimune órgão-específica, que resulta da destruição seletiva das células beta das ilhotas pancreáticas, produtoras de insulina (LIU; EISENBARTH, 2002).

Gregory et al. (2022) fornece uma análise abrangente da incidência, prevalência e mortalidade da diabetes tipo 1 (DM1) em 2021, com projeções até 2040. Os resultados indicam que, em 2021, aproximadamente 8,4 milhões de pessoas globalmente viviam com DM1, sendo 18% menores de 20 anos, 64% entre 20 e 59 anos e 19% com 60 anos ou mais. Cerca de 35 mil indivíduos não diagnosticados morreram dentro de 12 meses após o início dos sintomas. A expectativa de vida restante para uma criança de 10 anos diagnosticada em 2021 variou significativamente entre países de diferentes níveis de renda: de 13 anos em países de baixa renda a 65 anos em países de alta renda. O estudo também identificou uma "prevalência ausente" de aproximadamente 3,7 milhões de casos, refletindo mortes prematuras atribuídas a cuidados inadequados ou falta de diagnóstico. Projeções indicam que, até 2040, o número de pessoas vivendo com DM1 pode aumentar para 13,5 a 17,4 milhões, representando um aumento de 60% a 107% em relação a 2021, com os maiores aumentos relativos esperados em países de baixa e média renda.

Além disso, a diabetes mellitus tipo 1 está fortemente associado a complicações graves e de início precoce. Pacientes com essa condição apresentam maior risco de desenvolver retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica e autonômica, bem como doenças cardiovasculares, mesmo em idade jovem. Essas complicações não apenas comprometem a qualidade de vida, como também elevam substancialmente os índices de hospitalização e mortalidade, e embora as consequências sejam amplamente conhecidas, ainda há lacunas significativas quanto ao diagnóstico precoce e no acesso equitativo ao cuidado, o que perpetua desigualdades no prognóstico e no controle da doença (THE LANCET DIABETES & ENDOCRINOLOGY, 2024).

O tratamento atual é baseado na reposição exógena de insulina, buscando a manutenção de uma taxa normal de glicose circulante, demandando monitoramento

constante, fazendo necessária a perfuração capilar e injeções de insulina que chegam a cerca de mil por ano (PHILLIPS et al., 2011).

A terapia nutricional também é uma estratégia central no manejo da doença, especialmente por seu papel no controle glicêmico e na prevenção de complicações crônicas. Durante as diferentes fases da doença é essencial garantir um aporte energético apropriado, assegurando o crescimento adequado em crianças e adolescentes, evitando distúrbios metabólicos associados. A distribuição equilibrada de macronutrientes, com ênfase no controle da ingestão de carboidratos e na aplicação da estratégia de contagem de carboidratos, mostra-se eficaz na estabilização da glicemia, particularmente no período pós-prandial. Além disso, dietas com maior teor de proteína, menor quantidade de gordura saturada e com baixo índice glicêmico demonstraram associação positiva com o melhor controle glicêmico em crianças e adolescentes, evidenciando a importância de intervenções nutricionais contínuas e personalizadas ao longo da vida do paciente com DM1 (LOTTENBERG et al., 2010).

1.2 Componentes Genéticos e Patogênese da Diabetes Mellitus Tipo 1

A patogênese da diabetes mellitus tipo 1 está associada a falhas nos mecanismos de tolerância imunológica, tanto central quanto periférica. O acometimento da doença inicia-se com a captura de antígenos do pâncreas por células dendríticas, que os transportam até os linfonodos pancreáticos, onde ocorre a ativação de células T CD4+ específicas. Essas células migram para as ilhotas de *Langerhans*, desencadeando uma inflamação local denominada insulite (YADAV et al., 2004). A resposta imunológica envolve predominantemente linfócitos T auxiliares do tipo Th1 e Th17, que secretam citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), promovendo a destruição das células β por meio de mecanismos que incluem a ação de citocinas, radicais livres, granzimas, perforina e indução de apoptose via Fas/Fas-L (MATHIS; VENCE; BENOIST, 2001; RABINOVITCH; SUAREZ-PINZON, 1998). Além disso, células do sistema imune inato, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, também participam do processo inflamatório, contribuindo para a progressiva destruição das células β (WÅLLBERG; COOKE, 2013). Com a redução da funcionalidade das células β , ocorre a deficiência na produção de insulina, comprometendo a captação de glicose pelos tecidos, gerando um aumento da sua

concentração no sangue (hiperglicemia), dificultando o controle glicêmico, o que contribui para o surgimento de complicações metabólicas (CANIVELL; GOMIS, 2014).

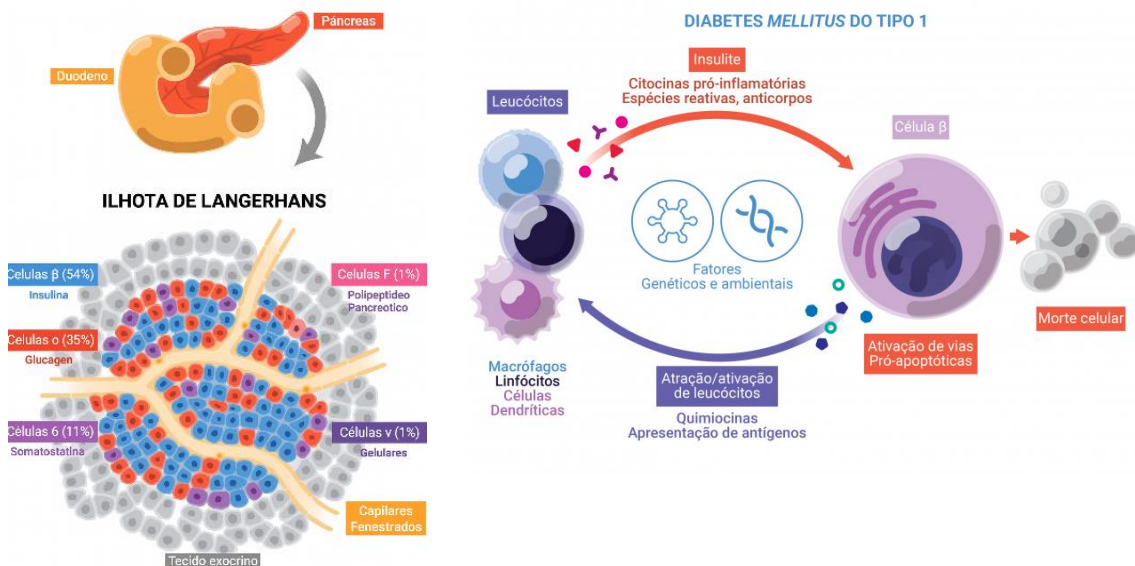


Figura 1. Representação da ilhota pancreática e mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da diabetes mellitus tipo 1. À esquerda, representação histológica de uma ilhota de Langerhans no pâncreas humano, destacando a localização das células β produtoras de insulina. À direita, esquema ilustrativo dos principais mecanismos imunológicos associados ao diabetes mellitus tipo 1, incluindo o papel das células dendríticas, linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, além da liberação de citocinas inflamatórias que culminam na destruição autoimune das células β . Fonte: LEMMC-USP (2021).

Diversos fatores genéticos estão implicados na predisposição ao diabetes mellitus tipo 1 (DM1), sendo o principal determinante de suscetibilidade os genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), localizados no cromossomo 6p21.3, mais especificamente o locus IDDM1, que responde por cerca de 40 a 50% da agregação familiar da doença (SILVA et al., 2008; KANTÁROVA et al., 2007). Alelos específicos do sistema HLA, como HLA-DR3-DQ2 (DQA10501-DQB10201) e HLA-DR4-DQ8 (DQA10301-DQB10302), estão fortemente associados ao risco de desenvolvimento de DM1, enquanto outros, como o haplótipo HLA-DR15-DQA10102-DQB10602, conferem proteção (KAWASAKI, 2023; SILVA et al., 2008). Além do IDDM1, outros loci associados ao risco incluem IDDM2, relacionado ao número variável de repetições (VNTR) no gene da insulina, e genes envolvidos na imunorregulação como CTLA-4,

PTPN22, IL-2R, AIRE e PD-1 (SILVA et al., 2008; TOOLEY et al., 2012). A combinação entre a ativação de células T e B inflamatórias e alterações em mecanismos reguladores da resposta imune contribui para a destruição progressiva das células β pancreáticas, reduzindo sua massa funcional entre 70 a 90%, o que culmina na deficiência absoluta de insulina característica do DM1 (TOOLEY et al., 2012).

Além dos fatores genéticos, aspectos ambientais também exercem influência significativa na patogênese da diabetes mellitus tipo 1 (DM1), embora ainda sejam menos caracterizados. Elementos como composição da microbiota intestinal e aspectos nutricionais também podem influenciar a resposta imune, afetando tanto o desenvolvimento quanto a progressão da resposta autoimune. Nesse contexto, destaca-se especialmente o papel da microbiota intestinal, como fator essencial no amadurecimento do sistema imunológico, podendo influenciar diretamente o surgimento da doença (ILONEN et al., 2019).

Nesse cenário, o uso de modelos animais em experimentos revela-se extremamente importante para a ampliação dos estudos no campo das doenças autoimunes. A adoção de modelos que manifestam a doença de forma espontânea permite uma compreensão mais aprofundada da fisiopatologia, além de abrir caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.3 Modelo Experimental: NOD (Non-Obese Diabetic), Um Modelo Espontâneo e Autoimune de Diabetes Mellitus Tipo 1

Modelos animais desempenham um papel fundamental na compreensão dos mecanismos patogênicos e das causas do diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Diversos modelos experimentais são utilizados para investigar essa enfermidade, os quais podem ser classificados em modelos induzidos quimicamente e modelos espontâneos.

O camundongo NOD (non obese diabetic) é um modelo de desenvolvimento espontâneo da diabetes tipo 1. Trata-se de uma linhagem isogênica de camundongos que foi desenvolvida por Makino e colaboradores em 1980 no Japão. Possuem fenótipo albino e são procedentes de uma derivação da sublinhagem Jc 1 – ICR outbreed que desenvolvia catarata (ANDERSON; BLUESTONE, 2005).

A incidência da diabetes mellitus tipo 1 na linhagem NOD tem influência do sexo, sendo significativamente mais elevada nas fêmeas, com taxas que variam entre 60% e 80%, enquanto nos machos a frequência é menor, situando-se entre 20% e 30%. Além do fator sexual, aspectos ambientais exercem forte influência sobre a manifestação da doença. Estudos demonstram que camundongos mantidos em ambientes livres de patógenos específicos apresentam maior predisposição ao desenvolvimento da doença, sugerindo que a ausência de determinados microrganismos pode favorecer o desencadeamento de respostas autoimunes características do modelo (BACH, 2002).

O início do quadro diabético é caracterizado por glicosúria leve a moderada e hiperglicemia persistente, com níveis de glicose sanguínea superiores a 250 mg/dL. Esses animais apresentam um perfil metabólico compatível com o diabetes tipo 1, evidenciado por hipoinsulinemia e hiperglucagonemia, refletindo a destruição seletiva das células β das ilhotas pancreáticas (LEITER; STAFF, 1993). À medida que a doença progride, especialmente por volta da 34ª semana de vida, observam-se sinais clínicos mais evidentes, como intensificação da hiperglicemia e glicosúria, acompanhadas de perda de peso, polidipsia e poliúria. Na ausência de tratamento com insulina exógena, os camundongos desenvolvem hiperglicemia grave e cetonemia. Contudo, diferentemente do observado em humanos, esses animais não evoluem para cetoacidose (LEITER, 1993).

1.4 Diabetes Mellitus tipo 1: A Interface entre o Sistema Imunológico e a Mucosa Intestinal

O desenvolvimento do pâncreas ocorre a partir do endoderma do intestino, o que demonstra uma estreita relação entre esses dois órgãos. Estudos demonstram que o linfonodo pancreático (PLN) é responsável não apenas pela drenagem de antígenos próprios do pâncreas, mas também por antígenos externos provenientes do trato gastrointestinal e da cavidade peritoneal. Além disso, alterações na fisiologia intestinal parecem influenciar diretamente a ativação de células T reativas às células β pancreáticas (TURLEY et al., 2005).

O reconhecido papel da mucosa intestinal para a tolerância imunológica, a complexa e dinâmica rede de interações celulares e moleculares nesse microambiente e a drenagem de antígenos para o linfonodo pancreático (Turley et al., 2005) reforçam a importância do intestino no desenvolvimento da diabetes. De fato, permeabilidade

aumentada, inflamação subclínica e defeitos na geração de Tregs são comumente observados no intestino de animais e também em pacientes diabéticos (Alam et al., 2010; Badami et al., 2011; Malaisse et al., 2004; Vaarala, 2011).

Lo Conte et al. (2023) investigou alterações na camada de muco intestinal em pacientes com diabetes tipo 1 e sua associação com disbiose intestinal e desregulação imunológica. Os resultados mostraram uma diminuição na expressão de mucinas como MUC2, MUC12, MUC13, MUC15, MUC20 e MUC21, além de peptídeos antimicrobianos como HD4 e HD5, sugerindo comprometimento da integridade da barreira intestinal. Essa alteração na camada de muco correlacionou-se com uma redução na abundância relativa de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como *Bifidobacterium dentium*, *Clostridium butyricum* e *Roseburia intestinalis*, que desempenham papel crucial na regulação da expressão de mucinas e na homeostase imunológica intestinal. Além disso, observou-se uma desregulação imunológica intestinal, caracterizada por um aumento na porcentagem de células T efectoras, como Th1, Th17 e células TNF- α +, em pacientes com DM1. Esses achados indicam que alterações na camada de muco intestinal estão associadas à disbiose e à desregulação imunológica no contexto do diabetes tipo 1, sugerindo que a integridade da barreira intestinal desempenha um papel importante na patogênese da doença.

Em sua tese de doutorado, Mariana Camila Gonçalves Miranda investigou as alterações imunológicas na mucosa intestinal de camundongos NOD (Non-Obese Diabetic), mostrando que esses camundongos apresentam alterações na mucosa intestinal que comprometem o estabelecimento da tolerância oral, essencial resposta imune a antígenos da dieta. Embora não tenha sido observado alterações clínicas na frequência de linfócitos T intraepiteliais, foram identificados prejuízos nos mecanismos de barreira imunológica do intestino delgado, como redução na produção de muco e secreção de IgA no lúmen intestinal. Além disso, observou-se uma redução na frequência de linfócitos B1 (CD19+ CD5+), células produtoras de IgA secretora (SIgA).

O desenvolvimento da DM1 nos camundongos NOD foi associado a um desequilíbrio nas populações de macrófagos intestinais, com predominância de macrófagos derivados de monócitos com perfil pró-inflamatório, em detrimento dos macrófagos residentes que secretam IL-10. Essas alterações na mucosa intestinal podem interferir na comunicação entre o pâncreas e o intestino, via linfonodo pancreático, e contribuir para o desenvolvimento do DM1.

Portanto, compreender os fatores e alterações na mucosa intestinal associados à patogênese do DM1 é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que visem a prevenção e o tratamento da doença.

1.5 Bases Imunológicas da Mucosa Intestinal e o Desenvolvimento da Tolerância Oral

A tolerância a antígenos da dieta, foi descrita precocemente na história da imunologia. Estudos pioneiros demonstraram que a administração oral de proteínas dietéticas, como a ovalbumina (OVA), presente na clara do ovo, impedia reações subsequentes de anafilaxia a essas mesmas proteínas (BESREDKA, 1909; WELLS, 1911; CHASE, 1946). O termo "tolerância oral" só passou a ser amplamente utilizado na década de 1970, quando o fenômeno foi reproduzido por novas evidências, mostrando que a administração via oral de antígenos leva à supressão da resposta imunológica humoral e celular ao antígeno administrado, reduzindo as reações mediadas por linfócitos específicos e os níveis de anticorpos (VAZ et al, 1977).

Fisiologicamente, a maior parte do contato natural com antígenos (Ag) estranhos, ocorre através das superfícies de mucosas, sendo assim, o fenômeno da indução de tolerância representa o principal evento imunológico que ocorre no intestino (FARIA; WEINER, 2006). Diante disso, torna-se essencial um delicado equilíbrio na regulação das funções do sistema imune associado a mucosa intestinal, permitindo a indução de respostas inflamatórias rápidas e eficazes frente a agentes patogênicos, ao mesmo tempo em que preserva a homeostase intestinal sob condições fisiológicas normais (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

O epitélio intestinal atua como uma barreira para patógenos, toxinas e outras substâncias indesejadas, enquanto maximiza a absorção de nutrientes digeridos. Composto principalmente por enterócitos (células colunares), responsáveis por absorver nutrientes do lúmen, além de células especializadas, representadas por três linhagens que têm origem da mesma célula-tronco: células de Paneth, produtoras de defensinas, células caliciformes produtoras de muco e células enteroendócrinas, produtoras de hormônios. As defensinas são peptídeos antimicrobianos que atuam na eliminação de bactérias patogênicas, já o muco, composto por glicoproteínas (mucinas) que são tóxicas para muitas bactérias, funciona como uma barreira física protetora, ajudando a capturar

partículas e microrganismos, além de lubrificar e hidratar as superfícies (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Abaixo da camada epitelial está a lâmina própria, uma estrutura composta por tecido conjuntivo e células do sistema imunológico inato e adaptativo: mastócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (T e B). Nela também se organizam estruturas linfóides que, coletivamente são chamadas de Tecidos Linfóides Associados às Mucosas (do inglês MALT- mucosa-associated lymphoid tissues) (MACPHERSON; MCCOY et al., 2008). Tecidos linfóides secundários são subdivididos e renomeados de acordo com o órgão que apresenta o tecido de mucosa, dentre eles, o Tecido Linfóide Associado ao Intestino (GALT), ou seja, especificamente associada ao trato gastrointestinal (RUDDLE; AKIRAV, 2009; FAGARASAN; KAWAMOTO et al., 2010).

Considerado o principal local de amostragem de antígenos e indução da imunidade adaptativa na mucosa intestinal, o GALT humano inclui as placas de Peyer multifoliculares, localizadas principalmente no íleo, o apêndice vermiforme e os numerosos folículos linfóides isolados (ILF), distribuídos ao longo do intestino (MÖRBE et al., 2021).

O fenômeno da tolerância oral corresponde ao conjunto de mecanismos imunológicos desencadeados no GALT em resposta a antígenos ingeridos reponsáveis por manter a homeostase da mucosa intestinal e regular respostas inflamatórias sistêmicas. Esse processo é caracterizado pela capacidade de suprimir tanto a resposta imune humoral quanto a celular, reduzindo a produção de anticorpos séricos e a secreção de citocinas inflamatórias, além de inibir a reação de hipersensibilidade tardia (AFUWAPE; TURNER; STROBEL, 2004; FARIA et al., 2003; MOWAT et al., 1982). Evidências experimentais demonstram, ainda, que a indução de tolerância oral pode ser utilizada como estratégia para atenuar diferentes doenças inflamatórias incluindo doenças autoimunes, alérgicas e a reação à transplantação (PINHEIRO-ROSA et al, 2021).

Para que esse processo seja estabelecido, os antígenos alimentares precisam atravessar a barreira epitelial e alcançar a lâmina própria, onde passam a interagir com células do sistema imune local. Durante a digestão, a maioria das proteínas é degradada, mas pequenos fragmentos e até proteínas intactas podem ser detectados rapidamente na lâmina própria após a ingestão (CASTRO-SÁNCHEZ; MARTÍN-VILLA, 2013; HUSBY et al., 1985). A apresentação desses antígenos por células dendríticas tolerogênicas

CD11c+CD11b-CD103+ que capturam os antígenos na lâmina própria e migram para os linfonodos mesentéricos resulta na indução de linfócitos T CD4+CD25+Foxp3+ com um perfil regulador, produtores de citocinas supressoras, como IL-10 e TGF- β (CEROVIC et al, 2024).

Produzidas no timo (células T reguladoras naturais ou tímicas) e também podendo ser induzidas em órgãos periféricos como o intestino, (células T reguladoras induzidas ou periféricas), as células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ contribuem para a homeostase intestinal e sua deficiência (número/função) está associada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas. Tanto camundongos quanto humanos com deficiências genéticas de FOXP3 desenvolvem anormalidades graves na homeostase imunológica seja sistêmica ou na mucosa intestinal (IZCUE; POWRIE, 2008).

Outra população relevante de células com função reguladora é composta por linfócitos T CD4⁺ que expressam na superfície a molécula LAP (peptídeo associado à latência). Esse peptídeo está ligado de maneira não covalente à extremidade amino-terminal do TGF- β 1, formando um complexo inativo dessa citocina (WEINER; WU, 2011). Essas células T foram inicialmente descritas como supressoras em modelos experimentais murinos de inflamação intestinal e receberam a denominação de células Th3. Sua atividade imunorreguladora se dá principalmente pela secreção de TGF- β 1, o qual exerce um papel central na inibição da resposta inflamatória de linfócitos T efetores. Essa citocina é particularmente abundante no trato gastrointestinal, onde, entre outras funções, induz nos linfócitos B a troca de isotipo para IgA, contribuindo assim para a manutenção da homeostase intestinal e sistêmica. A importância do TGF- β 1 é evidenciada por estudos com camundongos geneticamente deficientes nessa citocina, os quais desenvolvem inflamações severas e multifocais, vindo a óbito por volta dos 20 dias de vida (SHULL et al., 1992). Diversos trabalhos que investigaram a tolerância oral também relataram aumento na produção de TGF- β 1, reforçando seu papel essencial nesse processo (FARIA et al., 2003; WEINER, 2001).

A combinação dos mecanismos que levam à tolerância oral mostra que, embora seja um mecanismo natural do organismo, seu desenvolvimento depende de uma coordenação cuidadosa entre os diferentes agentes envolvidos, e quando essa homeostase é quebrada, propicia um ambiente favorável ao aparecimento de doenças como a alergia alimentar.

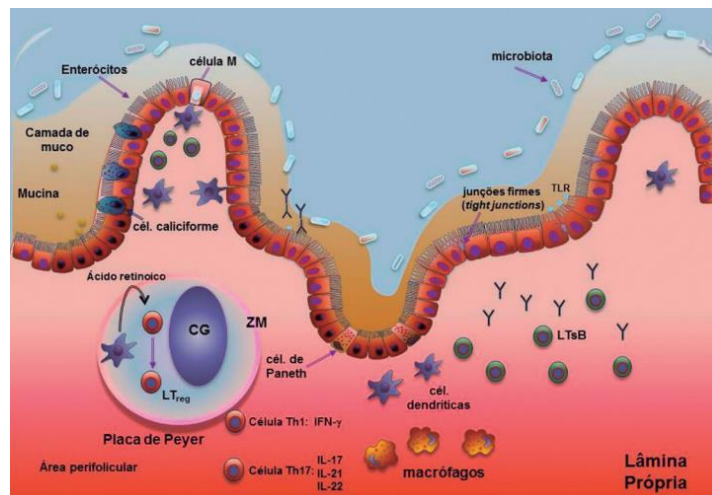


Figura 2 – Organização do sistema imune associado a mucosa intestinal. Representação esquemática da mucosa intestinal destacando a função imunológica das placas de Peyer, compostas por agregados de folículos linfoides com centros germinativos (ricos em linfócitos B) e zonas interfoliculares (ricas em linfócitos T). Evidencia-se o papel das células M na captação de antígenos do lúmen e sua entrega a células apresentadoras de antígenos (APCs), ativando linfócitos T e promovendo a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de IgA. Mostra-se ainda a atuação da IgA secretora na neutralização de patógenos no lúmen, sem induzir inflamação, favorecendo a tolerância oral. O epitélio intestinal, formado por enterócitos, células de Paneth, caliciformes e enteroendócrinas, contribui para a integridade da barreira física e imunológica. Adaptado de Gonçalves et al. (2015).

1.6 A Quebra da Homeostase Intestinal e Mecanismos Imunológicos da Alergia Alimentar

O desenvolvimento da alergia alimentar envolve uma combinação de fatores, incluindo a quebra da homeostase intestinal, que ocorre quando o sistema imunológico não consegue desenvolver tolerância oral para uma proteína específica do alimento. Isso acontece para uma classe de antígenos chamados de alérgenos que apresentam características específicas capazes de induzir a diferenciação de linfócitos Th2 e Tfh2 em pessoas ou animais com suscetibilidade genética (chamados atópicos). No intestino, as células dendríticas que captam o antígenos na lâmina própria migram para os linfonodos mesentéricos e apresentam essas moléculas antigênicas a linfócitos T helper foliculares do tipo 2 (Tfh2). Esse processo gera a produção de citocinas liberadas por linfócitos Tfh, tais como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, que ativam linfócitos B específicos para os alérgenos. Sob a influência de IL-4, células B trocam de isotipo e produzem anticorpos

IgE (BACHARIER e GEHA 2000). As moléculas de IgE específica caem na circulação e podem se ligar a receptores FcεRI expressos na membrana de mastócitos e basófilos, fenômeno chamado de sensibilização (HOLGATE e POLOSA, 2008).

Após a sensibilização, em um momento de posterior exposição ao alérgeno, a ligação cruzada dos receptores FcεR por moléculas de IgE e antígeno leva à degranulação de mastócitos e a liberação de histamina e outras aminas vasoativas, induzindo uma reação inflamatória (SICHERER; SAMPSON, 2018). Esse conjunto de reações ocorrem na fase imediata da alergia (SENGOKU et al, 2001). Já na fase tardia, ocorre a produção de leucotrienos, citocinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 entre outras) e também quimiocinas por mastócitos. Esses mediadores recrutam eosinófilos e linfócitos Th2 para o local da inflamação (LUKACS, 2001). É importante salientar que os eosinófilos são recrutados para o tecido inflamado principalmente em resposta à produção local de eotaxina (FOSTER et al, 2002). No sítio inflamatório, sob o estímulo de citocinas e quimiocinas, essas células podem liberar moléculas pró-inflamatórias que são capazes de induzir a produção de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade vascular e produção de muco (ROTHENBERG e HOGAN, 2006).

Os sintomas causados por essas reações afetam outros órgãos além do trato gastrointestinal, como a pele (urticária e edema), o trato respiratório (hiper-reatividade e constricção das vias aéreas), o trato cardiovascular (choque anafilático) e o próprio trato gastrointestinal (diarreia, dor e vômito) (RENZ et al., 2018).

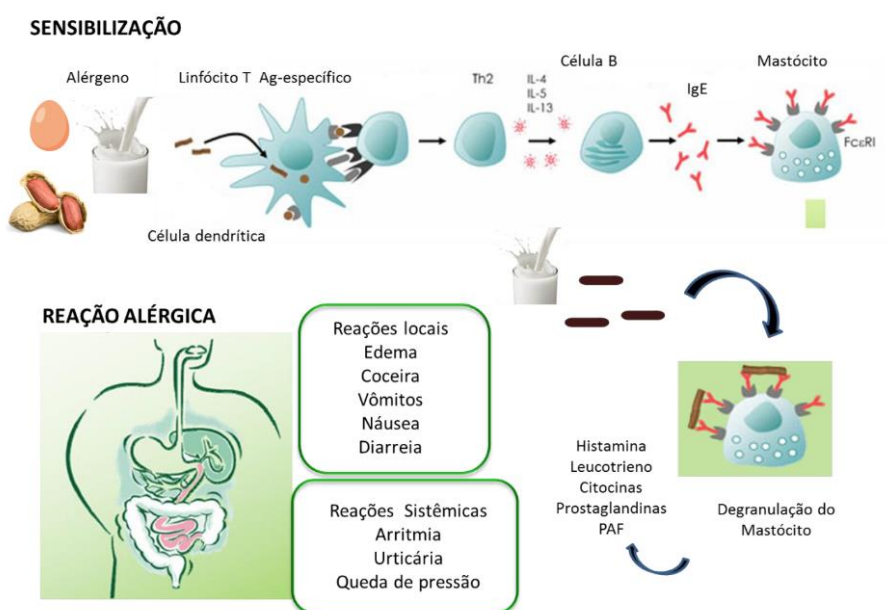


Figura 3 – Mecanismos imunológicos da alergia alimentar. Ao entrar em contato com alérgenos, as células dendríticas capturam essas substâncias e as apresentam aos linfócitos T auxiliares (Th) que reconhecem especificamente esses antígenos. Essa interação, junto com outros sinais, leva à diferenciação dos linfócitos Th em células do tipo Th2, que passam a produzir citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas, especialmente a IL-4, estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos do tipo IgE. Esses anticorpos IgE se ligam aos receptores FCεRI presentes na superfície dos mastócitos, processo conhecido como sensibilização. Posteriormente, ao ocorrer uma nova exposição ao mesmo alérgeno, os mastócitos reconhecem esse antígeno e sofrem degranulação, liberando substâncias inflamatórias que causam os sintomas clínicos típicos das reações alérgicas. Entre os mediadores liberados está o fator de agregação plaquetária (PAF), que também contribui para a inflamação.

1.7 Alergia Alimentar

A alergia alimentar é um problema de saúde pública global (SOLÉ et al., 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que a prevalência de alergia alimentar tem aumentado globalmente, estima-se que 200 a 250 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem com alergias alimentares, afetando aproximadamente 1 a 10% da população em diferentes regiões. No entanto, a OMS não fornece dados específicos detalhados, pois a prevalência pode variar bastante entre países e populações.

De acordo com a National Institutes of Health (NIH) dos EUA, a prevalência de alergia alimentar em crianças nos Estados Unidos é estimada em cerca de 8% a 10%. Em adultos, essa prevalência é um pouco menor, variando entre 4% e 6%. Os alimentos mais comuns incluem amendoim, nozes, leite, ovos, soja, trigo, peixe e mariscos.

Já a Sociedade Brasileira de Alergia e Imunologia (SBAI), indica que no Brasil a prevalência de alergia alimentar varia entre 4% e 8% na população infantil, com uma tendência de aumento ao longo dos anos. Os alimentos mais frequentemente associados às alergias no Brasil são os mesmos observados internacionalmente, como leite, ovos, amendoim e frutos do mar.

A maioria dos alérgenos são proteínas ambientais comuns que podem ser encontradas em diversos ambientes e fontes alimentares (HELM et al., 2002). Estudos revelam que o intestino entra em contato com aproximadamente 30 kg de proteínas alimentares por ano, absorvendo diariamente entre 130 e 190 gramas dessas proteínas (BRANDTZAEG, 1998). Diante dessa exposição, produtos da proteólise e proteínas inteiras que escapam do processo de digestão são envolvidos em diferentes mecanismos

que podem induzir a tolerância oral bem como desencadear respostas imunes alérgicas em indivíduos suscetíveis (CHEHADE e MAYER, 2005).

Em tese, qualquer alimento potencialmente pode levar a sintomas de alergia. Porém, apenas um pequeno grupo responde pela maior parte das reações: leite, ovo, soja, trigo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGOLOGIA E IMUNOLOGIA, 2023). Esses alimentos com capacidade de desencadear reações imunológicas contêm macromoléculas com propriedades semelhantes, que tendem a apresentar baixo peso molecular, elevado grau de glicosilação e alta solubilidade em fluidos corporais. Tais características parecem conferir aos antígenos uma maior resistência à desnaturação e à degradação no trato gastrointestinal de indivíduos suscetíveis, favorecendo sua absorção em forma intacta. No entanto, ainda não se compreende completamente por que certos alimentos possuem maior potencial alergênico do que outros (HELM et al., 2002).

Estudos indicam que fatores genéticos desempenham um papel fundamental na expressão das doenças alérgicas (HANSEN et al., 1993; BERGMANN et al., 1997; WAHN e VON MUTIUS, 2001), incluindo a produção de IgE, que é influenciada por diversos genes (LEUNG, 1998). Estima-se que mais de 120 genes estejam associados a doenças atópicas, sendo mais de 20 genes diretamente implicados no desenvolvimento dessas condições (LEUNG, 1998; CAMPBELL et al., 2015). Dentre os loci genéticos identificados, destaca-se a região do cromossomo 5q, que abriga genes codificadores de citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e o receptor de IL-4, elementos intimamente ligados à regulação da IgE e à diferenciação de mastócitos e eosinófilos (XU et al., 2000). Apesar dos avanços na identificação de genes candidatos por meio de estudos de associação genômica, nenhum gene de suscetibilidade isolado foi definido como determinante para doenças alérgicas como a asma e a alergia alimentar, o que sugere uma expressiva heterogeneidade genética. Além disso, fatores epigenéticos, como modificações em histonas e na metilação de DNA/RNA, podem influenciar a transcrição e a tradução de genes relacionados à suscetibilidade alérgica, indicando a relevância das interações entre o ambiente e o genoma na gênese dessas doenças (CAMPBELL et al., 2015).

O sistema imunológico imaturo de neonatos e lactentes jovens favorece a sensibilização ao alérgeno (EIGENMANN, 2009). Durante essa fase inicial da vida, a barreira intestinal ainda é imatura, apresentando maior susceptibilidade a permeabilidade

e, conseqüentemente, maior vulnerabilidade à infiltração de antígenos alimentares. A produção de IgA secretória (SIgA) é reduzida, o que facilita o trânsito de alérgenos pelo epitélio intestinal (GARSIDE et al., 2004). A importância funcional da SIgA é evidenciada em indivíduos com deficiência na produção dessa imunoglobulina, entre os quais se observa uma maior prevalência de alergias alimentares (MOWAT et al., 2004).

Fatores ambientais como a exposição microbiana precoce por meio do contato com animais, ambientes rurais ou surtos infecciosos também desempenham papel relevante na modulação da resposta imune. Componentes microbianos são capazes de estimular a expressão de receptores Toll-like (TLR) em células apresentadoras de antígenos, promovendo uma resposta imune do tipo alérgica (LOSS et al., 2012). Por outro lado, metabólitos produzidos pela microbiota intestinal, como o butirato, exercem efeito imunomodulador ao inibir a atividade da histona desacetilase (HDAC) e induzir a expressão do gene *FoxP3* em células T reguladoras, sugerindo um papel protetor da microbiota na prevenção da alergia alimentar (AITORO et al., 2017; TAO et al., 2007).

Do ponto de vista nutricional, diversos fatores ambientais vêm sendo estudados em relação ao desenvolvimento da alergia alimentar, entre eles a alimentação durante a gestação e no período de amamentação, o momento em que alimentos sólidos e potencialmente alergênicos são introduzidos na dieta da criança, bem como a exposição a aeroalérgenos, além disso, o uso excessivo de antibióticos, o aumento dos nascimentos por cesariana, exposição a alimentos processados, ultraprocessados e transgênicos, e baixos índices de aleitamento materno (CONSENSO BRASILEIRO SOBRE ALERGIA ALIMENTAR, 2007).

Atualmente, as orientações para a introdução de alimentos alergênicos na alimentação infantil indicam que a introdução precoce pode ajudar a prevenir alergias alimentares. Especialistas recomendam que os alimentos com potencial alergênico sejam introduzidos na dieta da criança entre 6 e 9 meses de idade, considerado o período da janela imunológica, durante o qual o sistema imunitário do bebê está mais preparado para tolerar novos alimentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2022).

1.8 O Fenômeno da Aversão Imunológica

Em 1994, Cara e colaboradores publicaram um estudo pioneiro demonstrando que animais previamente sensibilizados com ovalbumina (OVA) e com altos níveis séricos de

IgE específica evitavam consumir soluções contendo esse antígeno, mesmo quando adoçadas com sacarina tornando-as mais palatáveis. O protocolo experimental consistia em um teste de preferência, no qual os animais, sem qualquer condicionamento prévio, tinham acesso a duas mamadeiras por 24 horas: uma contendo apenas água e outra com uma solução adocicada de OVA. Apesar do sabor mais atrativo da solução com OVA, os animais sensibilizados evitavam seu consumo, comportamento descrito como "aversão antigênica". Evidências mais recentes reforçam a hipótese de que a alergia alimentar pode influenciar o comportamento e afetar funções cerebrais e que a aversão ao consumo do alérgeno para o qual o animal foi sensibilizado depende da produção de IgE (BASSO et al., 2003).

Florsheim et al. (2023) em um estudo recente do fenômeno também apresenta como o sistema imunológico pode induzir comportamentos de aversão específicos a alérgenos alimentares. Utilizando modelos murinos de alergia alimentar, os pesquisadores observaram que a sensibilização alérgica desencadeia um comportamento de aversão direcionado ao alérgeno, mediado por anticorpos IgE e mastócitos. Essa resposta comportamental ocorre antes do desenvolvimento de inflamação alérgica intestinal e envolve a ativação de áreas cerebrais associadas a estímulos aversivos. Além disso, a produção de leucotrienos e do fator de crescimento e diferenciação 15 (GDF15) é essencial para a manifestação desse comportamento. A comparação entre linhagens de camundongos revelou que o fundo genético influencia significativamente a intensidade da aversão sendo que camundongos BALB/c são mais suscetíveis à alergia alimentar e à aversão.

1.9 Modelo Experimental

Modelos animais são importantes ferramentas que auxiliam na resposta de algumas das questões envolvidas no desenvolvimento da alergia alimentar. Pesquisas em humanos são limitadas por questões éticas devido à chance de gerar nos indivíduos reações anafiláticas, até mesmo fatais (BOCK; MUNOZ-FURLONG; SAMPSON, 2001).

O desenvolvimento de um modelo experimental de alergia alimentar apresenta elevada complexidade, sendo influenciado por diversos fatores, tais como a linhagem dos camundongos utilizados, a dose e a natureza do antígeno, as vias de administração, bem

como o tipo de adjuvante empregado. A literatura científica descreve uma variedade de protocolos experimentais, cada um enfatizando diferentes aspectos desses elementos, de acordo com os objetivos específicos dos estudos (SANTOS, 2015).

O camundongo da linhagem BALB/c é um dos modelos consanguíneos mais amplamente empregados em pesquisas, com destaque para estudos nas áreas de imunologia e doenças infecciosas. Essa linhagem apresenta uma ativação facilitada das células T auxiliares do tipo 2 (Th2) em resposta à imunização, o que evidencia sua elevada reatividade alérgica. Além disso, quando expostos a um alérgeno alimentar com um adjuvante (como alumínio), os BALB/c produzem altos níveis de IgE específica, o que é um marcador típico de alergia. Por essas características, o modelo BALB/c é amplamente utilizado experimentalmente em estudos imunológicos.

Saldanha et al. (2004) desenvolveram um modelo crônico de alergia alimentar mediada por IgE em camundongos da linhagem BALB/c, sensibilizados com ovalbumina (OVA). A sensibilização foi realizada por via subcutânea, utilizando a proteína adsorvida em hidróxido de alumínio como adjuvante. Duas semanas após a primeira exposição, os animais receberam uma dose de reforço subcutânea e, uma semana depois, foram desafiados por via oral com solução de OVA administrada em mamadeira. Os resultados demonstraram que os camundongos sensibilizados apresentaram níveis elevados de IgE específica para OVA, em comparação ao grupo controle não sensibilizado, além de perda de peso, eosinofilia, aumento na produção de muco por células caliciformes e presença de mastócitos. Nesse estudo, os autores também confirmaram a ocorrência do fenômeno de aversão ao antígeno, previamente descrito por Cara et al. (1994)."

No presente estudo pretendemos utilizar o mesmo modelo de alergia alimentar à ovalbumina (OVA) para investigar o desenvolvimento dessa doença alérgica em camundongos NOD que desenvolvem espontaneamente o diabetes do tipo 1. Como esses camundongos apresentam um problema de imunorregulação que leva ao desencadeamento de doença autoimune em um órgão relacionado ao trato gastrointestinal (o pâncreas) e apresentam vários defeitos nos mecanismos de homeostase do intestino, pretendemos comparar a alergia alimentar desencadeada dentro desse cenário.

Justificativa

Inicialmente, nossa hipótese de trabalho era que haveria uma relação direta entre diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e alergia alimentar pela importância da tolerância oral e da integridade da mucosa intestinal no controle da resposta imunológica e pelas inúmeras alterações nesses mecanismos de homeostase intestinal encontradas nos camundongos NOD. A tolerância oral é um mecanismo fundamental pelo qual o sistema imunológico reconhece e se adapta a antígenos alimentares, evitando respostas inflamatórias excessivas e alergias. Em indivíduos com DM1, que é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas, há evidências de que a permeabilidade intestinal está alterada, o que compromete a função da mucosa intestinal. Essa disfunção pode levar à perda da tolerância oral, facilitando a sensibilização a proteínas alimentares e aumentando o risco de alergias alimentares. Portanto, entender essa inter-relação é essencial para desenvolver estratégias preventivas e terapêuticas que atuem na manutenção da integridade intestinal e na restauração da tolerância imunológica, contribuindo para o manejo simultâneo dessas condições.

2 Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Caracterização da alergia alimentar à ovoalbumina (OVA) em camundongos não obesos diabéticos (NOD).

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar indução de alergia a OVA em diferentes doses de antígeno.
2. Determinar a dose do alérgeno OVA capaz de induzir a produção de anticorpos IgE específicos em camundongos NOD.
3. Analisar resposta humoral e sinais clínicos da alergia à OVA em camundongos NOD, por meio da dosagem de imunoglobulinas, análise histológica do intestino e pâncreas, e protocolo de anafilaxia ativa.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c e NOD (non-obese diabetic), fêmeas, com quatro a seis semanas de idade, mantidas no biotério do Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob ciclo de luz de 12 horas, alimentados com ração padrão para camundongos e água ad libitum, até determinado momento do experimento.

Os camundongos da linhagem NOD foram mantidos em ambiente livre de patógenos específicos (SPF) (microisoladores, água e ração esterilizados e dispostos em estantes ventiladas com filtração de ar). Essa condição é essencial para a suscetibilidade à doença, como bem relatado pela literatura (Anderson & Bluestone, 2005).

3.2 Indução da Alergia Alimentar

O protocolo de indução da alergia alimentar foi desenvolvido baseado em Saldanha e colaboradores (2004). Os camundongos foram divididos em dois principais grupos, de acordo com suas linhagens, BALB/c e NOD, originando quatro subgrupos de cada linhagem, ou seja, um total de oito grupos, totalizando 40 animais. Nomeados respectivamente como grupo controle, baixa dose, dose padrão e alta dose.

Utilizou-se como antígeno Ovalbumina (OVA) cristalizada Grade III (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). No dia 0 os camundongos foram sensibilizados via intraperitoneal da seguinte forma: 0,2ml de Salina Tamponada com Fosfato (PBS 1X), 1mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) como adjuvante, 1ug de OVA para o grupo baixa dose, 10ug de OVA para o grupo dose padrão e 100ug de OVA para o grupo alta dose. Uma segunda imunização foi realizada 14 dias depois, repetindo as dosagens administradas anteriormente. E sete dias após, deu-se início ao desafio oral, que consiste na oferta exclusiva de solução contendo 30% de clara de ovo, fonte de OVA por um período de sete dias consecutivos. Neste período é realizada a pesagem dos animais, o registro de consumo da ração e da solução ofertada, além da aferição da glicemia. Ao final do desafio os animais foram eutanasiados.

3.6 Avaliação da Incidência de Diabetes Autoimune

Os níveis glicêmicos foram monitorados semanalmente através da coleta de uma mínima amostra do sangue periférico obtido da cauda para dosagem em fitas apropriadas para glicosímetro automático (Accu-Check Active – Roche). Sendo considerados diabéticos animais que apresentem duas medidas seguidas de glicose superiores a 250mg/dl.

3.7 Coleta do Soro

A coleta de sangue foi realizada manualmente por meio de uma pequena incisão na extremidade distal da cauda do animal, utilizando uma tesoura de ponta fina, promovendo a liberação de sangue capilar. O sangue foi coletado por gotejamento, mais especificamente, 10 gotas por animal, direto em tubo Eppendorf estéril com capacidade de 2ml, para posterior obtenção do soro. Após a coleta, os tubos contendo o sangue foram centrifugados a 1500 g por 10 minutos. O soro foi separado com pipeta e em seguida armazenado a -20°C até a realização das análises.

3.8 Protocolo de Anafilaxia Cutânea Ativa

Após os sete dias de desafio oral com os animais previamente imunizados, foi realizado o protocolo de anafilaxia ativa. Inicialmente, os camundongos foram anestesiados com 100 μL de uma solução contendo cloridrato de cetamina (1,7 mg/kg) e xilazina (0,33 mg/kg). Após confirmação do efeito anestésico, administrou-se 200 μL de uma solução de Evans Blue a 1% (p/v em PBS estéril) por via retro-orbital, seguido de uma injeção intradérmica no dorso dos animais contendo 200 μg de ovalbumina (OVA) em PBS (volume total de 200 μL). Após 30 minutos, os animais foram eutanasiados, e procedeu-se à coleta das orelhas e do couro dorsal para análise da permeabilidade vascular.

3.9 Obtenção das Amostras

Após a eutanásia, foram coletados o pâncreas, uma porção do jejuno e o baço. Os tecidos foram fixados em cassetes histológicos, inicialmente armazenados em formalina

tamponada a 10% e, posteriormente, transferidos para solução de álcool 70%, onde permanecem até o momento do processamento histológico dos tecidos e confecção das lâminas.

3.10 Método Swiss-rolling

O método swiss-rolling é a preparação da porção intestinal retirada para o processamento histológico e posterior confecção das lâminas. Após a eutanásia dos animais o intestino foi retirado, cuidadosamente desembaraçado, separando o intestino grosso do delgado. Em seguida, o intestino delgado foi esticado, onde é possível visualizar as três porções intestinais, e separado apenas o jejuno. Foi removido o tecido adiposo em torno do jejuno e em seguida o mesmo foi aberto em corte longitudinal para delicada remoção das fezes. Posteriormente uma extremidade foi rolada até a outra, formando uma espiral.

3.11 Processamento Histológico e Digitalização das Lâminas

O material das amostras do jejuno e pâncreas foi desidratado em soluções crescentes de álcoois, clarificado em xilol e incluído em parafina. Foram obtidos cortes finos de 3 a 5 μm para posterior montagem em lâminas. A coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) foi utilizada para diferenciar estruturas celulares e teciduais.

Foi feita a digitalização das lâminas através do scanner de lâminas histológicas 3D HISTECH, um microscópio digital de alta resolução. As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando o software CaseViewer.

3.12 Altura das Vilosidades

Apenas vilosidades com conjuntivo visível e epitélio definido, foram medidas. Foram selecionadas 5 vilosidades por secção histológica em 5 secções diferentes, 25 vilosidades por animal, utilizando-se imagens capturadas com a objetiva de 10X utilizando o software CaseViewer.

3.13 Contagem de Linfócitos Intraepiteliais (IEL)

Foram capturadas imagens de lâminas histológicas coradas com H&E no aumento de 20X no software CaseViewer. Os IEL foram identificados pela sua localização característica basal em relação aos núcleos dos enterócitos e por apresentarem pequeno halo claro de citoplasma ao redor de seu denso núcleo esférico e regular. Para cada animal, foram contados 500 enterócitos, segundo a descrição de Ferguson e Murray (1971). O número final de IEL foi expresso em relação a 100 células epiteliais.

3.14 Contagem de Células Caliciformes

O epitélio intestinal foi examinado em lâminas histológicas coradas com PAS em aumento de 10X no software CaseViewer. As células caliciformes foram identificadas pela sua coloração em tom de rosa escuro. Foi considerado 1 cm de superfície do vilão em cada animal. As células caliciformes foram quantificadas neste intervalo. O resultado foi expresso em quantidade média de células caliciformes por centímetro de superfície do vilão.

3.15 Contagem de Eosinófilos

A contagem dos eosinófilos infiltrados na mucosa do jejuno proximal foi realizada através da coloração dos cortes histológicos por Hematoxilina – Eosina (HE). O número de eosinófilos infiltrados foi contado em aumento 40X, no software CaseViewer, em 10 campos aleatórios. O resultado foi expresso como a média dos eosinófilos do grupo.

3.16 Avaliação das Ilhotas Pancreáticas

Todas as ilhotas de cada animal foram contadas e avaliadas quanto à progressão da insulite. Foi atribuído um número de 0 a 3 para classificar o score quanto a insulite, sendo 0 para ilhotas sem insulite, 1 para ilhotas com peri-insulite, 2 para ilhotas com <50% de acometimento e 3 para ilhotas com acometimento >50%. A avaliação foi feita de acordo com a frequência de ilhotas com diferentes estágios de acometimento em cada animal.

3.17 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de IgE Total

Placas de poliestireno Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IgE diluído em 10 mL de Coating Buffer (pH 9,6), pipetando 100 µL da solução por poço e incubando overnight em câmara úmida. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com solução de PBS-Tween diluída em água. Em seguida, adicionou-se 200 µL de PBS contendo BSA a 1%, permanecendo em temperatura ambiente por 1 hora para bloqueio. Posteriormente, a placa foi novamente lavada três vezes com a mesma solução de lavagem. As amostras foram homogeneizadas, aplicando-se 50 µL de cada nos poços, e incubando à temperatura ambiente por 2 horas. Após a incubação, a placa foi lavada e adicionou-se 100 µL de solução contendo anticorpo anti-IgE biotilado diluído em PBS-BSA, permanecendo por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e adicionou-se 100 µL de solução contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (estreptavidina-HRP), preparada na proporção de 1 mL de estreptavidina para 5 mL de PBS-BSA, deixando incubar por 45 minutos. Após nova lavagem, adicionou-se 100 µL da solução reveladora composta por 5 mg de ABTS diluídos em 10 mL de tampão citrato, acrescida de 10 µL de H₂O₂, incubando a 37 °C até desenvolvimento da coloração. A reação foi interrompida com 20 µL de SDS por poço e realizada a leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader) a 492 nm.

3.18 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de IgE anti-OVA

Placas de poliestireno Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher) foram sensibilizadas com 40ul de OVA diluídos em 10ml de Coating Buffer, pipetando 100ul da solução por poço, deixado over night em câmara úmida. Para bloquear a placa a mesma foi lavada três vezes com solução de PBS Tween diluída em água. Em seguida, foi colocado 200ul de PBS BSA 1%, deixando em temperatura ambiente por 1 hora. Para realizar o plaqueamento a placa foi novamente lavada três vezes, na mesma solução de lavagem. As amostras passaram pelo vortex, para homogeneização, e foram colocados 50ul de cada amostra nos poços da placa, deixando em temperatura ambiente por 2 horas. Após o período de 2 horas, a placa foi novamente lavada, e adicionado 100ul de solução contendo 3ml de PBS BSA e 6ul de IgE Biotina, aguardando 1 hora. Posteriormente, a placa foi lavada na

mesma solução de lavagem, e adicionado 100ul de solução contendo 1ml de Estreptavidina para 5ml de PBS BSA, deixando por 45 minutos. Em seguida, lavada novamente, e adicionada solução para revelar, contendo 5mg de ABTS, 10ml de tampão citrato e 10ul de H₂O₂, pipetados 100ul e colocado em estufa a 37°, aguardar. Revelação pausada com 20ul de SDS e lida em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), em comprimento de onda de 492 nm.

3.19 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de IgG1 Total

Placas de poliestireno Nunc MaxiSorp (Thermo Fisher) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IgG1, diluído em 10 mL de Coating Buffer (pH 9,6), pipetando 100 µL da solução por poço e incubando overnight em câmara úmida. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com solução de PBS-Tween diluída em água. Em seguida, adicionou-se 200 µL de PBS contendo BSA a 1%, permanecendo em temperatura ambiente por 1 hora para bloqueio. Posteriormente, a placa foi novamente lavada três vezes com a mesma solução de lavagem. As amostras e padrões (IgG1 recombinante) foram preparadas e homogeneizadas, aplicando-se 50 µL de cada amostra ou padrão nos poços, e incubando à temperatura ambiente por 2 horas. Após a incubação, a placa foi lavada e adicionou-se 100 µL de solução contendo anticorpo anti-IgG1 biotilado diluído em PBS-BSA, permanecendo por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e adicionou-se 100 µL de solução contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (estreptavidina-HRP), preparada na proporção de 1 mL de estreptavidina para 5 mL de PBS-BSA, deixando incubar por 45 minutos. Após nova lavagem, adicionou-se 100 µL da solução reveladora composta por 5 mg de ABTS diluídos em 10 mL de tampão citrato, acrescida de 10 µL de H₂O₂, incubando a 37 °C até desenvolvimento da coloração. A reação foi interrompida com 20 µL de SDS por poço e realizada a leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader) a 492 nm.

3.20 Análises Estatísticas

A significância estatística dos dados obtidos para os grupos foi analisada por meio da utilização do teste de variância ANOVA, com utilização do pós-teste de Tukey, a fim

de comparar os grupos experimentais. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPad Prism versão 8.0.

4 Resultados

4.1 Camundongos NOD apresentaram aumento dos títulos de IgE somente quando sensibilizados com uma dose alta de antígeno

Foram utilizadas 3 diferentes doses do antígeno OVA. Como descrito na literatura (SALDANHA et al., 2004), camundongos da linhagem BALB/c apresentaram maior concentração de IgE específica quando submetidos à sensibilização com a dose de 10 ug adsorvida em Al(OH)₃. No entanto, para nossa surpresa, camundongos NOD apresentaram aumento significativo dos títulos de IgE apenas quando estes foram submetidos à imunização com alta dose de OVA (100 ug) (Figura 5).

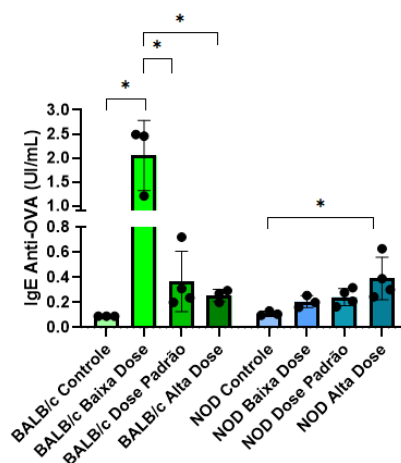


Figura 5- Níveis de IgE específica no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA por via oral. Camundongos foram sensibilizados via intraperitoneal com 0,2ml de Salina Tamponada com Fosfato (PBS 1X), 1mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) como adjuvante, 1ug de OVA para o grupo baixa dose, 10ug de OVA para o grupo dose padrão e 100ug de OVA para o grupo alta dose, e desafiados 7 dias depois com solução contendo 30% de OVA como única fonte de líquido. Os níveis de IgE anti-OVA no soro dos animais foram medidos por ELISA. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m.). (n = 5animais/grupo) da absorvância obtida em soro e expressa em unidades arbitrárias. (*) representa diferença estatisticamente significativa: BALB/c Baixa Dose em comparação ao Controle ($p < 0,001$), ao Dose Padrão ($p < 0,01$) e ao Alta Dose ($p < 0,01$). NOD, apenas a comparação entre Controle e Alta Dose apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

O aumento da concentração de IgE total foi observado apenas nos camundongos NOD sensibilizados com alta dose de OVA. Níveis de IgE total acompanham, em parte, o aumento dos níveis de IgE específica anti-OVA para a dose alta de antígeno (Figura 6).

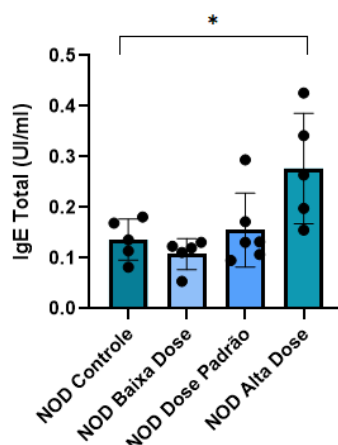


Figura 6 - Níveis de IgE total no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA por via oral. Camundongos foram sensibilizados via intraperitoneal com 0,2ml de Salina Tamponada com Fosfato (PBS 1X), 1mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) como adjuvante, 1ug de OVA para o grupo baixa dose, 10ug de OVA para o grupo dose padrão e 100ug de OVA para o grupo alta dose, e desafiados 7 dias depois com solução contendo 30% de OVA como única fonte de líquido. Os níveis de IgE Total no soro dos animais foram medidos por ELISA. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n = 5animais/grupo) da absorvância obtida em soro e expressa em unidades arbitrárias. (*) representa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A dosagem de IgG1 total nos diferentes grupos experimentais revelou um aumento significativo nos níveis dessa imunoglobulina nos grupos imunizados com baixa dose, dose padrão e alta dose de OVA. Esse resultado indica que a sensibilização com OVA adsorvido em Al(OH)₃ foi eficaz em induzir uma resposta humoral do tipo Th2, caracterizada pela produção de IgG1, independentemente da quantidade de antígeno administrada. Apesar da clara elevação de IgG1 total em todos os grupos sensibilizados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes dosagens (Figura 7).

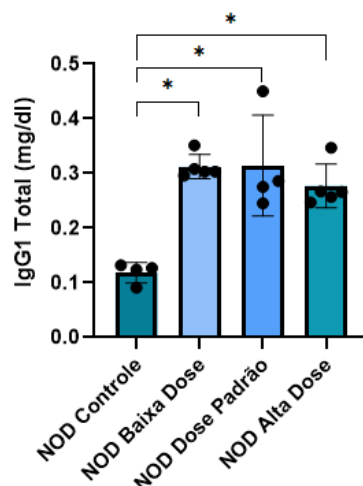


Figura 7 - Níveis de IgG1 total no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA por via oral. Camundongos foram sensibilizados via intraperitoneal com 0,2ml de Salina Tamponada com Fosfato (PBS 1X), 1mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) como adjuvante, 1ug de OVA para o grupo baixa dose, 10ug de OVA para o grupo dose padrão e 100ug de OVA para o grupo alta dose, e desafiados 7 dias depois com solução contendo 30% de OVA como única fonte de líquido. Os níveis de IgG1 Total no soro dos animais foram medidos por ELISA. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n = 5animais/grupo) da absorvância obtida em soro e expressa em unidades arbitrárias. (*) representa diferença estatisticamente significativa: NOD baixa dose vs. NOD controle (p < 0,001); NOD dose padrão vs. NOD controle (p < 0,001); NOD alta dose vs. NOD controle (p < 0,01).

4.2 Avaliação clínica na indução de alergia por OVA em camundongos NOD

Um dos parâmetros clínicos alterado durante o desenvolvimento da alergia alimentar em modelos animais é o peso (SALDANHA et al, 2004). O peso dos animais foi avaliado diariamente durante o desafio oral. Camundongos BALB/c do grupo controle apresentaram variação próxima de zero, sem perda significativa de peso. O grupo baixa dose e dose padrão apresentaram perda de peso acentuada de aproximadamente 5 gramas. Já o grupo alta dose demonstrou perda de peso menor, aproximadamente 2 gramas, resultado que tem correlação direta com os níveis de IgE induzidos pelas respectivas doses de OVA (Figura 8).

Em camundongos NOD, o grupo tratado com alta dose de OVA apresentou perda de peso quando comparado ao grupo controle. Ou seja, os camundongos NOD são mais resistentes a perda de peso durante o desafio oral, com efeito apenas na dose mais alta.

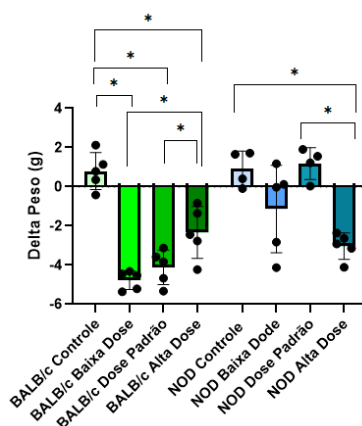


Figura 8 - Peso corporal dos camundongos ao longo do experimento. Camundongos BALB/c e NOD sensibilizados (OVA) foram desafiados com uma solução contendo OVA a 30% durante 7 dias e foram pesados diariamente durante o desafio oral. Os resultados foram expressos em gramas, com n de 5 animais por grupo.

4.3 Avaliação do consumo de dieta durante o desafio oral

O consumo médio de ração do grupo controle BALB/c foi em torno de 11 a 13 gramas, sem diferença significativa em comparação as dosagens (baixa, padrão e alta), que consumiram de modo geral entre 9 a 12 gramas. O mesmo foi observado com o grupo controle NOD, que consumiu em torno de 13 a 15 gramas, sem diferença significativa com relação as dosagens (baixa, padrão e alta), que consumiram entre 15 a 28 gramas.

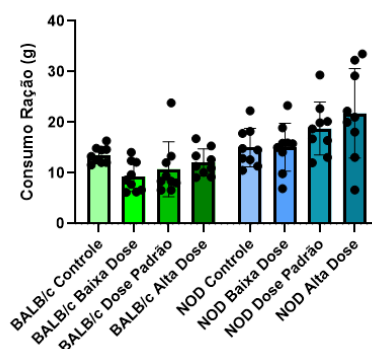


Figura 9 – Consumo de ração em gramas dos camundongos ao longo do experimento. Medimos o consumo de ração comercial ingerida por grupo de

camundongos BLAB/c e NOD sensibilizados e controle, diariamente, durante 7 dias. Os resultados foram expressos através da média + e.p.m da quantidade, em gramas, de ração.

4.4 Camundongos NOD desafiados com baixa dose consumiram menor volume de OVA durante o desafio oral.

O fenômeno da aversão ocorre quando os animais evitam consumir soluções ou dietas contendo o antígeno para o qual são alérgicos (CARA et al, 1994). Como este é um fenômeno descrito para a alergia alimentar à OVA, avaliamos também se os animais do nosso modelo apresentavam aversão, medindo diariamente o consumo da solução contendo OVA a 30% fornecida em mamadeiras que continham 45 ml ofertadas de forma exclusiva e voluntária.

Após 7 dias de desafio oral, os camundongos BALB/c sensibilizados apresentaram reduzido consumo da solução contendo antígeno, quando comparados com o grupo controle. Já a na linhagem NOD, apenas o grupo sensibilizado com baixa dose do antígeno OVA apresentou redução significativa quando comparado ao controle e as demais dosagens (dose padrão, alta dose) (Figura 10).

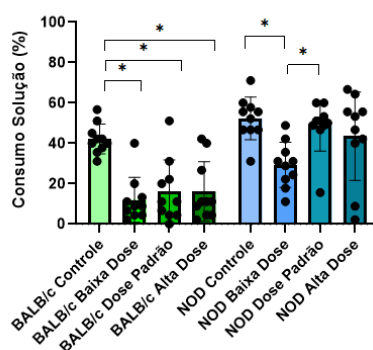


Figura 10 – Porcentagem do consumo da solução contendo OVA ao longo do experimento. Camundongos BALB/c e NOD sensibilizados (OVA) e controle, foram desafiados oralmente com uma solução contendo ovoalbumina a 30% durante 7 dias. Diariamente a quantidade de líquido consumida por grupo foi aferida. Os resultados foram expressos em porcentagem de consumo (ml) por grupo. (*) representa diferença estatisticamente significativa: BALB/c controle vs baixa dose ($p < 0,0001$); controle vs dose padrão ($p < 0,0003$); controle vs alta dose ($p < 0,0003$). NOD controle vs baixa dose ($p < 0,01$); baixa dose vs dose padrão ($p < 0,05$).

4.5 Camundongos NOD tratados com 100mg de OVA desenvolvem reação de anafilaxia cutânea.

O teste de anafilaxia cutânea ativa (PCA) utiliza a alteração da permeabilidade vascular associada à liberação de compostos vasoativos pelos mastócitos após a sua degranulação pela ligação a IgE e alérgeno. Com este teste, medimos a reação anafilática para avaliar a capacidade dos anticorpos IgE produzidos em camundongos NOD de se ligarem e induzirem a degranulação de mastócitos. Os animais sensibilizados com alta dose apresentaram significativo extravasamento plasmático e aumento da permeabilidade vascular em comparação com o grupo controle e demais dosagens (baixa e padrão), típicos de uma resposta anafilática mediada por IgE e mastócitos (Figura 11).

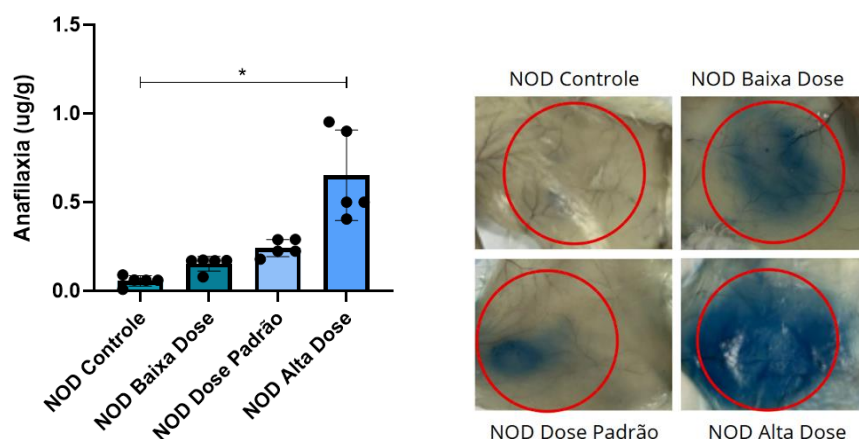


Figura 11- Ensaio de anafilaxia cutânea ativa em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os animais receberam uma injeção via intradérmica no dorso contendo OVA (20 µg) e PBS, seguido por uma injeção intravenosa na cauda do corante Azul de Evans (1mg/ml). Após 30min, os camundongos foram sacrificados e a pele foi removida para visualização da reação. N= 5 animais/ grupo.

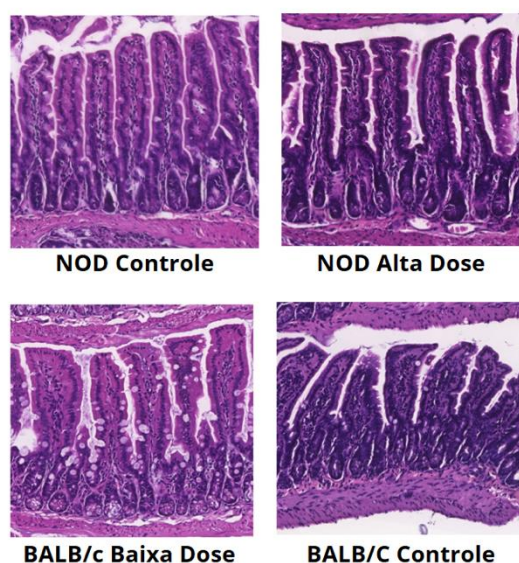
4.6 Histologia do intestino em animais NOD tratados com OVA

Dada a importância dos componentes da mucosa intestinal para o estabelecimento da tolerância oral e da alergia alimentar, avaliamos o intestino delgado, na porção jejunal, de camundongos BALB/c e NOD, grupos controle e alérgico, em busca de possíveis alterações morfológicas.

Existe uma relação entre o tamanho dos vilos nos animais e os danos teciduais secundários à inflamação. Dessa forma, verificamos se essa medida estava alterada nos

grupos que apresentaram maior tendência ao desenvolvimento de alergia. Os vilos intestinais foram medidos por meio do software ImageJ e a média do tamanho de vinte e cinco vilos por animal foi determinada em μm . Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos BALB/c Controle e BALB/c Baixa Dose ($p = 0,452$), nem entre os grupos NOD Controle e NOD Alta Dose ($p = 0,108$), conforme determinado pelo teste t de Student não pareado (Figura 12).

A.



B.

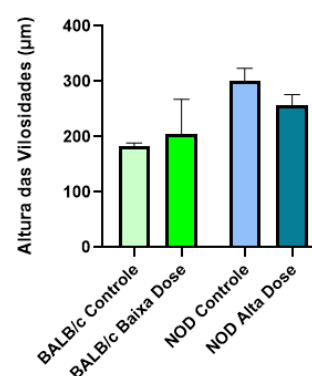


Figura 12 - Avaliação histopatológica e morfométrica das vilosidades intestinais de camundongos BALB/c e NOD sensibilizados e desafiados com OVA. (A) Fotos representativas de cortes histológicos do intestino de camundongos BALB/c e NOD com 8 a 10 semanas. Coloração H&E, aumento de 10x ($n = 4$ animais por grupo). (B) Análise morfométrica do vilos de camundongos BALB/c e NOD de 8 a 10 semanas. Foram selecionadas 5 vilosidades por secção histológica em 5 secções diferentes, sendo no total 25 vilosidades por animal, resultados expressos pela média ($n=4$). As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo (test t).

Também avaliamos a frequência de linfócitos intraepiteliais (IELs), importantes componentes do GALT, responsáveis por regular a homeostase por meio da manutenção da função da barreira epitelial intestinal. Esses linfócitos, geralmente aumentados durante processos de infecção e inflamação, atuam na modulação das respostas imune inata e adaptativa (SHERIDAN & LEFRANÇOIS, 2010). Observamos, um aumento na

frequência desses linfócitos entre os enterócitos do intestino delgado de camundongos diabéticos NOD e BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA (Figura 13).

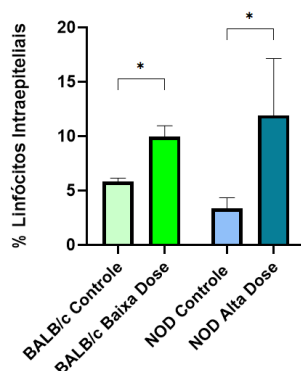


Figura 13 - Frequência de linfócitos intraepiteliais no intestino delgado de camundongos NOD e BALB/c. Frequência de linfócitos intraepiteliais (IEL) entre enterócitos contados no intestino delgado de camundongos BALB/c e NOD submetidos a diferentes dosagens (Controle, Baixa Dose e Alta Dose). A contagem foi realizada em cada amostra considerando um intervalo de 500 enterócitos. Contagem feita no aumento de 20x, coloração HE. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos comparados.

Outro parâmetro analisado foi a frequência de células caliciformes no intestino delgado de camundongos NOD e BALB/c, na qual não foi possível constatar diferença entre os grupos (Figura 14).

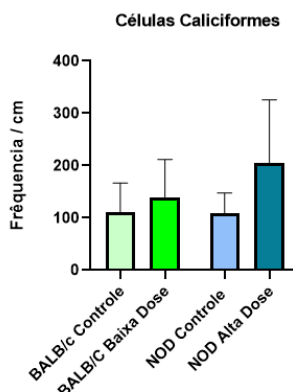


Figura 14 - Frequência de células caliciformes no intestino delgado de camundongos NOD e BALB/c. Frequência de células caliciformes a cada centímetro de superfície do vilão no intestino delgado de camundongos BALB/c e NOD submetidos a diferentes

dosagens (Controle, Baixa Dose e Alta Dose). A contagem foi realizada manualmente em cortes histológicos corados com PAS, no aumento de 20x. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo.

A presença do infiltrado eosinofílico é considerada um dos achados mais característicos da alergia alimentar (SAMPSON et al, 2005). Sendo assim, realizamos uma contagem de eosinófilos na mucosa do intestino delgado em campos aleatórios das lâminas histológicas coradas por HE no aumento de 40x, sendo possível identificar diferença significativa do grupo alta dose (Figura 15).

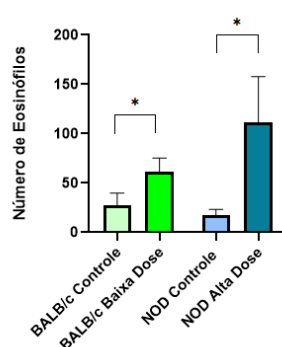


Figura 15 - Número de eosinófilos infiltrados na mucosa do intestino delgado. Número de eosinófilos presentes na lâmina própria do intestino delgado de camundongos BALB/c e NOD submetidos a diferentes dosagens (Controle, Baixa Dose e Alta Dose). A contagem foi realizada manualmente em cortes histológicos corados com HE, no aumento de 40x. As barras representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos para cada camundongo do grupo. O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos comparados.

4.7 O tratamento com OVA aumenta a frequência de insulite em animais NOD

Camundongos NOD desenvolvem diabetes espontaneamente a partir de 12 a 14 semanas de idade em fêmeas podendo surgir também em idades mais avançadas. Estudos histológicos mostram que é possível observar o início do infiltrado inflamatório em camundongos com três a quatro semanas de idade (ANDERSON & BLUESTONE, 2005). Essa reação inicial é chamada de peri-insulite que consiste na presença de poucas células inflamatórias circundando a ilhota β pancreática. O infiltrado pode progredir e invadir as ilhotas nas semanas que se seguem tornando-se uma insulite invasiva. Dessa forma, na décima semana de vida, grande parte dos camundongos NOD apresentam alta

porcentagem de ilhotas β com grave insulite. A partir de então, ocorre a destruição das células β e a queda da produção da insulina que pode ser constatada por altos níveis de glicose no sangue.

A análise histológica das ilhotas pancreáticas dos camundongos NOD e BALB/c com aproximadamente 8 a 10 semanas de idade revelou diferenças significativas no padrão de infiltrado inflamatório entre os grupos experimentais. O grupo BALB/c controle apresentou predominantemente ilhotas sem insulite (>85%), com apenas uma pequena proporção exibindo peri-insulite ou insulite leve. Em contrapartida, os camundongos NOD controle exibiram maior comprometimento, com aproximadamente 50% das ilhotas livres de infiltrado, enquanto as demais apresentaram peri-insulite ou insulite leve. Nos grupos sensibilizados com OVA, observou-se piora progressiva do quadro inflamatório, especialmente no grupo NOD Alta Dose, que apresentou aumento expressivo da insulite grave e redução acentuada das ilhotas íntegras. Esses achados indicam que a imunização com OVA, principalmente em altas concentrações, intensifica a agressão autoimune pancreática, potencializando a destruição insular típica do diabetes tipo 1 no modelo NOD.

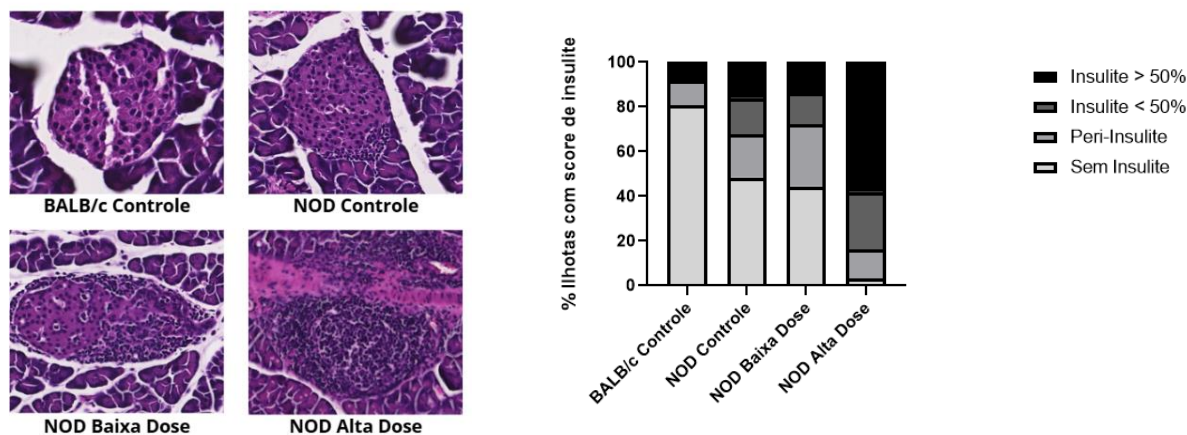


Figura 16 - Percentual de ilhotas pancreáticas com diferentes graus de insulite nos grupos experimentais. Distribuição percentual das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongos BALB/c e NOD sensibilizados com diferentes doses de OVA. Os escores foram classificados em: Sem insulite, Peri-insulite, Insulite <50% e Insulite >50%. Observa-se que o grupo BALB/c controle apresenta maior preservação das ilhotas, enquanto os grupos NOD, em especial NOD alta dose, exibem aumento acentuado do infiltrado inflamatório, caracterizado pela elevação das categorias de insulite parcial e extensa.

4.8 Camundongos NOD alérgicos não apresentaram diferenças na glicemia após o tratamento

A glicemia foi avaliada em todos os grupos durante o desafio oral, ou seja, em camundongos de 8 a 10 semanas de idade. Não houve diferença significativa entre os grupos, apenas um animal com glicemia mais alta (outlier) no grupo dos camundongos sensibilizados com alta dose de OVA.

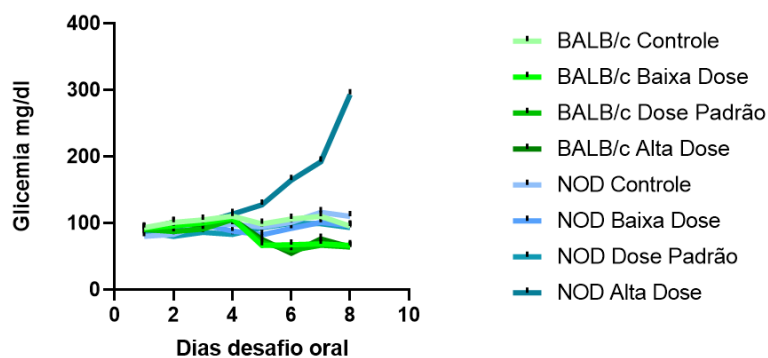


Figura 17 - Valores de glicemia (mg/dl) de camundongos BALB/c e NOD. As medidas foram realizadas a partir de amostras de sangue obtidas por punção da veia caudal, utilizando glicosímetro digital, durante o protocolo experimental, com animais de 8 a 10 semanas. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m.

5 Discussão

No presente estudo, observamos que, em modelo espontâneo de diabetes mellitus tipo 1 (NOD), a dose do alérgeno ovalbumina (OVA) necessária para induzir a produção de IgE específica e consequente alergia alimentar, precisa ser mais alta que aquela utilizada em camundongos de uma linhagem controle (BALB/c). Os camundongos NOD e BALB/c imunizados e desafiados com o antígeno OVA apresentaram sinais clínicos de alergia, como perda de peso, além de degranulação de mastócitos caracterizando uma reação anafilática cutânea com aumento de permeabilidade vascular e extravasamento de plasma. Também houve aumento na frequência de linfócitos intraepiteliais e eosinófilos infiltrados na mucosa. Além disto, a histologia do pâncreas dos camundongos NOD mostrou que a imunização com OVA, principalmente em altas concentrações, intensificou a agressão autoimune pancreática, potencializando a destruição insular típica do diabetes tipo 1.

Os camundongos NOD desenvolvem diabetes espontaneamente de maneira muito similar àquela observada em humanos, de forma que a cinética de eventos que levam a inflamação das células β pancreáticas e a presença de autoanticorpos no modelo se assemelha às características da diabetes em humanos (PEARSON et al., 2015).

Em sua tese de doutorado, Mariana Camila Gonçalves Miranda mostrou várias alterações na mucosa do intestino que precedem o surgimento da insulite e da diabetes tipo 1. Camundongos NOD apresentaram, desde 4 semanas de idade, diminuição do número de células caliciformes, diminuição da produção de muco e níveis mais baixos de IgA secretora total ligada a bactérias assim como um perfil alterado de linfócitos intraepiteliais. Esses animais mostraram disbiose da microbiota intestinal e translocação microbiana além de um desbalanço inflamatório com aumento de IL-17 e redução de IL-10 na mucosa intestinal, aumento da frequência de células Th17 efectoras e células linfoides inatas tipo 3 (ILC3), bem como uma diminuição de células Th2, ILC2 e células T reguladoras (Treg) no intestino delgado. Esse conjunto de alterações na mucosa desses camundongos NOD, que contribuem para a formação, nesses animais, de um ambiente intestinal desfavorável ao estabelecimento de tolerância oral. De fato, esses animais não desenvolvem tolerância oral quando tratados com OVA por via oral mesmo por um protocolo ótimo de administração como a ingestão contínua do antígeno (Miranda, 2019; Miranda et al, 2019).

A tolerância oral pode ser entendida como um mecanismo fisiológico de reatividade imunorreguladora aos antígenos presentes na dieta e da microbiota,

desencadeado reações na mucosa intestinal, mas com repercussões sistêmicas já que ela envolve o controle da resposta celular e humoral em outros sítios do corpo especificas ao antígeno em questão (WEINER et al., 2011).

Baseado nessas evidências e sabendo que a quebra da tolerância oral pode resultar em desenvolvimento de reações inflamatórias no intestino, como as alergias alimentares, nossa hipótese era de que os animais NOD desenvolvessem uma alergia mais severa que os camundongos BALB/c.

Em modelos experimentais de alergia, a baixa dose de antígeno promove ativação de células T auxiliares do perfil Th2 e Tfh2 com aumento na produção de IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulam a troca de linfócitos B para produção de IgE (via IL-4/IL-13 + CD40L). O estudo clássico de Vaz (1971), intitulado "Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin" demonstra que a administração repetida de doses muito baixas de ovalbumina em camundongos é suficiente para induzir uma resposta persistente de IgE, mesmo na ausência de sinais inflamatórios típicos. Essa sensibilização silenciosa sugere que a tolerância imunológica às proteínas alimentares pode ser facilmente rompida sob determinadas condições, como baixa dose e via de exposição, levando à formação de anticorpos que estão diretamente envolvidos nas reações alérgicas.

Por outro lado, a exposição a altas doses de antígeno tende a induzir mecanismos de tolerância imunológica com a expansão de células T reguladoras pois o organismo interpreta como algo "fisiológico" (semelhante a exposição alimentar contínua) e gera supressão da resposta Th2, reduzindo produção de IgE e desviando a resposta para isotipos como IgG1 (em camundongos) ou IgG4 (em humanos), associados à tolerância, que competem com IgE pela ligação ao antígeno, reduzindo a reação alérgica (PABST; MOWAT, 2012). Em resumo, a baixa dose de antígeno estimula o sistema imune para a resposta alérgica (IgE via Th2), enquanto a alta dose promove tolerância ou desvio da resposta reduzindo IgE.

Curiosamente, os camundongos NOD testados no nosso modelo de alergia alimentar apresentaram sensibilidade a antígenos da dieta oposta aos camundongos BALB/c normalmente utilizados nos estudos de alergia. Os camundongos BALB/c, reconhecidos por essa tendência em apresentar um perfil responsivo Th2, apresentaram níveis elevados de IgE específica para OVA quando sensibilizados com baixa dose de OVA. Nos camundongos NOD, observamos que, para induzir níveis elevados de IgE

específica, é necessária uma alta dose de antígeno, contrariando a expectativa de indução de alergia com baixas doses antigênicas.

Portanto, o aumento significativo da produção de IgE específica no grupo alta dose em camundongos NOD sugere um fenômeno imunológico não convencional, possivelmente relacionado a uma disfunção regulatória já característica dos camundongos NOD, animais com suscetibilidade genética ao desenvolvimento de uma doença autoimune. Essa observação pode apontar para novas particularidades na regulação da resposta alérgica em contextos de predisposição autoimune, tornando a linhagem NOD um modelo interessante para estudar interações entre alergia e autoimunidade.

Para a avaliação do desenvolvimento da alergia alimentar nas duas linhagens de camundongos testados neste estudo (NOD e BALB/c) utilizamos parâmetros já classicamente descritos como componentes do quadro da doença. Trabalhos anteriores relatam que camundongos submetidos à indução de alergia alimentar apresentam uma significativa perda de peso corporal após a ingestão contínua e restrita do antígeno em solução (SALDANHA et al., 2004). Batista e colaboradores (2014) demonstraram que a ingestão prolongada do antígeno utilizado para a sensibilização alérgica na dieta por quatorze dias consecutivos é capaz de levar à diminuição da IgE específica para o antígeno (OVA) aos níveis de um animal sensibilizado e não desafiado. Essa redução dos níveis séricos de IgE promovida pela ingestão prolongada do alérgeno também promove a recuperação parcial do peso desses animais.

Em nosso trabalho, seguindo o protocolo de sete dias, a perda de peso foi evidente nos animais sensibilizados e desafiados oralmente com OVA, sendo mais pronunciada no grupo baixa dose da linhagem BALB/c e no grupo alta dose da linhagem NOD. Esse achado reforça descrições de que a ingestão contínua do alérgeno induz repercussões metabólicas relevantes, alinhando-se a observações de Saldanha et al. (2004). Entretanto, existe o contraste entre as dosagens nas linhagens testadas, possivelmente em função da autoimunidade de base característica da linhagem NOD.

Além disso, o consumo de dieta foi equivalente entre todos os grupos sensibilizados e seus respectivos controles, indicando que a perda de peso observada não se deve à diminuição da ingestão alimentar, mas sim a efeitos metabólicos da resposta inflamatória induzida pelo antígeno. Esse achado reforça que a perda ponderal decorre de alterações catabólicas relacionadas à ativação imunológica, provavelmente mediadas por citocinas inflamatórias, como já descrito em modelos de alergia e autoimunidade. No

contexto do modelo NOD, tal evidência sugere que a perda de peso é um marcador da interação entre inflamação alérgica e progressão do diabetes tipo 1, independente do aporte calórico.

O teste da anafilaxia cutânea ativa mede os efeitos da produção de IgE na degranulação de mastócitos e na ação dos mediadores vasoativos produzidos por estas células na permeabilidade vascular reforçando a ideia de que a sensibilização com OVA, em diferentes dosagens, é capaz de modular a intensidade da resposta alérgica sistêmica. Observou-se que os camundongos NOD sensibilizados com alta dose apresentaram uma reação de anafilaxia cutânea com extravasamento plasmático significativo em relação ao grupo controle e às demais dosagens (baixa e padrão), o que foi confirmado tanto quantitativamente pela medida de absorvância quanto qualitativamente pela coloração azulada mais intensa no tecido. Esse achado sugere que, embora os camundongos NOD sejam animais com defeitos nos mecanismos de homeostase intestinal e classicamente predispostos ao desenvolvimento espontâneo do DM1, a magnitude da resposta alérgica sistêmica é modulada pela dose de sensibilização.

De forma análoga à tolerância central, a tolerância oral atua na regulação da reatividade imunológica contra antígenos externos introduzidos pela via oral. Esse fenômeno envolve a conversão de células T CD4+ naïve em células T reguladoras Foxp3+ no intestino, o que possibilita um controle ativo da inflamação frente a proteínas da dieta e componentes da microbiota. Assim, a tolerância oral funciona como um importante mecanismo de proteção contra respostas exacerbadas a antígenos inócuos (WEINER et al., 2011).

A relevância desse processo é evidente quando se considera a função do trato gastrointestinal, que representa a maior superfície de contato com o meio externo. A contínua exposição a antígenos alimentares e microbianos requer um controle imunológico altamente regulado, mediado por uma coleção de mecanismos de imunorregulação na mucosa intestinal incluindo células dendríticas tolerogênicas, Tregs e citocinas anti-inflamatórias (MOOG, 1981; WEINER et al., 2011). Quando esses mecanismos falham, ocorre ruptura da homeostase, favorecendo o desenvolvimento de inflamações intestinais ou até mesmo doenças sistêmicas autoimunes.

Evidências de falhas na indução da tolerância oral em algumas doenças do trato gastrointestinal já foram descritas em modelos animais e em humanos. Duchmann et al.

(1995) demonstraram que pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) apresentam reatividade exacerbada não apenas contra componentes microbianos, mas também contra proteínas dietéticas. De forma semelhante, estudos mostram que camundongos NOD exibem reatividade contra antígenos da microbiota, sugerindo que o defeito intrínseco na indução de tolerância oral que pode contribuir para sua predisposição autoimune (HE et al., 2013; Miranda et al, 2019).

Diversos trabalhos já demonstraram que a morfologia das vilosidades intestinais pode sofrer alterações em resposta ao conteúdo antigênico a que o hospedeiro é exposto. Menezes et al. (2003) relataram que camundongos C57BL/6 alimentados desde o desmame com uma dieta na qual as proteínas intactas foram substituídas por aminoácidos não imunogênicos apresentaram vilos mais alongados quando adultos, em comparação com animais mantidos em dieta convencional. Esse fenômeno é semelhante ao observado em animais livres de microbiota (germ-free) e em neonatos, sugerindo que tanto a microbiota quanto os antígenos alimentares exercem papel determinante no remodelamento intestinal. Assim, a arquitetura do epitélio intestinal não é estática, mas dinâmica, refletindo a interação contínua entre estímulos antigênicos ambientais e mecanismos locais de homeostase imunológica.

Entretanto, nossos resultados da análise morfométrica mostraram ausência de diferenças significativas na altura das vilosidades intestinais entre os grupos BALB/c e NOD avaliados. Esse achado sugere que, apesar da exposição antigênica, não houve remodelação tecidual evidente no período experimental, indicando preservação estrutural da mucosa. Dessa forma, enquanto o estudo de Menezes evidencia a plasticidade das vilosidades frente ao conteúdo dietético, os dados obtidos aqui sugerem que o desafio com OVA por sete dias não foi suficiente para induzir modificações morfométricas relevantes, ainda que alterações imunológicas possam estar ocorrendo em paralelo.

Outro parâmetro relevante avaliado foi a frequência de linfócitos intraepiteliais (IELs) no intestino delgado. Essas células compõem uma população particular de linfócitos T que residem na superfície basolateral dos enterócitos e apresentam características tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011). Sua localização privilegiada permite a atuação imediata contra patógenos, mas também funções reguladoras que contribuem para a manutenção da integridade da barreira intestinal, evitando respostas exacerbadas e inflamatórias. Entretanto, quando em excesso ou com aumento da sua capacidade citotóxica, os IELs

podem estar associados ao desenvolvimento de distúrbios inflamatórios, como doença celíaca e doença inflamatória intestinal (FARIA; REIS; MUCIDA, 2017; HOYTEMA VAN KONIJNENBURG et al., 2017). Além disso, seu número e fenótipo podem ser modulados pela dieta e pela microbiota intestinal, refletindo a constante interação entre fatores ambientais e a resposta imune local (SMITH; NAGLER-ANDERSON, 2005).

Em nosso estudo, observamos que os camundongos NOD do grupo alta dose e os camundongos BALB/c do grupo baixa dose apresentaram aumento significativo na frequência de IELs em comparação com seus respectivos controles. Esse achado sugere que a população IEL, normalmente reguladora, pode estar mais ativada ou expandida em condições inflamatórias, talvez contribuindo para a perda da homeostase intestinal e para a inflamação exacerbada, corroborando relatos de que essas células, ao produzirem citocinas efetoras como IFN- γ , IL-2, IL-4 ou IL-17, podem assumir um papel pró-inflamatório em determinados contextos (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011). Uma outra hipótese seria que o aumento da frequência de IELs durante a alergia alimentar seria um mecanismo regulador envolvido no controle da reatividade inflamatória que é acionado exatamente pelos eventos da inflamação.

As células caliciformes são essenciais para a manutenção da barreira mucosa, secretando principalmente MUC2, mucina fundamental para a indução de respostas tolerogênicas mediadas por células dendríticas CD103+ e pela produção de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- β (SHAN et al., 2013). Em nosso trabalho, a análise da frequência de células caliciformes no intestino delgado não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e linhagens, assim, os achados sugerem que a exposição ao protocolo experimental não foi suficiente para alterar a diferenciação ou a frequência de células caliciformes de forma mensurável em ambos os modelos animais.

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea que, em condições fisiológicas, estão distribuídos na lâmina própria da mucosa gástrica e intestinal, exercendo papel na homeostase tecidual. Entretanto, em pacientes com alergia alimentar, observa-se alteração na distribuição, no número, na morfologia e no comportamento funcional dessas células, que passam a ser recrutadas em maior quantidade para a mucosa intestinal (MISHRA et al., 1999; SCHWAB et al., 2003). Em modelos murinos de alergia, como em camundongos BALB/c, o aumento do infiltrado eosinofílico na mucosa intestinal durante o período de ingestão do antígeno já foi amplamente descrito

(SALDANHA et al., 2004). Além disso, em doenças alérgicas crônicas, os eosinófilos são ativados principalmente pela IL-5 e atraídos por quimiocinas para o local da inflamação, participando da fase tardia da reação alérgica. Nessa condição, liberam mediadores como a peroxidase eosinofílica, substância tóxica ao epitélio que contribui para o dano tecidual e manutenção do processo inflamatório (CARA et al., 2000).

No presente estudo, a análise histológica da mucosa intestinal evidenciou diferenças marcantes na infiltração eosinofílica entre os grupos submetidos a sensibilização. Em camundongos BALB/c, foi observado aumento significativo do número de eosinófilos no grupo sensibilizado com Baixa Dose quando comparado ao Controle, caracterizando a ativação da resposta inflamatória alérgica já com estímulo reduzido. Por outro lado, em camundongos NOD, a diferença foi detectada no grupo sensibilizado com Alta Dose, que apresentou um infiltrado eosinofílico significativamente maior em relação ao Controle. Esses achados reforçam o papel dose-dependente do estímulo antigênico no recrutamento de eosinófilos, com variação do perfil inflamatório entre as linhagens. De forma geral, os resultados obtidos corroboram os achados da literatura, demonstrando que a infiltração eosinofílica intestinal é um dos principais marcadores histopatológicos da alergia alimentar (SAMPSON et al., 2005), e reforçam a importância dessas células como mediadoras da resposta inflamatória alérgica em diferentes condições experimentais.

Demonstramos que o fenótipo de desregulação imunológica na mucosa intestinal e suscetibilidade aumentada a manifestações autoimunes se relacionou, de forma inesperada, a um aumento na dose necessária para a indução de alergia alimentar. Não podemos concluir que se trata de uma resistência aumentada ao desenvolvimento dessa classe de reação inflamatória, mas observamos que camundongos sensibilizados com doses mais baixas de antígeno (1 μ g e 10 μ g) apresentam um desvio na produção de anticorpos para IgG1 ao invés de IgE. Como a reatividade imunológica característica da patologia autoimune desses animais, a diabetes tipo 1, tem um perfil Th1/Th17, pode ser que esse padrão de reatividade seja um empecilho para o desenvolvimento de uma reatividade tipicamente Th2. Para verificar se não haveria, por outro lado, um desvio da reatividade nesses animais durante a indução da alergia alimentar, avaliamos o efeito da sensibilização alérgica no desenvolvimento da diabetes tipo 1. Para isto, analisamos a histologia das ilhotas pancreáticas dos animais após o desafio oral. Em camundongos NOD com aproximadamente 8 a 10 semanas, demonstrando que a administração de alta

dose de OVA se associa à antecipação do aparecimento de insulite e da agressão autoimune pancreática, característicos da progressão do diabetes tipo 1. Isto sugere que a resposta inflamatória sistêmica, na presença da alergia alimentar, pode agravar a insulite, e acelerar a progressão da doença, atuando como cofator na descompensação metabólica.

Em paralelo, foi analisada a glicemia dos animais durante o desafio oral. Observamos que, enquanto os camundongos BALB/c mantiveram níveis glicêmicos estáveis e dentro da normalidade, os camundongos NOD apresentaram maior variabilidade. Destaca-se que, no grupo NOD alta dose, alguns animais atingiram valores significativamente elevados, característicos da instalação do diabetes. Esses achados reforçam a progressão espontânea da doença no modelo e estão em consonância com a maior infiltração insulítica previamente observada.

O conjunto de alterações observadas na mucosa intestinal e pâncreas dos camundongos NOD podem demonstrar que esses animais que já possuem viés inflamatório precoce e barreira intestinal comprometida apresentam resposta alérgica atípica.

6 Conclusão

Em conclusão, os achados deste trabalho reforçam a importância do modelo NOD como ferramenta experimental para compreender os mecanismos que conectam a predisposição autoimune ao desenvolvimento de respostas alérgicas alimentares.

7. Referências

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

AFUWAPE, A. O.; TURNER, M. W.; STROBEL, S. Oral administration of bovine whey proteins to mice elicits opposing immunoregulatory responses and is adjuvant dependent. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 136, n. 1, p. 40–48, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02400.x.

AITORO, R. et al. Gut microbiota as a target for preventive and therapeutic intervention against food allergy. *Nutrients*, v. 9, n. 7, p. 1–12, 2017.

ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual Review of Immunology*, v. 23, p. 447–485, 2005. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGOLOGIA E IMUNOLOGIA (ASBAI). *Alergia alimentar*. Disponível em: <https://asbai.org.br/wp-content/uploads/2023/08/ALERGIA-ALIMENTAR-ASBAI-2023.pdf>. Acesso em: 30 maio 2025.

AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, St. Louis, v. 127, n. 1, p. 3-12, 2011.

BACHARIER, L. B.; GEHA, R. S. Molecular mechanisms of IgE regulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, St. Louis, v. 105, n. 2 Pt 2, p. S547–S558, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(00\)90156-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(00)90156-6).

BASSO, A. S. et al. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *Journal of Neuroimmunology*, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, jul. 2003.

BERGMANN, R. L. et al. Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 27, p. 752–760, 1997.

BESREDKA, A. De l'anaphylaxie. Sixième mémoire de l'anaphylaxie lactique. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 23, p. 166-174, 1909.

BOCK, S. A.; MUOZ-FURLONG, A.; SAMPSON, H. A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 107, n. 1, p. 191–193, 2001.

BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 1, p. S5-18, jan. 1998.

BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 12, p. 911–920, 2002.

- CAMPBELL, D. E. et al. Mechanisms of allergic disease - environmental and genetic determinants for the development of allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 45, n. 5, p. 844–858, 2015.
- CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes. *Autoimmunity Reviews*, Amsterdam, v. 13, n. 4-5, p. 403-407, 2014.
- CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 27, p. 1331-1341, 1994.
- CARA, D. C.; et al. Role of eosinophils in the gastrointestinal tract. *Allergy*, v. 55, n. 3, p. 251-259, 2000.
- CASTRO-SÁNCHEZ, P.; MARTÍN-VILLA, J. M. Gut immune system and oral tolerance. *British Journal of Nutrition*, v. 109, suppl. 2, p. S3–S11, 2013. DOI: 10.1017/S0007114512005223.
- CEROVIC, V. et al. The renaissance of oral tolerance: merging tradition and modern immunology. *Nature Reviews Immunology*, v. 25, p. 1–15, 2025.
- CHAPLIN, David D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S3–S23, 2010. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- CHASE, M. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of sensitizing agents. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 61, p. 257-262, 1946.
- CHEHADE, M.; MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 115, n. 1, p. 3-12, 2005.
- CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 7, p. 445-456, 2011.
- CONSENSO BRASILEIRO sobre alergia alimentar. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 232–250, 2007.
- DANTZER, R. Neuroimmune interactions: From the brain to the immune system and vice versa. *Physiological Reviews*, v. 98, n. 1, p. 477-504, 2018.
- DAVEY, G. M. et al. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross-presentation of self-antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 21, p. 13093–13098, 2002.
- DUCHMANN, R.; et al. T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, baker's yeast and self antigens in humans with inflammatory bowel disease. *Gut*, v. 37, n. 5, p. 684–689, 1995.

EIGENMANN, P. A. Mechanisms of food allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 20, p. 5-11, 2009.

ERDEM, N.; MONTERO, E.; ROEP, B. O. Breaking and restoring immune tolerance to pancreatic beta-cells in type 1 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, v. 28, n. 4, p. 397–403, 1 ago. 2021.

FAGARASAN, S.; KAWAMOTO, S.; KANAGAWA, O.; SUZUKI, K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annual Review of Immunology*, v. 28, p. 243-273, 2010.

FARIA, A. M. C. et al. Tolerance and immunity in the intestinal immune system. *Research in Immunology*, Paris, v. 154, n. 1, p. 13–19, 2003.

FARIA, A. M. C.; MARON, R.; FICKER, S. M.; SLAVIN, A. J.; SPAHN, T.; WEINER, H. L. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor- β /interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity*, v. 20, n. 2, p. 135–145, 2003

FARIA, A. M. C.; REIS, B. S.; MUCIDA, D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, v. 214, n. 5, p. 1211-1226, 2017.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance and TGF- β -producing cells. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 5, n. 3, p. 179-190, 2006.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & Developmental Immunology*, v. 13, n. 2-4, p. 143–157, 1 jun. 2006.

FLORSHEIM, E. B. et al. Immune sensing of food allergens promotes avoidance behaviour. *Nature*, v. 620, n. 7974, p. 643–650, 2023. DOI: 10.1038/s41586-023-06362-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-023-06362-4>. Acesso em: 05 jun. 2025.

GARSIDE, P.; MILLINGTON, O.; SMITH, K. M. The anatomy of mucosal immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1029, p. 9-15, 2004.

GERONDAKIS, S.; SIEBENLIST, U. Roles of the NF- κ B pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2, n. 5, p. a000182, 2010.

GOLL, R.; VAN BEELEN GRANLUND, A. Intestinal barrier homeostasis in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 50, n. 1, p. 3–12, 2015. DOI: 10.3109/00365521.2014.971425.

GONÇALVES, J. L. et al. Bases do Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal. In: CÂMARA, C. C. et al. (Org.). *Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica*. São Paulo: Blucher, 2015. p. 189–204. DOI: 10.5151/9788580391893-15.

GREGORY, J. W. et al. The global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021, with projections to 2040. *Diabetes Care*, v. 45, n. 7, p. 1569–1576, 2022. DOI: 10.2337/dc22-0513.

GU, Y.; YAO, L.; JIANG, T.; CHE, H. The interaction of food allergy and diabetes: food allergy effects on diabetic mice by intestinal barrier destruction and glucagon-like peptide 1 reduction in jejunum. *Foods*, v. 11, n. 23, p. 3758, 2022. DOI: 10.3390/foods11233758.

HANSEN, L. G. et al. Prediction of allergy from family history and cord blood IgE levels. A follow-up at the age of 5 years. Cord blood IgE IV. *Allergy Immunology*, v. 4, p. 34–40, 1993.

HE, C.; et al. Defective gut microbiota regulation of intestinal immune tolerance in NOD mice contributes to autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, v. 44, p. 13–23, 2013.

HELM, R. M. et al. A neonatal swine model for peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 109, n. 1, p. 136-142, jan. 2002.

HOGQUIST, K. A.; BALDWIN, T. A.; JAMESON, S. C. *Central tolerance: learning self-control in the thymus*. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, p. 772–782, 2005.

HOYTEMA VAN KONIJNENBURG, D. P.; et al. Intestinal epithelial and intraepithelial T cell crosstalk mediates a dynamic host-microbiota balance. *Nature Immunology*, v. 18, n. 5, p. 463-470, 2017.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 159-169, 2010.

ILONEN, S. et al. The gut microbiota and type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, n. 10, p. 616-625, 2019. DOI: 10.1038/s41574-019-0222-5.

IZCUE, A.; POWRIE, F. Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract – patrolling the frontier. *Immunology*, v. 123, n. 1, p. 6–10, 2008.

JEKER, L. T.; BOUR-JORDAN, H.; BLUESTONE, J. A. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 2, n. 4, p. a007807, 2012.

JUNG, C.; HUGOT, J. P.; BARREAU, F. Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International Journal of Inflammation*, 2010.

KANTÁROVÁ, D.; BUC, M. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Bratislavské Lekárske Listy*, Bratislava, v. 108, n. 3, p. 115-119, 2007.

KAWASAKI, E. Anti-Islet Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 12, p. 10012, 2023. DOI: 10.3390/ijms241210012.

KAWASAKI, E. Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clinical Pediatric Endocrinology*, [S. l.], v. 32, p. 123–132, 2023.

KISHIMOTO, H.; SPRENT, J. The thymus and central tolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 356, n. 1409, p. 609–616, 2001.

KLEIN, L.; ROBEY, E. A.; HSIEH, C.-S. *Central CD4⁺ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation*. *Nature Reviews Immunology*, v. 19, p. 7–18, 2019.

LEITER, E. H.; STAFF, S. NOD/LtJ mice available. [S.l.]: The Jackson Laboratory, 1993. Disponível em: <http://www.jax.org>. Acesso em: 4 maio 2004.

LEITER, E. H. The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. *ILAR Journal*, v. 35, n. 1, 1993.

LEMMCBETA – Laboratório de Educação Médica em Moléculas e Células Beta. Diabetes tipo 1 – Ilhota pancreática e mecanismos imunológicos associados. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2021. Disponível em: <https://sites.usp.br/lemmcbeta>. Acesso em: 31 maio 2025.

LEMMC-USP – Laboratório de Endocrinologia Molecular e Metabolismo Celular. Representação histológica da ilhota de Langerhans e esquema dos mecanismos imunológicos no diabetes mellitus tipo 1. São Paulo: USP, 2021. Imagem disponível em material didático/institucional.

LEUNG, D. Y. Molecular basis of allergic diseases. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 63, n. 3, p. 157-167, 1998.

LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science*, v. 193, n. 4251, p. 415-417, 1976.

LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes as a chronic autoimmune disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 18, p. 1357-1366, 2002.

LO CONTE, Marta et al. Alterations of the intestinal mucus layer correlate with dysbiosis and immune dysregulation in human Type 1 Diabetes. *Science Translational Medicine*, [S.l.], v. 15, n. 717, eabo0528, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo0528>.

LOSS, G. et al. Prenatal and early-life exposures alter expression of innate immunity genes: The PASTURE cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 130, n. 2, p. 7–11, 2012.

LOTTENBERG, Ana Maria Pita et al. Associação entre fatores nutricionais e o controle glicêmico de crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, São Paulo, v. 54, n. 3, p. 211–218, 2010.

- MACIÁN, F. T-cell anergy. *Trends in Immunology*, v. 25, n. 12, p. 545–550, 2004.
- MACPHERSON, A. J.; MCCOY, K. D.; JOHANSEN, F. E.; BRANDTZAEG, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*, v. 1, n. 1, p. 11-22, 2008.
- MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. β -Cell death during progression to diabetes. *Nature*, London, v. 414, p. 792–798, 2001.
- MATS, BEMARK et al. Gut-associated lymphoid tissue: a microbiota-driven hub of B cell immunity. *Trends in Immunology*, v. 45, n. 3, p. 211–223, 1 mar. 2024.
- MAKINO, S. et al. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*, v. 29, n. 1, p. 1–13, 1980.
- MENEZES, J. S.; et al. Immunologic effects of early weaning and food antigen-free diet in mice. *Journal of Nutrition*, v. 133, n. 3, p. 665–672, 2003.
- MERCADANTE, A. C. T.; PEROBELLI, S. M.; ALVES, A. P. G.; GONCALVES-SILVA, T.; MELLO, W.; GOMES-SANTOS, A. C.; BONOMO, A. et al. Oral combined therapy with probiotics and alloantigen induces B cell-dependent long-lasting specific tolerance. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 4, p. 1928–1937, 2014.
- MIRANDA, Mariana Camila Gonçalves. Alterações imunológicas na mucosa intestinal em camundongos NOD precedem o desenvolvimento do diabetes tipo 1. 2019. Tese de doutorado (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- MIRANDA MCG et al. Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *J Leukoc Biol.*, 106(3):513-529, 2019.
- MISHRA, A.; et al. Intraepithelial eosinophils in allergen-induced gut inflammation and experimental food allergy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 103, n. 12, p. 1719-1727, 1999.
- MOGG, F. Oral tolerance: mechanisms and possible clinical applications. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 14, n. 4, p. 433–438, 1981.
- MÖRBE, U. M. et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunology*, v. 14, n. 4, p. 793–802, 22 mar. 2021.
- MOWAT, A. M. Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1029, p. 1-8, 2004.
- MOWAT, A. M.; STROBEL, S.; DRUMMOND, H. E.; FERGUSON, A. Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology*, v. 45, n. 1, p. 105–113, 1982.

MUELLER, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature Immunology*, v. 11, p. 21–27, 2010. DOI: 10.1038/ni.1817.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). Giving Your Young Kids Peanuts Could Cut Their Allergy Risk. Disponível em: <https://time.com/6982958/peanut-allergy-prevention-study/>. Acesso em: [colocar a data de acesso].

OKKENHAUG, K.; VANHAESEBROECK, B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 317–330, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Alergia alimentar: dados globais. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-allergy>. Acesso em: [colocar a data de acesso].

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, New York, v. 5, n. 3, p. 232-239, 2012.

PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 12, p. 821–832, 2012. DOI: 10.1038/nri3322.

PEARSON, J. A., WONG, F. S., & WEN, L. (2015). The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity*.

PINHEIRO-ROSA N et al. Oral tolerance as antigen-specific immunotherapy. *Immunother Adv.*, 1(1):ltab017, 2021.

PHILLIPS, B., M. Trucco, and N. Giannoukakis. (2011). Current state of type 1 diabetes immunotherapy: incremental advances, huge leaps, or more of the same? *Clin Dev Immunol* 2011:432016.

POLLIZZI, K. N.; POWELL, J. D. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends in Immunology*, v. 36, n. 1, p. 13–20, 2015.

PROCHAZKA, M. et al. Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 8, p. 3290-3294, 1992.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L. Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v. 55, n. 8, p. 1139–1149, 1998.

RAMIREZ, G. A.; CARDAMONE, C.; LETTIERI, S.; FREDI, M.; MORMILE, I. Clinical and Pathophysiological Tangles Between Allergy and Autoimmunity: Deconstructing an Old Dichotomic Paradigm. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 68, n. 1, art. 13, Feb. 2025. DOI: 10.1007/s12016-024-09020-3.

RENZ, H. et al. Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, 2018.

REZENDE, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; MEDEIROS, S. R.; GOMES-SANTOS, A. C.; ALVES, A. C.; LOLI, F. G.; FARIA, A. M. C. et al. Hsp65-producing *Lactococcus*

- lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity*, v. 40, p. 45–57, 2013.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. *Annual Review of Immunology*, v. 24, p. 147-174, 2006.
- RUDDLE, N. H.; AKIRAV, E. M. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *Journal of Immunology*, v. 183, n. 4, p. 2205-2212, 2009.
- SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and human disease. *Annual Review of Immunology*, v. 38, p. 541-566, 2020.
- SALDANHA, J. C. et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 6, p. 809–816, jun. 2004.
- SALDANHA, J. C. S.; et al. Eosinophilic inflammation and remodeling in an experimental model of chronic asthma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 11, p. 1581-1590, 2004.
- SAMPSON, H. A.; et al. Food allergy: a practice parameter update—2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 120, n. 6, p. S116-S128, 2005.
- SANTOS, Luísa Lemos dos. *Novo modelo experimental de alergia alimentar à proteína do leite β-lactoglobulina em camundongos*. 2015. 132 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- SCHWARTZ, R. H. T cell energy. *Annual Review of Immunology*, v. 21, p. 305–334, 2003. DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110.
- SERREZE, D. V. et al. Genetic resistance to autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse: protective alleles in the major histocompatibility complex and insulin-dependent diabetes loci. *Journal of Experimental Medicine*, v. 180, n. 5, p. 1705-1713, 1994.
- SHAN, M.; et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*, v. 342, n. 6157, p. 447-453, 2013.
- SHAKYA, A. K. et al. A Perspective on Oral Immunotherapeutic Tools and [autoimmune tolerance]. *Journal name*, 2023.
- SHULL, M. M. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, Londres, v. 356, p. 133–135, 1992.
- SILVA, M. E. R.; MORY, D. B.; DAVINI, J. G. Diabetes mellitus tipo 1: aspectos genéticos, imunológicos e ambientais. *Revista Médica de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 18, n. 2, p. S10–S15, 2008.

SMITH, P. D.; NAGLER-ANDERSON, C. Intestinal epithelial cells regulate immune responses. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 3, p. 556-564, 2005.

SOLÉ, D. et al. Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2018 – Parte 1: Etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 2, n. 1, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOLOGIA (ASBAI). *Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar 2018: Etiopatogenia, clínica e diagnóstico*. Disponível em: <https://www.asbai.org.br/consenso-brasileiro-sobre-alergia-alimentar-2018>. Acesso em: [colocar data de acesso].

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA (SBP). *Manual de Nutrologia da Sociedade Brasileira de Pediatria*. 1. ed. São Paulo: SBP, 2020.

SORINI, C. et al. Loss of gut barrier integrity triggers activation of islet-specific T cells in NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 2019.

TAN, H. et al. mTORC1-driven metabolic reprogramming regulates Th2 cell differentiation. *Nature Communications*, v. 8, p. 14230, 2017.

TAO, R. et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nature Medicine*, v. 13, n. 11, p. 1299–1307, 2007.

THE LANCET DIABETES & ENDOCRINOLOGY. Diabetes-related complications: a toll too high. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 321, 2024.

TOOLEY, J. E.; WALDRON-LYNCH, F.; HEROLD, K. C. New and future immunomodulatory therapy in type 1 diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, [S.l.], v. 18, n. 3, p. 173–181, 2012.

TURLEY, S. J. et al. T cell activation occurs in draining lymph nodes of transplanted pancreatic islets. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 201, n. 9, p. 1383–1391, maio 2005.

VALITUTTI, F. et al. Intestinal permeability, food antigens and the microbiome. *Frontiers in Allergy*, 2025.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 60, n. 2, p. 110–115, 1977.

XU, J.; PANHUYSSEN, C. I.; MEYERS, D. A.; POSTMA, D. S.; BLEECKER, E. R.; LEVITT, R. C. Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *New England Journal of Medicine*, v. 333, n. 14, p. 894–900, 1995. DOI: [10.1056/NEJM199510053331402](https://doi.org/10.1056/NEJM199510053331402).

WÅLLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends in Immunology*, Cambridge, v. 34, n. 12, p. 583–591, 2013.

WAHN, U.; VON MUTIUS, E. Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 107, p. 567–574, 2001.

WEANT, A. E. et al. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8⁺ T cell contraction. *Immunity*, v. 28, n. 2, p. 218–230, 2008. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.12.017.

WELLS, H. G. Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg. *Journal of Infectious Diseases*, v. 9, p. 147–171, 1911.

WEINER, H. L. The mucosal immune system in health and disease. *Nature*, Londres, v. 413, p. 853–857, 2001.

WEINER, H. L.; WU, H. Y. Oral tolerance. *Immunologic Research*, v. 241, n. 3, p. 241–259, 2011. DOI: <http://doi.org/10.1385/IR:28:3:265>.

YADAV, D. et al. T cell–mediated autoimmunity in type 1 diabetes: therapeutic strategies targeting autoreactive T cells. *Current Diabetes Reports*, Philadelphia, v. 4, n. 5, p. 415–419, 2004.

ZHU, J.; PAUL, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research*, v. 20, n. 1, p. 4–12, 15 dez. 2009.