

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

LETÍCIA TAMIE PAIVA YAMADA

EFEITO DA OBESIDADE NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E METABÓLICA DE
CAMUNDONGOS COM ALERGIA ALIMENTAR EXPERIMENTAL À OVALBUMINA

Belo Horizonte
2014

LETÍCIA TAMIE PAIVA YAMADA

EFEITO DA OBESIDADE NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E METABÓLICA DE
CAMUNDONGOS COM ALERGIA ALIMENTAR EXPERIMENTAL À OVALBUMINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências de Alimentos da Faculdade de
Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito à obtenção do Grau de Doutora em
Ciência de alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Dr^a Adaliene Versiani Matos Ferreira
Departamento de Nutrição
Escola de Enfermagem
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadora: Dr^a Denise Carmona Cara Machado
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
2014

Ficha catalográfica

Yamada, Letícia Tamie Paiva.

Y19e Efeito da obesidade na resposta inflamatória e metabólica de camundongos com alergia alimentar experimental à ovalbumina / Letícia Tamie Paiva Yamada. – 2014.

77 f. : il.

Orientadora: Adaliene Versiani Matos Ferreira.

Coorientadora: Denise Carmona Cara Machado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Alergia a alimentos – Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Dieta hiperglicídica – Teses. 5. Dieta de alto carboidrato – Teses. 6. Ovalbumina – Teses. I. Ferreira, Adaliene Versiani Matos. II. Machado, Denise Carmona Cara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.975

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA – DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

LETÍCIA TAMIE PAIVA YAMADA

**Efeito da obesidade na resposta inflamatória e metabólica de
camundongos com alergia alimentar experimental à
ovalbumina**

TESE APROVADA EM 27 DE JUNHO DE 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Adaliene

Profa. Dra. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA
Orientadora e Presidente da Comissão

Simone de Vasconcelos

Profa. Dra. SIMONE DE VASCONCELOS GENEROSO

Denise Carmona

Profa. Dra. DENISE CARMONA CARA MACHADO
Coorientadora

Sergio Henrique Sousa Santos

Prof. Dr. SÉRGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS

Joana Ferreira do Amaral

Profa. Dra. JOANA FERREIRA DO AMARAL

Luiz Cosme Cotta Malaquias

Prof. Dr. LUIZ COSME COTTA MALAQUIAS

À Maria Santíssima e S. João Paulo II
E aos meus filhos João Paulo e Rafael
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Bom Deus que em tudo está presente e a Nossa Senhora, companheira sempre.

À Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG e a Faculdade de Nutrição - FANUT pelo apoio necessário para a realização deste doutorado.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Colegiado do Curso de Ciência dos Alimentos pela confiança, na pessoa do Coordenador, Professor Dr. Roberto Gonçalves Junqueira e às secretárias Marilene e Úrsula por toda ajuda.

Às minhas queridas orientadora: Profa. Doutora Adaliene Versiani Matos Ferreira e co-orientadora: Profa. Dra. Denise Carmona Cara Machado, pela ética, pelo exemplo de compromisso com a formação de seus alunos, pela competência e qualidade no trabalho como pesquisadoras, professoras e educadoras, mas principalmente, pela grande demonstração de humanidade, sensibilidade e paciência nos momentos mais difíceis pelos quais já passei em minha vida.

Aos professores Gustavo e Vanessa do NEI e ao professor Mauro do IMUNOFAR, pela parceria, disponibilidade em ensinar, sempre! Pelas inúmeras vezes em que cederam equipamentos, materiais e reagentes: o meu muito obrigada.

Aos amigos do Núcleo de Estudos em Inflamação Débora e Denise (Xús!), Natália (Naty Naty) e Rafaela (“semvocêsnaodavamess!”), Roberta, Priscila, Bárbara (o bolo...), Alessandra, Albená (vc é 10!), Pedro, André, Sylvia, Luana, Mirna, Bárbara Kaori e todos com os quais convivi no N3-140.

Ao grupo Imunometabolismo, à parceirona Marina (Marinão Marinex!), Jaqueline, Ana e Aninha, Laís, Déboras, Marina Zicker, Kátia e todas com as quais não convivi muito, por todo apoio, amizade e *kkks* e *hehehe* e *rsrsrs* ! Todos vocês foram mais do que colegas, foram o sorriso (gargalhadas!), o abraço, os ouvidos, as “mãos na roda”, as folias e festinhas e amigos ocultos e happy hours e lanchinhos que me alegraram neste tempo.

À Adelaide do Biotério da FAFAR e ao Batista, por toda ajuda, carinho e amizade!

Ao Dr. Eduardo, Dr. Eustáquio e Genilce que me deram um “empurrão” e me permitiram caminhar quando só pensava em parar...

À Alessandra por ter “adotado” o João Paulo e tê-lo ajudado nesse difícil início de aprendizagem do *beabá*! Deus lhe pague!

À Cristiane e Juliana irmãzonas, às amigas Roberta, Flávia, Eveline, Gislene pela amizade, parceria, por tudo que eu sei (e que eu não sei) que fizeram e fazem por mim!

À minha irmã Eliane, pela companhia de toda uma vida: eu tenho você e você tem a mim!

À minha mãe... Por toda a força, a garra, por todo o choro compartilhado, pela companhia, pelo amor, pelo carinho comigo e com os meninos, pela acolhida, pelo colo, orações... Nunca poderia concluir essa etapa sem você! Mãe você é um presente de Deus!

Ao meu pai, Kunitio Yamada, *in memoriam*... esse doutorado também é seu! Saudades demais!

A minha GRANDE Família: a de sangue e dos “agregados” (aê família Ramos)! Sempre presentes, nos almoços, festas e aniversários mil, natais teatrais, companhias de todas as horas e “para o que der e vier”!

À outra GRANDE Família da Gospa Mira, nas pessoas de Pe. Oscar, Ângela e Maria, vocês foram meus irmãos, pai e intercessores em todo(s) o(s) “processo”(s)! Amo vocês!

E a todos que de alguma forma fizeram essa Tese acontecer!

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica não transmissível que atualmente apresenta índices considerados epidêmicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 2,3 M de pessoas no mundo têm excesso de peso e 700 M são obesas. A obesidade é fator de risco para diversas doenças entre elas a alergia. O mecanismo ainda é desconhecido, mas uma hipótese é de que a inflamação crônica predisponha a reações de hipersensibilidade. Estudos recentes demonstram que camundongos obesos têm aumento de peso corporal, de adiposidade e apresentam resposta inflamatória intensa no tecido adiposo. Já a alergia promove disfunção metabólica, uma redução significativa de peso corporal, de adiposidade e mostram resposta inflamatória no tecido adiposo semelhante à observada em camundongos obesos. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta alérgica em camundongos com obesidade leve e inflamação crônica de baixa intensidade. Camundongos BALB/c machos foram divididos em quatro grupos e receberam: (i) Controle (**C**), ração comercial padrão; (ii) Alérgicos (**A**), ração comercial padrão; (iii) Obesos (**HC**), dieta rica em carboidrato refinado (Dieta HC) e (iv) Obesos Alérgicos (**HCA**), dieta HC. Os grupos **A** e **HCA** foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) via subcutânea, com uma dose de reforço 14 dias após a primeira imunização. Uma semana depois se deu o desafio imunológico com solução de OVA a 20%, via oral, por sete dias. Os grupos **A** e **HCA** mostraram aumento dos níveis séricos de IgE total, IgE e IgG1 anti-OVA, elevada pontuação no índice de atividade de doença (DAI), aversão à OVA e aumento do infiltrado eosinofílico intestinal. O grupo **HC** também apresentou aversão à OVA e aumento do número de eosinófilos no duodeno. Após o desafio alérgico, os animais do grupo **A** perderam peso e adiposidade em diferentes sítios adiposos. Os animais do grupo **HCA** apresentaram perda de massa gorda no sítio adiposo mesentérico e aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-10. Conclui-se que alergia associada a uma obesidade de grau leve não alterou significativamente os parâmetros metabólicos dos animais. Os dados mostraram que camundongos alérgicos com obesidade de grau leve não apresentaram agravamento dos sintomas de alergia alimentar, porém a dieta **HC** provocou distúrbios intestinais importantes que parecem modular a resposta inflamatória durante o desafio alérgico.

Palavras-chave: Alergia Alimentar. Obesidade, Inflamação. Dieta hiperglicídica.

ABSTRACT

Obesity is a chronic noncommunicable disease that has now reached epidemic rates. The World Health Organization (WHO) estimates that 2.3 billion people in the world are overweight and 700 million are obese. Obesity is a risk factor for several diseases including allergies. It is not known which mechanism but one hypothesis is that chronic inflammation predisposes to hypersensitivity reactions. Recent studies have shown that allergy promotes metabolic dysfunction in addition to inflammation of adipose tissue. Allergic mice, despite exhibiting an important reduction in body weight and adiposity, show a higher inflammatory response in the adipose tissue similar to that observed in obese fat tissue. The aim of this study was to evaluate whether the low-grade inflammatory milieu of mild-obese mice fed a high carbohydrate-containing diet interferes with the allergy response induced by ovalbumin (OVA). BALB/c mice were separated in four groups: (i) Control (C), fed chow diet; (ii) Allergic (A) fed chow diet; (iii) Obese (HC) fed the high refined carbohydrate-containing diet (HC Diet) and (iv) Allergic Obesity (HCA) fed HC diet. Groups A and HCA were sensitized with ovalbumin (OVA) subcutaneously with a booster dose 14 days after the first immunization. All of the groups received an oral ovalbumin challenge seven days after the booster. The allergic groups showed increased serum levels of total IgE, IgE and IgG1 anti-ovalbumin, a high activity index score (DAI), aversion to OVA and increased intestinal eosinophil infiltration. Interestingly, the non-allergic mild-obese mice also showed aversion to OVA and an increased number of eosinophils in the gut. After allergic challenge, the OVA+ mice fed the chow diet showed weight loss and lower adiposity in several adipose tissue depots. The OVA+ mice fed the HC diet showed a loss of fat mass only one depot (mesenteric adipose tissue). Furthermore, increased levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 were observed in this tissue. The allergy associated with mild obesity did not significantly change the metabolic parameters. Our data show that mild-obese allergic mice don't present severe pathological features of food allergy than those exhibited by lean allergic mice. Interestingly, mild obesity promoted by HC diet ingestion itself causes important intestinal disorders that appear to modulate the inflammatory response during antigen challenge.

Key words: Allergy. Obesity. Inflammation. High refined carbohydrate-containing diet.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAAAI – (*American Academy of Allergy, Asthma e Immunology*) - Academia Americana de Alergia, Asma e Imunologia

AIN – (*American Institute of Nutrition*) - Instituto Americano de Nutrição

ASBAI – Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia

CCL – (CC Chemokine Ligand) - Quimiocina CCL

CEBIO – Centro de bioterismo do ICB-UFMG

DAI – Disease Activity Index (índice de atividade da doença)

ELISA – (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) - teste de imunoensaio

FcεRI – receptor de alta afinidade para IgE

GALT – Gut - Associated Linfoide Tissue (Tecido linfóide associado ao intestino)

H&E – coloração de Hematoxilina – Eosina

HC – High carbohydrate (quantidade elevada de carboidratos)

IFN - Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

MCP-1/CCL-2 – Proteína quimioatraente de monócitos/macrófagos

NF-κB –Fator nuclear kappa B

OVA - Ovalbumina

PAF – (Platelet Activating Factor) - Fator ativador de plaquetas

PAS – Periodic Acid Schiff (coloração de ácido periódico com reativo de Schiff)

PBS – Salina tamponada fosfato

TAE – Tecido adiposo epididimal

TAI - Tecido adiposo inguinal

TAM - Tecido adiposo mesentérico

TAR - Tecido adiposo retroperitoneal

TG – Triglicérides

TGF-β - (Transforming Growth Factor) - Fator de transformação do crescimento-β

Th – (*T helper*) - Células T auxiliares

TNF – Fator de necrose tumoral

TTOG – Teste de tolerância oral à glicose

VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

WHO – (*World Health Organization*) - OMS – Organização Mundial para saúde

LISTA ILUSTRAÇÕES

	PÁGINA
FIGURA 01 – Inflamação do tecido adiposo.com o aumento da adiposidade.....	05
FIGURA 02 – O ambiente imunológico intestinal.....	11
FIGURA 03 – Imunopatogênese da alergia.....	13
FIGURA 04 – Esquema de delineamento experimental	17
FIGURA 05 – Esquema de procedimentos experimentais	19
FIGURA 06 – Níveis séricos de IgE total e IgE e IgG-1 anti-OVA	28
FIGURA 07 – Avaliação dos parâmetros clínicos: peso, Escore DAI e ingestão de OVA	29
FIGURA 08 – Infiltrado eosinofílico intestinal e avaliação de muco	31
FIGURA 09 – Infiltrado de eosinófilos intestinais de camundongos BALB/c alimentados com dieta HC ou ração comercial não sensibilizados e não desafiados com OVA.....	32
FIGURA 10 - Concentração de citocinas intestinais	33
FIGURA 11 - Análise dos sítios adiposos	34
FIGURA 12 – Análises morfológica e histológica do TAE e TAM	35
FIGURA 13 –Rolamento e adesão de leucócitos no TAE E TAM.....	37
FIGURA 14 – Dosagem de citocinas no TAE e TAM	38
FIGURA 15 - Contagem de leucócitos circulantes	39
QUADRO 1 – Delineamento experimental	17
TABELA 1 – Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (kcal/g) da dieta comercial Labina e dieta rica em carboidratos	18
TABELA 2 – Índice de Atividade da Doença: Escore DAI.....	21
TABELA 3 – Análises séricas de lipídeos, glicose e adipocinas	40
ANEXO 1 – Dieta HC	62
ANEXO 2 – Consumo percentual de dieta	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
2.1 Objetivo geral	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1 Definição, patogênese e implicações da obesidade na saúde.....	04
3.2 As Adipocinas	06
3.3 Alergia Alimentar e aspectos epidemiológicos	08
3.4 A mucosa intestinal e a atividade imunológica.....	10
3.5 A relação entre alergia e obesidade	14
4. METODOLOGIA	16
4.1 Animais	16
4.2 Indução do aumento de adiposidade	18
4.3 Sensibilização e desafio antigênico	19
4.4 Avaliações clínicas	20
4.4.1 Avaliação do consumo de ração	20
4.4.2 Avaliação do peso corporal.....	20
4.4.3 Escore DAI (Disease Activity Index)	21
4.4.4 Avaliação dos sítios adiposos	21
4.5 Preparo das lâminas histológicas.....	22
4.6 Métodos de coloração H&E e PAS.....	22
4.7 Histologia do tecido adiposo epididimal.....	23
4.8 Microscopia intravital do tecido adiposo epididimal.....	24
4.9 Análises imunológicas e bioquímicas.....	24
4.9.1 Dosagem de IgE total.....	24
4.9.2 Dosagem de IgE anti-OVA.....	25

4.9.3 Dosagem de IgG-1 anti-OVA	24
4.10 Dosagem de citocinas no soro, tecido adiposo epididimal e duodeno.....	26
4.11 Contagem total de leucócitos, células mononucleares e neutrófilos	27
4.12 Análise estatística.....	27
5 RESULTADOS	28
5.1 A dieta HC não agrava a alergia alimentar induzida por OVA, entretanto, promove alterações intestinais e clínicas.....	28
5.2 O padrão de secreção de mediadores inflamatórios TNF e IL-6 e anti-inflamatório IL-10 no intestino são semelhantes, independentemente da dieta consumida.....	32
5.3 Camundongos com obesidade leve e alergia alimentar perdem massa gorda somente no sítio próximo ao foco de inflamação alérgica.....	33
5.4 Os tecidos adiposos de camundongos alérgicos ou com obesidade leve não alérgicos e alérgicos se encontram inflamados.....	35
6. DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	51
8 Referências Bibliográficas	52
Anexo 1	62
Anexo 2	63

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença de caráter crônico que tem aumentado mundialmente nos últimos anos, atingindo índices considerados epidêmicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2015 cerca de 2,3 milhões de pessoas no mundo estarão com excesso de peso e 700 milhões serão obesas (WHO, 2010). Nos Estados Unidos, a obesidade atinge 27,6% da população adulta, no Chile, 25,1% e na Argentina 20,5%. No Brasil, 52,6% dos homens e 44,7% das mulheres estão acima do peso ideal (IBGE, 2011). Pesquisa da Universidade de Brasília (UnB) sobre o sistema único de saúde (SUS) concluiu que o tratamento de doenças relacionadas à obesidade custa ao governo R\$ 488 milhões por ano e para tratamento da obesidade grave R\$116 milhões. Se fosse contabilizado o sobrepeso, o valor poderia atingir R\$ 3,5 bilhões anuais (BRASIL, 2013).

Esta epidemia se torna mais alarmante devido ao aumento desses índices entre a população infantil. Em 2010, o número de crianças nos EUA menores de 5 anos que apresentaram excesso de peso era de 43 milhões. No Brasil, o número de meninos com excesso de peso entre 1989 e 2009, passou de 15% para 34,8%, respectivamente. Já o número de obesos teve aumento de mais de 300% nesse mesmo grupo etário, indo de 4,1% em 1989 para 16,6% em 2008-2009. Em relação às meninas os índices foram ainda maiores, passando de 11,9% para 32% de meninas com excesso de peso e de 2,4% para 11,8% de meninas obesas (IBGE, 2011).

Com base neste quadro mundial, Sá-Esteves (2011) descreveu a obesidade como a “*Síndrome do Novo Mundo*” ou “*epidemia do século XXI*”, outro autor afirma que a obesidade é uma “*pandemia já bem estabelecida*” e não mais um problema de saúde ainda em desenvolvimento (AZAGURY E LAUTZ, 2011).

O maior problema da obesidade para a saúde pública é que ela é associada a diversas co-morbidades, muitas delas fatais, como doenças do sistema circulatório, diabetes, artrose, diferentes tipos de câncer e doenças alérgicas. A susceptibilidade ao desenvolvimento de alergia é maior em indivíduos obesos do que indivíduos não obesos. Diversos estudos apontam para uma correlação positiva entre obesidade e doenças alérgicas como a asma e alergia alimentar. Os mecanismos que

desencadeiam esta associação ainda não são completamente esclarecidos. Alguns autores sugerem que a inflamação crônica produzida na obesidade possa agir nesse sentido por aumentar os níveis de células do sistema imunológico, bem como mediadores e citocinas pró-inflamatórias a nível sistêmico. (MAI *ET AL.*, 2004; VIEIRA *ET AL.*, 2005). Nesse sentido, este trabalho se propôs a investigar as alterações imunológicas e metabólicas em camundongos obesos alérgicos à ovalbumina. O experimento utilizou dois modelos já validados: o de Oliveira *et al.* (2013), que induz à obesidade de baixa intensidade promovida pela ingestão de dieta rica em carboidrato refinado e o protocolo de sensibilização alérgica de Saldanha *et al.* (2004) que desenvolve alergia alimentar a ovalbumina.

2 OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Foram investigadas as alterações metabólicas e o padrão da resposta imunológica em camundongos obesos e alérgicos à ovalbumina.

2.2- Objetivos específicos

2.2.1- Investigou-se:

- A evolução ponderal antes e após o desafio antigênico.
- A deposição de gordura em diferentes sítios de tecido adiposo (TAE, TAR, TAI e TAM) de animais obesos e alérgicos.
- Caracterizou-se os sintomas clínicos dos animais obesos e alérgicos, durante o desafio alergênico.

2.2.2- Investigou-se a inflamação local do TA de animais obesos e alérgicos:

- Quanto ao padrão de migração de leucócitos in vivo;
- Quanto a produção de mediadores inflamatórios no tecido.

2.2.3- Avaliou-se a associação da alergia à obesidade na promoção de alterações imunológicas sistêmicas.

2.2.4- Investigou-se a relação da inflamação crônica de baixa intensidade e a inflamação alérgica com possíveis distúrbios metabólicos.

2.2.5- Avaliou-se as alterações morfológicas no intestino (duodeno proximal) e no tecido adiposo de animais alérgicos e obesos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Definição, patogênese e implicações da obesidade na saúde

A obesidade é definida como uma enfermidade crônica multifatorial, caracterizada principalmente pelo acúmulo excessivo de gordura, com hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo. Sua patogênese não está totalmente determinada, pois o aumento de adiposidade é resultante da interação entre diversos fatores, como os genéticos, metabólicos, hormonais, ambientais, comportamentais e culturais (HOSSAIN ET AL., 2007; AZAGURY E LAUTZ, 2011; OLIVEIRA ET AL., 2013).

A obesidade está relacionada ao aparecimento de diversas co-morbidades, muitas delas fatais. Nos EUA, o *National Health and Nutrition Examination Study III* (NHANES III) associou a obesidade ao aumento da prevalência de diabetes tipo 2 (DM2), doença da vesícula biliar, doença arterial coronariana (DAC), hipertensão arterial sistêmica (HAS), osteoartrose (OA) e de dislipidemia. No Brasil, esta morbidade foi associada a 26 doenças diferentes, dentre elas diversos tipos de câncer e a asma (BRASIL, 2013) (NHANES, 1999-2012).

Muitas destas co-morbidades têm sido atribuídas ao quadro de inflamação crônica de baixa intensidade observada tanto em humanos quanto em modelos animais com obesidade genética ou induzida por dieta. O mecanismo que liga a obesidade à inflamação crônica de baixa intensidade foi primeiramente proposto por Hotamisligil *et al.* (HOTAMISLIGIL ET AL., 1993) que demonstraram que o tecido adiposo branco produz e secreta o fator de necrose tumoral (TNF), uma citocina conhecidamente pró-inflamatória. Baseado neste dado foi proposto que o tecido adiposo desempenha papel importante como fonte de mediadores pró-inflamatórios, iniciando o desenvolvimento da inflamação crônica de baixa intensidade.

Segundo Gregor e Hotamisligil (2011) o gatilho que inicia esse processo é o excesso no consumo de nutrientes, que induz a disfunção de células metabólicas, como os adipócitos, e também o recrutamento de células do sistema imunológico para o tecido adiposo (FIGURA 1). Diversas substâncias secretadas tanto por adipócitos

como por células imunológicas infiltradas no tecido adiposo já foram identificadas, como a IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β 1 e MCP-1/CCL2 (BERG E SCHERER, 2005; SHOELSON *ET AL.*, 2006; GREGOR E HOTAMISLIGIL, 2011; OLIVEIRA *ET AL.*, 2013). Esse *milieu* de moléculas secretadas pelo tecido adiposo desencadeia os eventos que geram a resposta inflamatória de baixa intensidade. Os mecanismos pelos quais os nutrientes influenciam esse aumento, ainda permanecem obscuros (BACH-NGOHOU *ET AL.*, 2002; BULLO *ET AL.*, 2003; CANCELLO *ET AL.*, 2006; IYER *ET AL.*, 2010; KALUPAHANA *ET AL.*, 2011) (WELLEN E HOTAMISLIGIL, 2003)

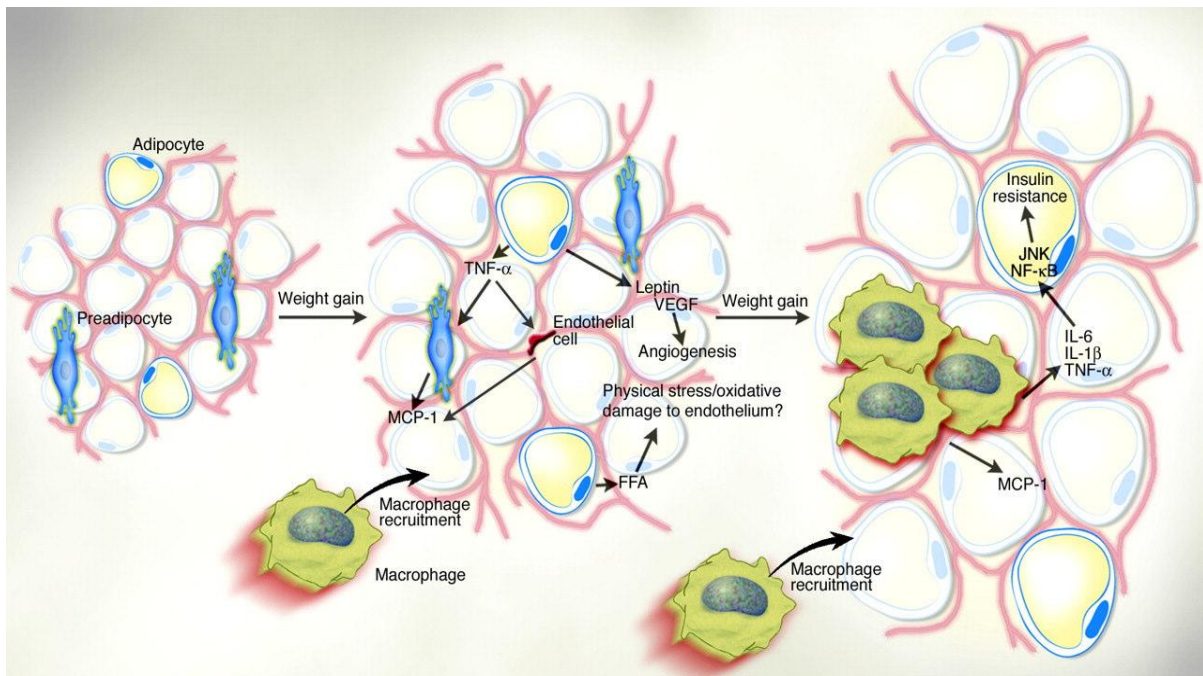


FIGURA 1: Inflamação do tecido adiposo com o aumento da adiposidade. O aumento da adiposidade estimula a síntese e secreção de várias citocinas pelo tecido adiposo. Essas citocinas liberadas participam do recrutamento de monócitos/macrófagos da corrente sanguínea. A modificação da composição celular, juntamente com o infiltrado de células do sistema imune, remodelam o tecido, desencadeando um processo inflamatório. MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos/macrófagos; TNF- α : Fator de necrose tumoral; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; FFA – ácidos graxos livres; IL – interleucinas; JNK – Jun N-terminal quinase; NF- κ B – fator nuclear kappa B ((WELLEN E HOTAMISLIGIL, 2003).

3.2. As Adipocinas

Em 1994, após a descoberta da leptina, o tecido adiposo passou a ser considerado um órgão endócrino, pois o mesmo expressa e secreta essa molécula para a corrente sanguínea que, por sua vez, exerce efeitos sistêmicos. A partir de então foi introduzido o conceito das adipocitocinas ou adipocinas, sendo as mais conhecidas a leptina, a adiponectina e a resistina (ZHANG *ET AL.*, 1994; OUCHI *ET AL.*, 2011).

A leptina é reconhecidamente um fator de saciedade secretado principalmente pelo tecido adiposo branco, sendo produzida também na placenta, coração, ovários, endotélio gástrico e tecido adiposo marrom. Essa adipocina é responsável por enviar sinais ao hipotálamo sobre a quantidade de reservas energéticas no organismo (ZHANG *ET AL.*, 1994). Quando há um balanço energético positivo e conseqüente aumento da massa adiposa, ocorre aumento da secreção de leptina que atua inibindo o apetite e aumentando o gasto energético, por meio do aumento na taxa de oxidação lipídica (YINGZHONG *ET AL.*, 2006). Além desta função, estudos tem demonstrado que a leptina possui papel consistente na resposta imunológica, pois atua regulando positivamente a síntese MCP-1/CCL-2 recrutando monócitos para o tecido adiposo, que se diferenciam em macrófagos e por sua vez, passam a secretar citocinas pró-inflamatórias. Há ainda citações na literatura que descrevem que a secreção da quimiocina MCP-1/CCL-2 no tecido adiposo é aumentada pela leptina e que, além dos macrófagos, outras células envolvidas nas respostas imunológicas também apresentam receptores para esta adipocina como os neutrófilos, monócitos e linfócitos (SUGANAMI *ET AL.*, 2005; KANDA *ET AL.*, 2006; WOZNIAK *ET AL.*, 2009; FERNANDEZ-RIEJOS *ET AL.*, 2010).

Estudos anteriores demonstram que estímulos inflamatórios também levam à produção da resistina, adipocina responsável por gerar a resistência à insulina, ao promover o aumento das concentrações de glicose e insulina no sangue (SPINDLER, 2005; STOFKOVA, 2010). A resistina é uma proteína com propriedade pró-inflamatória secretada pelos adipócitos e também por monócitos. É membro da família de proteínas ricas em cisteína. Apesar de ser expressa e secretada em indivíduos magros, concentrações elevadas desta adipocina estão presentes na obesidade tanto em

humanos como em modelos experimentais (FERNANDEZ *ET AL.*, 2010). Estudos sobre os efeitos da resistina sobre a tolerância à glicose nos tecidos muscular esquelético e adiposo, indicam que a sua ação se dá por meio da modulação negativa de uma ou mais etapas da sinalização da insulina voltadas para aumentar a captação de glicose (STEPPAN *ET AL.*, 2001; MCTERNAN *ET AL.*, 2002). A resistina também pode agir aumentando a resistência à insulina por meio do aumento da gliconeogênese hepática (RAJALA *ET AL.*, 2003). Sua expressão é cerca de três vezes maior em pré-adipócitos quando comparada com adipócitos maduros, indicando ser uma potencial reguladora da adipogênese (MCTERNAN *ET AL.*, 2002).

Outra adipocina secretada pelo tecido adiposo branco é a adiponectina, que foi descrita primeiramente em 1995 e é considerada a proteína mais abundante produzida pelos adipócitos (SCHERER *ET AL.*, 1995). É encontrada ainda em células do tecido muscular esquelético, do coração e endoteliais. Receptores para adiponectina também foram descritos na maioria dos monócitos humanos e ainda em células B, NK e, em menor percentagem, em células T (PANG E NARENDRAN, 2008).

Sua expressão e secreção são aumentadas durante a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (CORBETTA *ET AL.*, 2005) e os níveis de adiponectina são inversamente correlacionados com a obesidade visceral e resistência a insulina, sendo a perda de peso um potente indutor da síntese dessa adipocina (MAEDA *ET AL.*, 2002). Possui perfil anti-inflamatório, pois promove a inibição da produção de TNF, aumento da sensibilidade à insulina e ainda tem efeitos moduladores sobre o fator de transcrição NF-kB. Adicionalmente, inibe a produção de IL-6 e induz as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e o antagonista de receptor de IL-1 (YAMAUCHI *ET AL.*, 2002). No fígado ela atua diminuindo a lipogênese e as concentrações de triglicérides, aumentando a sensibilidade à insulina nas células deste órgão e diminuindo a glicose sanguínea (TUGWOOD *ET AL.*, 1992; BERG *ET AL.*, 2001).

3.3. Alergia alimentar e aspectos epidemiológicos

A alergia alimentar é uma doença caracterizada por produzir reações de hipersensibilidade imediata, mediada por IgE, a determinados tipos de alimentos. O contato com esses alimentos alergênicos leva à liberação de mediadores que ativam os mastócitos da mucosa e submucosa intestinal desencadeando uma resposta imunológica anormal (FERREIRA E SEIDMAN, 2007; ABBAS, 2008).

Assim como a obesidade, essa condição patológica tem se tornado um grande problema de saúde no mundo, associada a um impacto significativo na qualidade de vida. O aumento dos casos de alergia alimentar, verificado nas últimas décadas, determina a necessidade de estratégias preventivas e melhor compreensão do fenômeno pois, apesar dos avanços na compreensão da imunologia das mucosas, as causas deste aumento permanecem desconhecidas devido à complexidade de fatores que podem iniciar o processo alérgico. Hipóteses têm sido formuladas baseando-se em fatores ambientais, como maior exposição aos alérgicos (substâncias que causam reações alérgicas), endotoxinas, infecções, o estilo de vida moderno – que provocou mudanças nos padrões dietéticos (como o consumo de alimentos cada vez mais processados e complexos), aumento do consumo de álcool, inatividade física e maior incidência de sobrepeso e obesidade (FERREIRA E SEIDMAN, 2007; HERSOUG E LINNEBERG, 2007; VAN WIJK E KNIPPELS, 2007).

A alergia alimentar atinge 6-8% das crianças jovens e 3-4% dos adultos. Contudo, ao incluir reações leves a determinadas frutas e vegetais, essa prevalência pode chegar a mais de 10% (SAMPSON, 2004; SICHERER E SAMPSON, 2010). A sensibilização precoce do recém-nascido e das crianças atópicas, por via digestiva, cutânea ou inalatória inicia a chamada marcha alérgica, ocasionando as manifestações clínicas da doença em qualquer período da vida. Quando indivíduos sensíveis entram em contato com estas substâncias desencadeia-se uma série de eventos resultando em rápida secreção de histamina, que causa diversos efeitos no organismo como contração muscular, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. No caso da alergia alimentar a ingestão de antígenos leva a manifestações clínicas de diferentes intensidades, que vão desde um simples incômodo gastrointestinal até casos mais graves, como o choque anafilático que pode levar o indivíduo rapidamente a óbito (FERREIRA E SEIDMAN, 2007; SICHERER E SAMPSON, 2010).

A quantidade de alimentos que o trato gastrointestinal (TGI) recebe durante toda a vida (cerca uma tonelada a cada ano), a grande extensão da sua superfície de mucosa (cerca de 400m^2) que absorve em média 190g de proteínas diariamente e ainda o fato de que parte significativa destas proteínas chegam intactas à circulação, demonstra como um indivíduo tem inúmeras chances de entrar em contato com substâncias potencialmente alergênicas. Desde o nascimento, inicia-se a exposição a diversas proteínas, quer através do leite materno quer através das fórmulas para lactentes. Cerca de 90% das manifestações de alergia alimentar em crianças são devidas às proteínas do leite de vaca, ovo, amendoim, trigo. Em adultos e adolescentes 85% estão relacionadas com amendoim, peixe, frutos do mar e castanhas, sendo que o amendoim e as castanhas são responsáveis por 62% de reações alérgicas fatais. Outros tipos de alimentos como frutas cruas e vegetais são responsáveis ainda pela síndrome alérgica oral, que afeta aproximadamente 50% dos adultos. Alimentos exóticos como o kiwi, mamão papaia, grãos como o gergelim, a mostarda e a canola também têm demonstrado potencial alergênico (PEREIRA, 2008). Dietas modernas que incluem alimentos processados, ricos em aditivos e contaminantes são também potenciais fontes de alérgenos. Já são conhecidos como causadores de reações o corante tartrazina, sulfitos, glutamato monossódico e o citrato de sódio. Temos ainda a introdução na alimentação moderna dos alimentos geneticamente modificados ou organismos geneticamente modificados (OGM). A transgenia em alimentos altera a sua composição, introduzindo novas proteínas em alimentos anteriormente não classificados como alergênicos. Os estudos com estes OGM são ainda recentes e a introdução destes na alimentação humana pode estar contribuindo para o aumento dos casos de alergia nesta última década (ASBAI, 2007).

3.4. A mucosa intestinal e atividade imunológica

A extensa superfície da mucosa intestinal é associada a um complexo tecido linfóide denominado **GALT** (Gut-Associated Lymphoid Tissue) que foi identificado em seres humanos e camundongos. A maioria das células linfóides se encontram na lâmina própria (LP) do intestino e foi demonstrado que cerca de 45% destas se encontram no duodeno (MESTECKY *ET AL.*, 2005). O GALT é estimulado a todo momento e em condições normais protege o organismo contra alérgenos potenciais – em um indivíduo adulto cerca de 80% das células secretoras de anticorpos encontram-se na mucosa intestinal – em algumas situações específicas os alérgenos ultrapassam esta barreira, via células M, interagem com o tecido linfóide nas placas de Peyer (PPs) e provocam uma resposta imunológica que normalmente não gera uma condição patológica (PEREIRA, 2008; SANZ, 2011). Em indivíduos predispostos, no entanto, sucessivas exposições ao alérgeno acabam por desenvolver resposta imunológica inapropriada com sintomas sistêmicos. Isto ocorre porque os alérgenos alimentares são moléculas estáveis, que resistem à temperatura (durante o processamento do alimento), ao pH e à digestão enzimática produzindo a sensibilização e posterior desencadeamento da alergia (FERNANDEZ-RIVAS *ET AL.*, 2003).

A maioria dos indivíduos em contato com esses antígenos não produz IgE específica nem desenvolve reações potencialmente lesivas, devido ao fato de a mucosa intestinal apresentar uma resposta imunológica caracterizada pela tolerância aos antígenos da dieta, denominada *tolerância oral*. Vários componentes imunológicos como a IgA e as células T reguladoras (FIGURA 2) e não imunológicos, como as enzimas digestivas e o muco produzido pelas células caliciformes, contribuem para evitar a sensibilização do indivíduo aos antígenos alimentares e constituem verdadeiras barreiras que controlam a sua absorção, impedindo que ocorra uma reação imunológica aos componentes da dieta (STROBEL E MOWAT, 2006; FARIA *ET AL.*, 2013). O muco que cobre o epitélio intestinal aprisiona partículas antigênicas que são expelidas pelos movimentos peristálticos, além de servir como reservatório de IgA secretória. As enzimas digestivas, secretadas desde a boca até o intestino grosso, também protegem o organismo de reações alérgicas, pois ao realizarem a quebra de grandes moléculas de proteínas em pequenos dipeptídeos e tripeptídeos reduzem substâncias

potencialmente imunogênicas a peptídeos não imunogênicos. A ação destas proteases juntamente com o efeito emulsificante dos sais biliares e atuação de enzimas que digerem carboidratos, formam um potente sistema que altera a exposição a antígenos (MAYER, 2003).

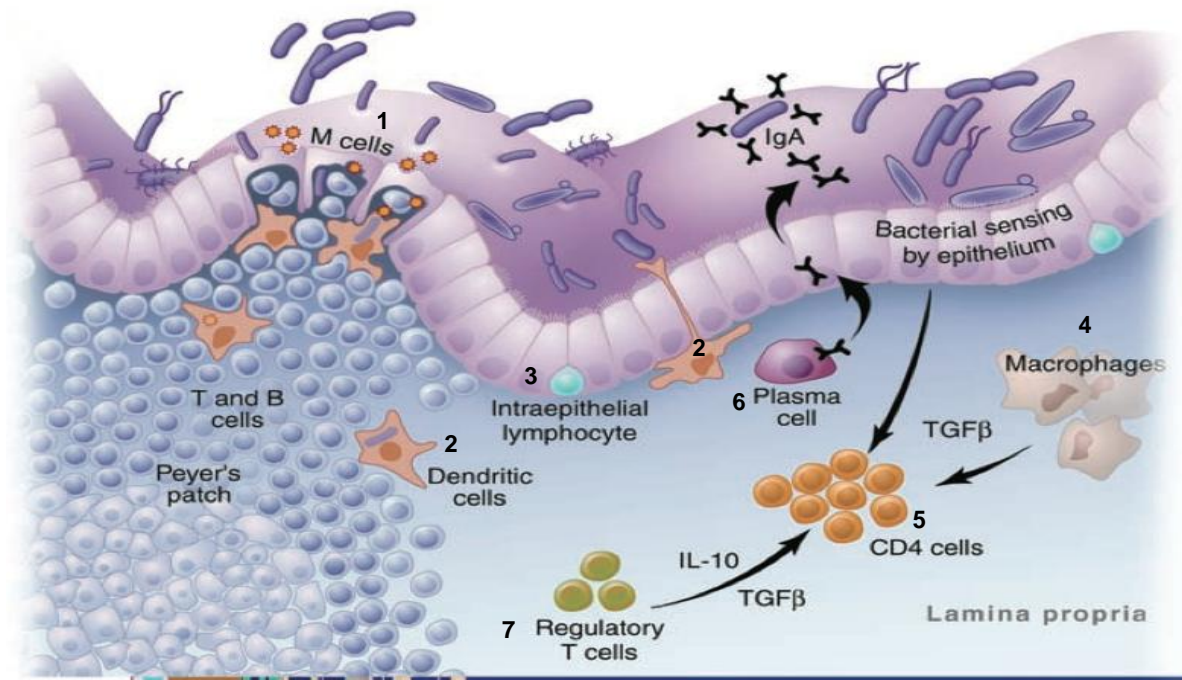


FIGURA 2 - O Ambiente imunológico intestinal. O intestino possui um sistema imune extenso e altamente ativo. O epitélio sobrejacente ao tecido linfóide associado ao intestino (GALT) contém células especializadas, células "M" (1), que constantemente transportam bactérias e antígenos do lúmen intestinal para o tecido linfóide. Células dendríticas (2) na lâmina própria alcançam as células epiteliais e também amostras de bactérias na luz intestinal. No epitélio encontram-se linfócitos T intraepiteliais tipo CD8⁺ (3) e a lâmina própria contém macrófagos (4), linfócitos T CD4 (5) e plasmócitos (6) produtores de anticorpos IgA. Processos inflamatórios mediados por linfócitos T podem ser inibidos pelas citocinas imunossupressoras (como IL10) e células T reguladoras (7). (Adaptado de MACDONALD E MONTELEONE, 2005).

Apesar de todos os mecanismos envolvidos na tolerância oral, as reações alérgicas podem se desenvolver em pessoas geneticamente susceptíveis ou quando a seletividade da mucosa intestinal é alterada. Entre os fatores indutores dessa patologia, podemos citar a imaturidade da mucosa intestinal em crianças, o uso prolongado de antiácidos e o estresse (EIGENMANN, 2002; UNTERSMAYR *ET AL.*, 2003; UNTERSMAYR E JENSEN-JAROLIM, 2008; VICARIO *ET AL.*, 2010).

Quando há alteração da regulação imunológica e não imunológica da mucosa digestiva, pode ocorrer absorção exacerbada de moléculas da dieta que

interagem com células apresentadoras de antígeno. Uma vez processadas por essas células, ocorre apresentação dos antígenos provenientes dessas moléculas para linfócitos T helper (Th). Essa fase inicial leva à proliferação dos linfócitos T e à síntese de citocinas que, por sua vez, promovem uma resposta característica de linfócitos Th2 (EIGENMANN, 2002). Sob a influência do ligante CD40 e das citocinas, principalmente IL-4, produzidas pelos linfócitos Th2, os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos secretores de IgE (BISCHOFF *ET AL.*, 1999). A IgE específica para o alérgeno produzida pelos plasmócitos entra na circulação e se liga aos receptores Fc nos mastócitos dos tecidos, de modo que essas células ficam sensibilizadas e prontas para degranular durante uma nova exposição ao alérgeno (NAUTA *ET AL.*, 2008). Quando o antígeno é novamente ingerido, passando por todas as barreiras fisiológicas e chegando à lâmina própria, o mesmo forma ligações cruzadas com várias moléculas de IgE (*crosslinking*) ligadas aos mastócitos. A ativação dos mastócitos sensibilizados resultará na degranulação e liberação do conteúdo pré-formado de seus grânulos (histamina e mediadores lipídicos) que causam a reação de hipersensibilidade, responsável pelos sintomas imediatos da alergia alimentar e a posterior liberação de citocinas que desencadeiam as reações chamadas de fase tardia (FIGURA 3). As principais alterações que ocorrem na fase aguda são a vasodilatação com extravasamento de plasma para os tecidos, constrição da musculatura lisa intestinal e infiltrado de neutrófilos no sítio inflamatório (STONE *ET AL.*, 2010). Tanto no trato respiratório como no digestivo, ocorre a produção de muco, sendo esse evento mediado principalmente pelas citocinas IL-4 e IL-13 (BLANCHARD *ET AL.*, 2004). No trato gastrointestinal, há desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando ao estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (STONE *ET AL.*, 2010).

A reação alérgica aguda é seguida por uma resposta de fase tardia que é causada pela liberação de leucotrienos, citocinas e quimiocinas pelos mastócitos ativados. Entre as citocinas liberadas pelos mastócitos na inflamação alérgica estão o TNF, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 entre outras. Esses mediadores recrutam outros leucócitos, incluindo eosinófilos e linfócitos Th2 para o local da inflamação (MINAI-FLEMINGER E LEVI-SCHAFFER, 2009). O TNF, em especial, ativa a expressão endotelial das moléculas de adesão responsáveis pelos infiltrados de células mononucleares e polimorfonucleares (KNEILLING E ROCKEN, 2009). As reações alérgicas alimentares dependentes de IgE podem afetar um ou mais órgãos: como a pele (dermatite atópica

e urticária), o trato respiratório (rinite e asma), o trato gastrointestinal (dor e diarreia) e o sistema cardiovascular (choque anafilático). A reação sistêmica mediada por IgE é denominada anafilaxia e é constituída por reações alérgicas severas e potencialmente fatais. Nessa forma sistêmica mais extrema das reações alérgicas, os mediadores derivados dos mastócitos podem desencadear a obstrução das vias aéreas até o ponto de asfixia e produzir um colapso cardiovascular que pode resultar em morte (TRIGGIANI *ET AL.*, 2008; SICHERER E SAMPSON, 2010).

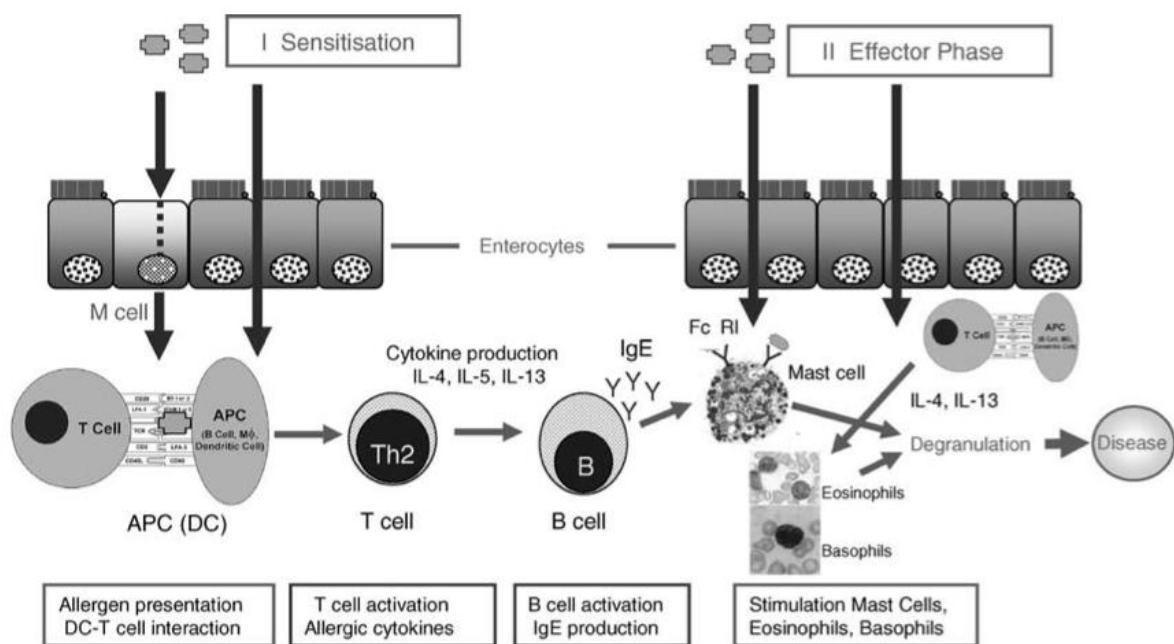


FIGURA 3: Imunopatogênese da alergia. Células M (M cell), células apresentadoras de antígeno (APC), linfócitos (T e B cell), mastócitos (mast cell), Imunoglobulina E (IgE), Interleucinas (IL). As APCs (células M, células dendríticas) entram em contato com os antígenos e os apresentam aos linfócitos T que são ativados e secretam citocinas que agem sobre as células B, que por sua vez secretam IgE específica para o antígeno, que se ligam à superfície dos mastócitos. Essa fase é chamada de sensibilização. Num segundo contato, a fase efetora, as imunoglobulinas da superfície dos mastócitos reconhecem o antígeno e provocam a degranulação liberando diversos compostos que irão desencadear a alergia. Adaptado de HERZ, 2008 (HERZ, 2008).

Devido ao aumento da prevalência e à perda da qualidade de vida de pacientes alérgicos, ocorre um esforço científico para a compreensão da imunopatogênese das desordens alérgicas. Nos últimos cinco anos, muitas proteínas alimentares potencialmente alergênicas foram caracterizadas a nível molecular, assim como as respostas imunológicas a estes antígenos. Mas, apesar disso muitos

mecanismos precisam ser esclarecidos para que um tratamento mais eficaz possa mudar o crescente aumento de casos (SAMPSON, 2004).

3.5. A relação entre alergia e obesidade

A obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de reações alérgicas (HERSOUG E LINNEBERG, 2007). Segundo Hancox *et al.* (HANCOX *ET AL.*, 2005), 28% dos casos de alergia das vias aéreas em indivíduos maiores de 9 anos tiveram correlação positiva com sobrepeso e obesidade. Vieira *et al.* (VIEIRA *ET AL.*, 2005) demonstraram que a frequência da positividade IgE específica em obesos era 3 vezes maior do que em não obesos. Visness *et al.* (2009) (VISNESS *ET AL.*, 2009) estudando os resultados do levantamento *National Health and Nutrition Examination Study* – o NHANES 2005-2006 – concluíram que a obesidade pode ser contribuidora para o aumento da prevalência de doenças alérgicas em crianças, particularmente a alergia alimentar e que a inflamação sistêmica pode estar desempenhando papel na patogênese da doença alérgica (NHANES, 1999-2012). Mai *et al.* (2004) relataram um aumento duas vezes maior nas concentrações de leptina em crianças com sobrepeso asmáticas do que nas crianças somente com sobrepeso (MAI *ET AL.*, 2004; LANG *ET AL.*, 2008). Estudo realizado com pacientes asmáticos submetidos à cirurgia bariátrica demonstrou que a perda de peso melhorou os sintomas da asma, independente dos níveis de IgE, modulando a ação das células T e o perfil de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a obesidade produz um fenótipo de asma único (DIXON *ET AL.*, 2011). Outras citocinas importantes no processo inflamatório também se encontram alteradas em indivíduos obesos alérgicos como a IL-6, o TNF e a eotaxina (DIXON *ET AL.*, 2006; LANG *ET AL.*, 2008)).

Outro indicativo de conexão entre o tecido adiposo e a resposta inflamatória é o fato de a maioria dos linfonodos serem envoltos por tecido adiposo. Após a ativação dos linfonodos por estímulo pró-inflamatório, ocorre aumento da lipólise nos depósitos lipídicos que circundam esses órgãos. Portanto, sugere-se que o tecido adiposo associado aos linfonodos representa importante fonte energética para as células do sistema imune (GAMBERO *ET AL.*, 2007).

DOURADO *et al.*, (2011) descreveram ainda a presença de um número elevado de mastócitos no tecido adiposo epididimal dos camundongos alérgicos (DOURADO *ET AL.*, 2011). Os mastócitos podem desempenhar papel fundamental na inflamação do tecido adiposo dos camundongos alérgicos, uma vez que estas células apresentam receptores FcεRI com alta afinidade para IgE, anticorpo encontrado em grandes concentrações no soro destes animais (SALDANHA *ET AL.*, 2004). É muito provável que a IgE se ligue aos mastócitos presentes no tecido adiposo dos animais alérgicos, levando à degranulação destas células que além de desencadear respostas alérgicas contribuirá para o desenvolvimento de respostas inflamatórias neste tecido. Vários mediadores liberados por mastócitos como o TNF, a IL-6 e a IL-10 se mostraram aumentadas no tecido adiposo dos animais alérgicos, indicando que este tecido se encontra inflamado durante o desafio antigênico, sinalizando que o processo inflamatório desencadeado no intestino pode afetar outros órgãos tendo, portanto, uma característica sistêmica (STONE *ET AL.*, 2010). Essas alterações sistêmicas aconteceram também nas vias metabólicas, uma vez que as análises bioquímicas revelaram diminuição das concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos não esterificados (DOURADO *ET AL.*, 2011).

Diante da associação entre a alergia e obesidade, demonstrada por estudos epidemiológicos, e tendo ambas as condições patológicas a característica de serem doenças crônicas e inflamatórias, nossa hipótese foi de que o aumento da adiposidade poderia exacerbar a resposta imunológica na alergia, devido à inflamação prévia no tecido adiposo, gerando uma inflamação sistêmica intensificada. Esse trabalho se propôs investigar, em modelo murino, as alterações metabólicas e imunológicas decorrentes da associação entre a alergia alimentar e a obesidade.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Camundongos da linhagem BALB/c machos, com quatro a cinco semanas de vida, provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – foram submetidos à vermifugação com solução de Ivermectina a 0,8%, por 7 dias, antes do início dos experimentos. Após este período, foram divididos em 4 grupos experimentais, mantidos em gaiolas de plástico com cinco animais, sendo o “n” total de 10 camundongos por grupo, em ambiente controlado, observando-se o ciclo de claro e escuro e recebendo água e ração “*ad libitum*” até o desafio antigênico. O tratamento dos animais foi conduzido no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR-UFMG).

A metodologia utilizada foi segundo Saldanha *et al.*(2004) e Oliveira *et al.* (2013) e foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (números de protocolo 060/2010 e 299/007) e todos os procedimentos de investigação seguiram os princípios de experimentação animal adotados por este comitê.

O delineamento experimental (Quadro 1) foi composto por 4 grupos: Controle (C) – que recebeu ração comercial (Labina®) e eram negativos para alergia (animais não sensibilizados); Alérgico (A) – que receberam ração comercial (Labina®) e eram controles positivos para alergia (animais sensibilizados com OVA); Dieta HC – que receberam dieta rica em carboidratos simples, dieta HC (do inglês *High carbohydrate*) e eram controles positivos para obesidade e negativos para alergia (não sensibilizados com OVA) e o grupo experimental obeso e alérgico (HCA) – que receberam dieta HC e eram sensibilizados com OVA; conforme representado na Figura 4. Todos os grupos receberam, na semana do desafio alérgico (semana 9), solução de água com ovalbumina a 20%.

Quadro 1 – Delineamento Experimental

Grupo	Dieta	Procedimento experimental
Controle (C)	Ração comercial Labina®	Não sensibilizados. Solução oral de Ovalbumina (OVA) a 20% na semana do desafio.
Alérgico (A)	Ração comercial Labina®	Sensibilização com OVA e desafio oral com solução de OVA a 20%.
Dieta HC (HC)	Ração HC	Não sensibilizados. Solução oral de OVA a 20% na semana do desafio.
Dieta HC alérgico (HCA)	Ração HC	Sensibilizados com (OVA) e desafio oral com solução de OVA a 20%.

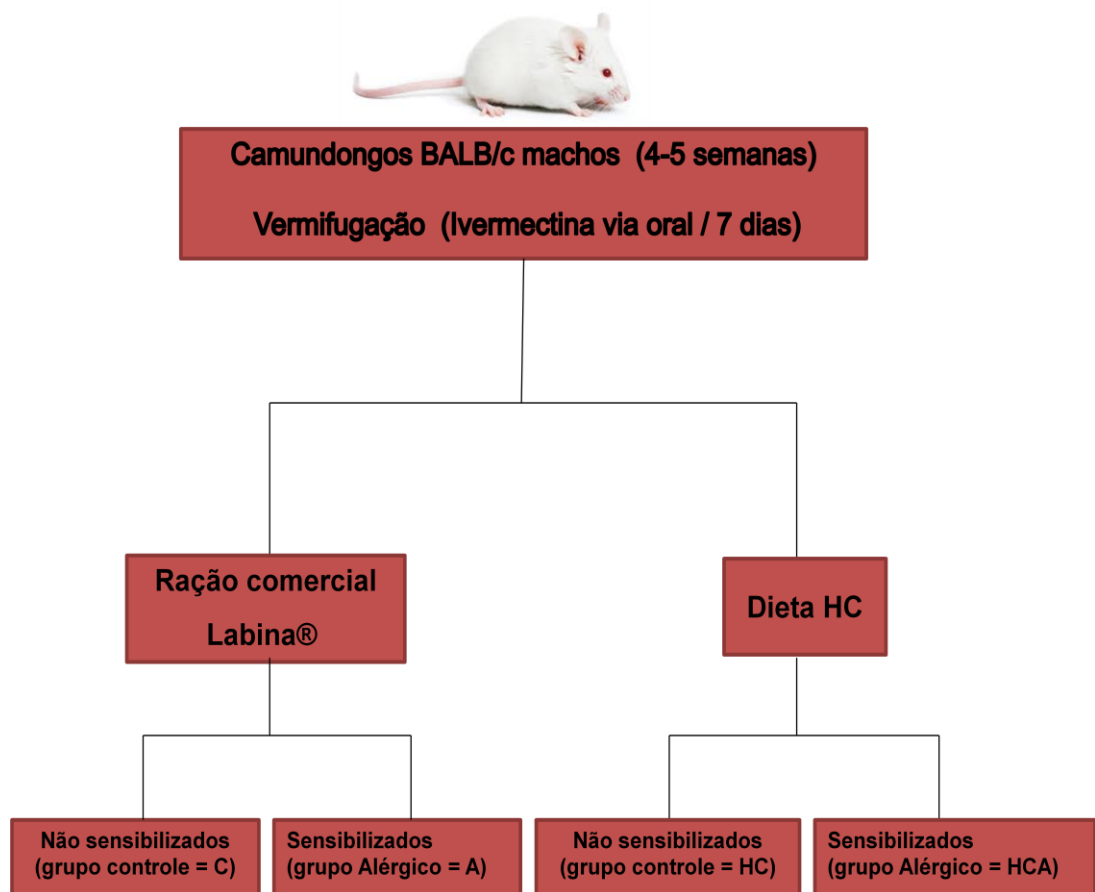


Figura 4 – Esquema de delineamento experimental com 4 grupos com 8 a 10 repetições (camundongos).

4.2 Indução do aumento de adiposidade

Para induzir ao aumento de adiposidade os animais dos grupos denominados HC e HCA receberam uma ração rica em carboidratos simples, denominada dieta HC (ANEXO 1) *ad libitum*, durante as nove semanas do experimento. As modificações na adiposidade e alterações metabólicas importantes neste modelo se estabelecem a partir da sexta semana de ingestão dessa dieta, conforme metodologia padronizada por OLIVEIRA et al. (2013). A Tabela 1 apresenta a distribuição de macronutrientes e minerais, assim como a porcentagem de quilocalorias provenientes da ração comercial (Labina®) e da dieta HC, obtidos através de análise bromatológica. Note-se que as dietas são isocalóricas e diferem entre si somente na distribuição dos macronutrientes, ou seja em sua composição química sendo a dieta HC hiperglicídica (OLIVEIRA ET AL., 2013).

Tabela 1 - Distribuição de macro e micronutrientes e densidade calórica (Kcal/g) da dieta comercial Labina® e dieta rica em carboidratos (HC).

Nutrientes	Dietas (%)	
	Dieta controle	Dieta rica em carboidrato (HC)
Proteínas	26,3	17,5
Lipídios	2,6	5,0
Carboidratos	55,6	64,8
Fibra bruta	6,2	4,1
Minerais	9,3	8,5
Energia (Kcal/g)	4,0	4,4

4.3 Sensibilização e desafio antigênico

O protocolo de sensibilização alérgica foi realizado segundo Saldanha *et al.* (2004) e está esquematizado na FIGURA 4 (SALDANHA ET AL., 2004). Para a indução da alergia alimentar, os camundongos dos grupos A e HCA foram injetados com 10µg de OVA (Ovalbumina, Grau V, Sigma Chemical Co., USA) adsorvida em 1mg de hidróxido de alumínio (EMS, Hortolândia, SP) e 0,2mL de salina estéril a 0,9% , enquanto que os grupos C e HC receberam apenas o adjuvante hidróxido de alumínio diluído em salina, por via a subcutânea, no dorso (na semana 5). Após quatorze dias da primeira dose de ovalbumina, os animais receberam um reforço da sensibilização (na semana 7) com 10µg de OVA diluída em salina fisiológica estéril. Os grupos C e HC receberam, no reforço, apenas salina fisiológica estéril.

A partir do sétimo dia após o reforço da sensibilização (semana 8), deu-se início ao desafio antigênico onde todos os grupos receberam uma solução de ovalbumina a 20% via oral, como única fonte de água. Após sete dias de ingestão de antígeno, os animais foram deixados em jejum por 8h e eutanasiados para coleta de sangue e tecidos.

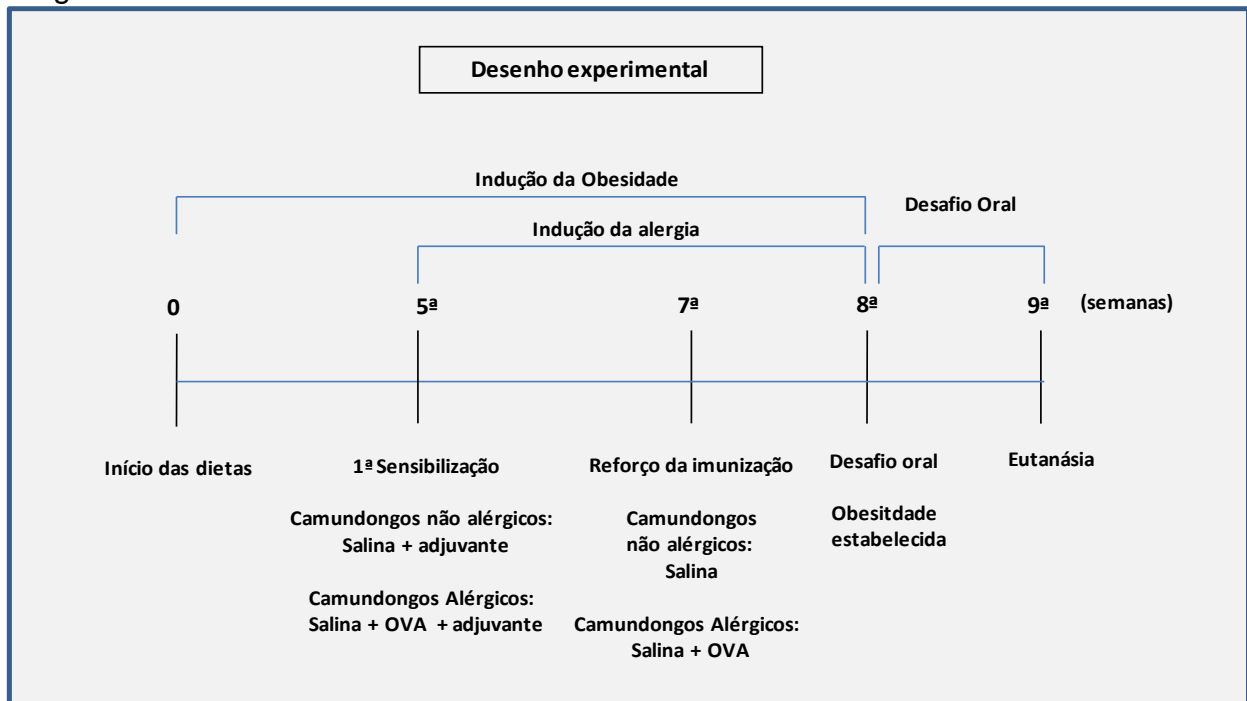


FIGURA 5 – Esquema dos procedimentos experimentais. Escala temporal semanal, onde semana 0: início das dietas em todos os grupos, semana 5: 1ª sensibilização ou imunização primária, semana 7: imunização secundária ou reforço, semana 8: início do desafio oral e semana 9: eutanásia.

4.4 Avaliações Clínicas

4.4.1 – Avaliação do consumo de ração

O consumo de ração foi monitorado através da medida da ingestão alimentar diária média (IA) e foi determinada pela seguinte equação:

$$IA = \frac{\text{peso (g) ração ofertada} - \text{peso (g) sobra de ração}}{\text{Número de animais/gaiola}}$$

O consumo de ração do grupo controle (C) foi adotado como padrão de consumo e considerado 100% e a ingestão percentual dos grupos experimentais foi então calculada a partir deste padrão.

4.4.2 – Avaliação do peso corporal

Cada animal foi pesado semanalmente, durante as 8 semanas de experimento. O delta de peso foi calculado pela diferença entre o peso semanal e o peso do animal antes do início das dietas experimentais. Na última semana – semana do desafio alergênico – o peso foi medido no primeiro e no sétimo dia do desafio e o delta de peso calculado pela diferença entre o peso inicial e peso final do desafio alergênico. A média de peso foi calculada pelo somatório dos pesos dos animais de cada grupo dividido pelo “n”.

4.4.3 – Avaliação da atividade da doença pelo escore DAI

Após o desafio antigênico, foi feito o acompanhamento diário dos sinais clínicos dos animais, através de um escore de atividade da doença denominado *escore DAI* (do inglês: *Disease Activity Index*), segundo metodologia padronizada por YU *et al.* (2004) e adaptada e por Dourado *et al.* (2011) (YU *ET AL.*, 2004; DOURADO *ET AL.*, 2011).

O escore do índice de atividade da doença avalia: a variação do peso corporal (% de perda de peso durante a semana do desafio antigênico), a consistência das fezes e a presença de sangue oculto nas mesmas. Estes três parâmetros são pontuados de acordo com a escala abaixo (TABELA 2), a média dos animais do grupo é então somada à média obtida na análise de sangue oculto nas fezes e ao % de perda de peso.

Tabela 2 - Índice de atividade da alergia alimentar induzida por ovalbumina Escore DAI

Índice	% perda de peso	Consistência das fezes	Sangue oculto nas fezes
0	Nenhuma	Normal	Ausência
1	1% a 5%	Normal	Ausência
2	6% a 10%	Amolecidas	Presença
4	>10%	Diarréicas	Presença

4.4.4 Avaliação do peso dos sítios adiposos

Os tecidos adiposos epididimal (TAE), mesentérico (TAM), retroperitoneal (WEYER *ET AL.*) e inguinal (TAI) foram retirados e pesados a fresco, em balança analítica Shimadzu® e os pesos relacionados ao peso corporal do animal. Parte do tecido foi coletada para análise histológica e o restante congelado em freezer a -80°C para análises posteriores.

4.5 Preparo das lâminas histológicas

Na nona semana de experimento, após sete dias de consumo voluntário da água contendo solução de ovalbumina, os animais foram anestesiados com 100 mg/Kg de quetamina e 10 mg/Kg de xilazina para retirada do sangue. Posteriormente, e sob anestesia, sofreram eutanásia através de deslocamento cervical, para coleta dos órgãos internos. Parte dos segmentos do intestino delgado (duodeno proximal) e tecidos adiposos foram retirados e fixados em formol tamponado a 10%, desidratados em soluções decrescentes de álcoois e incluídos em parafina. A partir desses blocos de parafina, cortes de 5 μm foram obtidos e após processo de desparafinar e hidratar, foram corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) ou com a coloração Ácido Periódico Schiff (PAS). As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico (Olympus Optical Co., Japan, B201) equipado com uma câmera digital (Moticam 2500, China). As imagens foram posteriormente analisadas com a utilização do software de morfometria ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) quando necessário.

4.6. Métodos de coloração H&E e PAS

Para a coloração H&E, os cortes foram mergulhados em Hematoxilina por 50 segundos e lavados em água corrente. Em seguida, foram mergulhados em Eosina por um minuto e meio e desidratados em série alcoólica crescente, diafanizados e montados. Para a avaliação do infiltrado intestinal de eosinófilos, foi realizada a contagem de células observando 10 campos aleatórios em um aumento de 40X e a média expressa em número de eosinófilos/campo.

Para a avaliação da presença de muco intestinal foi utilizado o método P.A.S (*Periodic Acid Schiff*). Nesse método, os cortes desparafinados, hidratados e banhados na solução de ácido periódico foram mergulhados no reativo de Schiff, até atingirem uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes foram evidenciadas em tom de rosa escuro. Nesse ponto, os cortes foram desidratados e diafanizados e as lâminas montadas. As imagens foram capturadas em microscópio em três campos aleatórios do

duodeno proximal em aumento de 10X para posterior análise no programa ImageJ[®]. Para a determinação do volume das células calciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em μm^2 PAS/campo.

4.7 Histologia do tecido adiposo epididimal

O tecido adiposo epididimal foi coletado durante a necropsia e fixado em formalina 10% durante vinte e quatro horas. Após a fixação, o tecido foi desidratado em álcool etílico absoluto, clarificado em xilol (VETEC, Duque de Caxias, RJ) e embebido em parafina. Foram realizados cortes de $5\mu\text{m}$ e corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (H&E) descrita acima

Para a medida da área dos adipócitos, lâminas histológicas do tecido adiposo epididimal coradas por H.E. foram fotografadas em microscópio em um aumento de 10X. A medida da área de 50 adipócitos por animal foi realizada através do software ImageJ.

4.8 Microscopia intravital do tecido adiposo epididimal

Para a realização da microscopia intravital, os camundongos foram anestesiados com solução de xilasina e quetamina em soro fisiológico estéril. O tecido adiposo epididimal ou mesentérico foi exposto para a análise das interações entre leucócitos e endotélio na microcirculação local. Os animais receberam então uma injeção intravenosa de 0,15mg/Kg do corante fluorescente rodamina 6G (Sigma Chemical Co., USA) para marcar as mitocôndrias dos leucócitos e emitir fluorescência.

A microcirculação foi então visualizada em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse, Japan) equipado com uma câmera (Nikon, Japan). Para as análises, foram escolhidas vênulas de calibre entre 40 e $60\mu\text{m}$. As imagens capturadas foram gravadas para análises posteriores.

Os leucócitos em rolamento foram analisados pela contagem do número de células que passavam pelo ponto determinado da vênula a cada 1 minuto e o resultado expresso em número de células rolando por minuto.

O leucócito foi considerado aderido se permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos, sendo a adesão leucocitária total quantificada como o número de células aderidas em 100 μ m de extensão da vênula.

4.9 Análises imunológicas e bioquímicas

4.9.1 Dosagem de IgE total

A dosagem de anticorpos totais de IgE foi feita através do teste de ELISA. Placas de 96 poços (Nunc Inc., Naperville, IL, USA) foram incubadas *overnight* (a 4°C), com anticorpo não marcado de rato anti-Ig de camundongo 1:250 μ L por poço, em tampão carbonato pH=9,6 (*Coating Buffer*). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas com salina contendo 0,05% de Tween 20 (solução salina tween) e incubadas, por uma hora, com 200 μ l/poço de solução de caseína a 25% em PBS (PBS-caseína) para bloqueio, à temperatura ambiente (TA). Após essa etapa a solução de bloqueio foi desprezada e as placas lavadas e incubadas por 2 horas com 50 μ l/poço dos soros a serem testados. Foi utilizada como padrão positivo IgE de camundongo purificada (Southern Biotechnology) e PBS como controle negativo da placa (branco). Em seguida, adicionou-se solução do anticorpo de rato anti-IgE de camundongo marcado com biotina (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram então incubadas com solução de estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology) durante uma hora à temperatura ambiente. Depois de outra lavagem, a reação imunoenzimática foi revelada incubando as placas em estufa a 37°C, ao abrigo da luz, com uma solução contendo 0,2 μ l/ml de H₂O₂ e 0,4 mg/ml de OPD em tampão citrato pH 5, até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escura. A reação foi interrompida pela adição de 20 μ l/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância (λ =492nm) de cada poço foi obtida no leitor de ELISA automático. Os resultados foram expressos graficamente como médias da

concentração de IgE no soro \pm erro padrão em unidades arbitrárias.

4.9.2 Dosagem de IgE anti-OVA

A dosagem de anticorpos IgE foi feita através do teste de ELISA. Placas de 96 poços foram incubadas *overnight* (a 4°C), com anticorpo não marcado de rato anti-Ig de camundongo 1:250 μ L por poço em tampão carbonato pH=9,6 (*Coating Buffer*). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas com salina contendo 0,05% de Tween 20 (solução salina tween) e incubadas, por uma hora, com 200 μ l/poço de solução de caseína a 25% em PBS (PBS-caseína) para bloqueio, à temperatura ambiente (TA). Após, a solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas, por 2 horas, com 50 μ l/poço dos soros a serem testados. As placas foram lavadas com Salina-Tween e incubadas, por 1 hora, a TA, com 50 μ l/poço de Ova-Biotinilada, diluída a 1:50 em PBS caseína. Foram novamente lavadas e incubadas, com o complexo Streptavidina-Peroxidase, 50 μ l/poço na concentração de 1 μ l de Streptavidina em 5 ml de PBS Caseína, por 45 minutos à TA. A placa foi lavada novamente e, para reação colorimétrica, foi utilizado 4 mg de ortofenileno-diamino (OPD), 2 μ l de H₂O₂, 10 ml Tampão Citrato (pH=5,0), no escuro, com 100 μ l/poço desta solução. Após 5-15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20/poço de H₂SO₄ 2N. A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA, a 490 nm. Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco).

4.9.3 Dosagem de IgG1 anti-ovalbumina (soro)

A dosagem foi feita através do teste de ELISA, que resumidamente segue a metodologia descrita a seguir: microplacas de poliestireno (Nunc Inc., Naperville, IL, USA) foram incubadas com OVA diluída em tampão carbonato. Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas e incubadas com solução de caseína a 25% em PBS. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas lavadas com salina contendo 0,05%

de Tween 20 (solução salina tween) e posteriormente incubadas com diluições seriadas dos soros a serem testados. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com solução contendo anticorpos de cabra anti-IgG1 de camundongo e posteriormente com tampão citrato contendo H_2O_2 e ortofenileno-diamino (OPD). Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 2%. A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA automático com filtro de 490nm. Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais sensibilizados), um controle negativo (*pool* de soros de animais controles), além de um controle da própria placa (branco).

4.10 Dosagem de citocinas no soro, tecido adiposo epididimal e duodeno proximal

Durante a necropsia, foram coletados o soro, os tecidos adiposos epididimal (TAE), retroperitoneal (WEYER *ET AL.*), inguinal (TAI) e mesentérico (TAM) e uma porção do intestino (duodeno proximal) e congelados em freezer a $-80^{\circ}C$ para análises posteriores, como descrito anteriormente. Fragmentos do TAM e TAE, bem como do intestino foram macerados em um homogeneizador (Omni International, USA) na presença de 1mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 - 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2,89g diluídos em 1litro). A solução resultante foi centrifugada por 10min a 10000 rpm a $4^{\circ}C$ e o infranadante recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA.

O ensaio imunoenzimático foi realizado de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante dos reagentes utilizados (R&D Systems, USA).

As concentrações de adiponectina, leptina, e resistina foram dosadas no soro enquanto que nos tecidos adiposo e intestinal foram medidas as concentrações de IL-10, TNF e IL-6. Para isso, placas de ELISA foram cobertas com anticorpos policlonais anti-resistina, anti-leptina, anti-adiponectina, anti-TNF, anti-IL-6 e anti-IL-10 (1-2 $\mu g/mL$), conforme instruções do fabricante, e incubadas a $4^{\circ}C$ por 24 horas. As

placas foram lavadas por três vezes e bloqueadas com albumina bovina 1% (Sigma Chemical Co., USA). A seguir as placas foram colocadas em um agitador horizontal durante 1 hora. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com alíquotas do soro diluídas nas proporções de 1:2 para leptina, 1:100 para resistina e 1:2000 de adiponectina, em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. Para o infranadante do tecido adiposo ou intestinal a diluição foi de 1:3 em PBS/albumina bovina a 1%, *overnigh*). Os anticorpos policlonais biotinilados foram usados com diluição de 1:1000 ou 1:2000. A detecção foi feita utilizando-se estreptavidina e OPD como substrato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 492nm.

4.11 Contagem total de leucócitos, células mononucleares e neutrófilos

Para contagem total de leucócitos, uma amostra de sangue foi diluída na proporção 1:10 em solução de Türk. O sangue foi obtido da cauda dos animais após um pequeno corte na ponta da mesma. A contagem total foi realizada em microscópio ótico (Olympus), usando câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada após aplicação da técnica de coloração com kit panóptico das lâminas com esfregaço sanguíneo.

4.12 Análise Estatística

Foram testados 4 tratamentos com 8 a 10 repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a diferença entre tratamentos, quando significativa, estudadas pela comparação de médias através do teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 4.

5 RESULTADOS

5.1 A dieta HC não agrava a alergia alimentar induzida por OVA, entretanto, promove alterações intestinais e clínicas.

Os camundongos sensibilizados (A e HCA) exibiram maiores concentrações séricas de IgE total (FIGURA 6A), IgE anti-ovalbumina (FIGURA. 6B) e IgG1 anti-ovalbumina (FIGURA 6C) em comparação com os respectivos grupos controles, C e HC. Os níveis séricos elevados de imunoglobulina do isotipo E confirmam que os camundongos sensibilizados ficaram alérgicos à proteína *ovalbumina*.

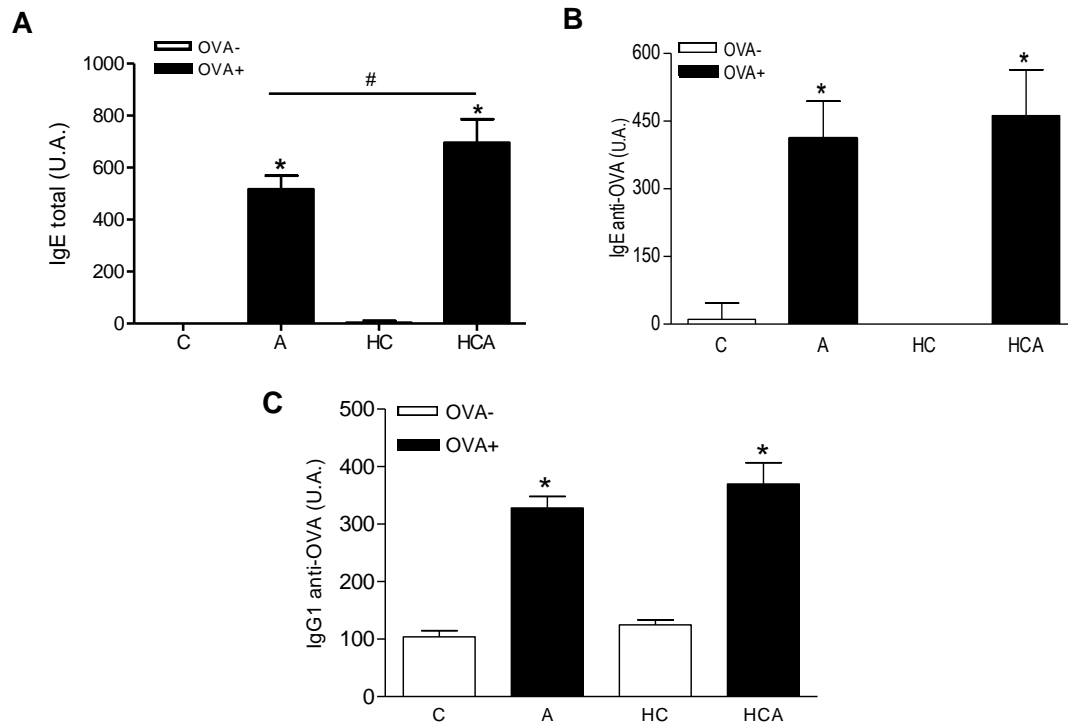


FIGURA 6 - Níveis séricos de IgE total, IgE anti-OVA e IgG1 anti-OVA. Onde (C) grupo controle, (A) grupo alérgico, (HC) grupo alimentado com dieta rica em carboidratos simples e (HCA) grupo alimentado com dieta rica em carboidrato simples e alérgicos. As barras representam a média em unidades arbitrárias (U.A.) (+/-SEM) e quando assinaladas com (*) indicam diferença estatística entre grupos com a mesma dieta (C X A ou HC X HCA) e com (#) indicam diferença entre obesos e não obesos (C X HC ou A X HCA) ($P < 0,05$). Barras vazias (OVA-) indicam animais não sensibilizados e barras cheias (OVA+) indicam animais sensibilizados com ovalbumina. Todos os grupos receberam ovalbumina na água (20%) ad libitum, na semana do desafio antigênico.

O ganho de peso corporal foi semelhante entre os grupos até o desafio alérgico. Após o desafio, apenas o grupo A apresentou perda de peso (FIGURA 7A).

Quanto aos parâmetros clínicos para alergia alimentar os camundongos do grupo A obtiveram um escore DAI mais elevado quando comparados ao grupo C. Curiosamente, os camundongos do grupo HC alcançaram maior pontuação no escore DAI se comparados ao grupo C, independente do estímulo alergênico. Os achados clínicos do grupo HC não se agravaram quando desafiados com OVA em relação aos animais alérgicos magros (FIGURA 7B). O fenômeno de aversão ao antígeno presente na água, já observado em animais alérgicos foi avaliado e os grupos A e HCA começaram a manifestar a aversão no quinto dia de desafio oral e continuaram até o final dos sete dias. Os camundongos do grupo HC também mostraram aversão à solução de ovalbumina (FIGURA 7C).

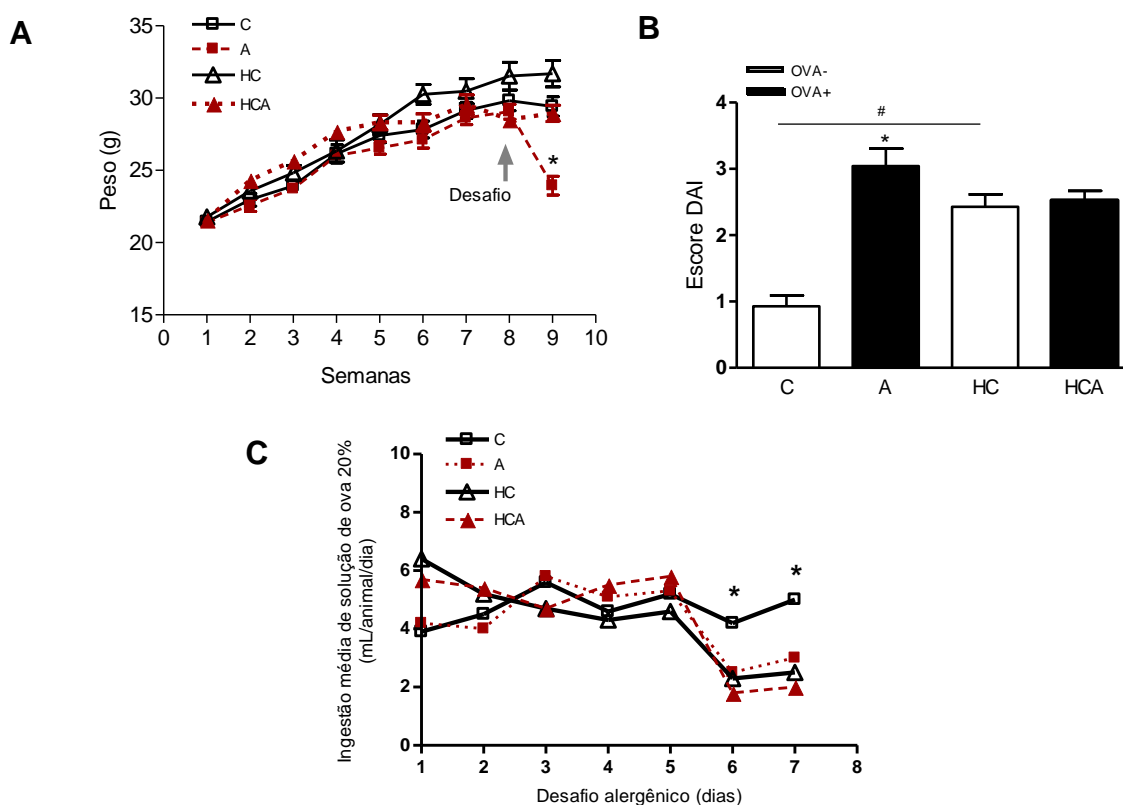


FIGURA 7 - Avaliação dos parâmetros clínicos: r. (A) Evolução ponderal semanal, sendo C controle, A alérgico, HC dieta rica em carboidrato simples (dieta HC) e HCA grupo em dieta HC e alérgicos. (B) Escore DAI na semana do desafio antigênico. (C) Média de ingestão de solução de OVA a 20% nos 7 dias de desafio.. Médias (+/-SEM) quando assinaladas com (*) indicam diferença estatística entre grupos com a mesma dieta (C X A ou HC X HCA) e com (#) indicam diferença entre obesos e não obesos (C X HC ou A X HCA) ($P < 0,05$). OVA- (barras vazias) indicam animais não sensibilizados e OVA+ (barras cheias) indicam animais sensibilizados com ovalbumina.

A avaliação do infiltrado eosinofílico intestinal por meio da contagem do número de células presentes na mucosa intestinal, revelou que a quantidade destes granulócitos foi duas vezes maior nos camundongos do grupo alérgico (A) em comparação com os camundongos controle (grupo C), como já descrito em nosso modelo de alergia alimentar experimental a OVA. Inesperadamente, os animais obesos e não alérgicos (grupo HC) exibiram um maior número de eosinófilos no duodeno quando comparados aos do grupo controle (C). No entanto, o grupo obeso e alérgico (HCA) não apresentou aumento de eosinófilos quando comparados ao grupo A e ainda foi semelhante ao grupo não alérgico HC (FIGURA 8).

Na análise morfométrica das lâminas coradas com a técnica de PAS, que evidencia o muco e as células caliciformes, observou-se que os camundongos alérgicos (grupo A) apresentaram aumento da quantidade de muco no lúmen intestinal, bem como aumento do número e tamanho das células caliciformes em comparação com os camundongos do grupo controle (C), como já observado em estudos anteriores com esse modelo. O grupo HC, apesar de não ser alérgico, também apresentou aumento do número de células PAS positivas quando comparado ao grupo C (FIGURA 8B e 8C).

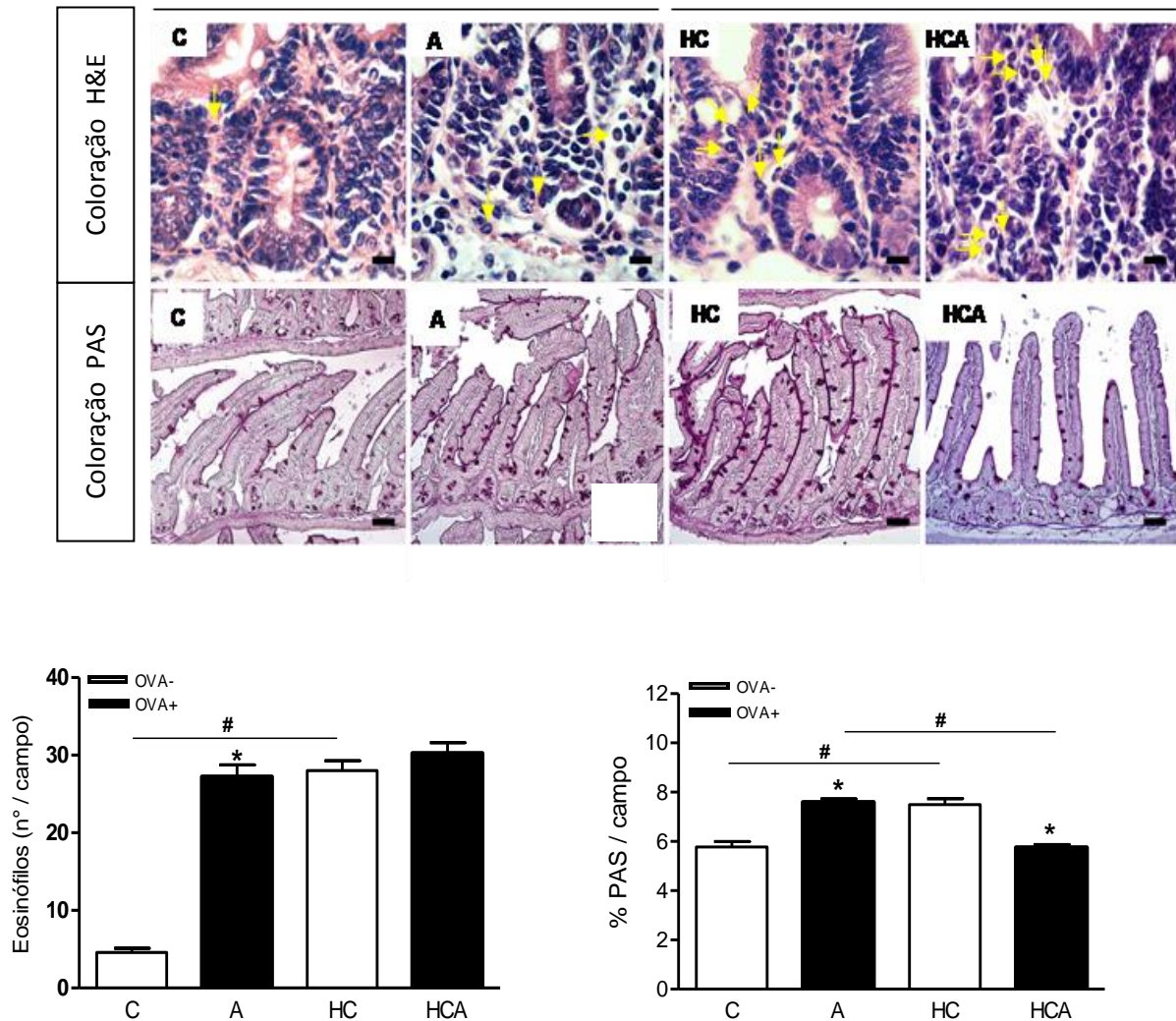


FIGURA 8 - Infiltrado de eosinófilos (setas amarelas) no duodeno proximal (imagens representativas). Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do duodeno proximal de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS (imagens representativas). (A e E) Controle, (B e F) Alérgico, (C e G) Dieta HC e (D e H). Dieta HC alérgicos. Para a contagem de eosinófilos os cortes foram corados em H&E e fotografados em microscópio óptico (Olympus) em aumento de 40X. Os eosinófilos foram contados em 10 campos diferentes de cada animal e os dados analisados com o programa estatístico GraphPad Prism 4. Para a análise do muco, as lâminas foram coradas pelo método de PAS e fotografadas em microscópio óptico (Olympus) em aumento de 10X em 3 campos aleatórios do duodeno proximal. As imagens foram avaliadas com o programa ImageJ e os dados analisados com o GraphPad Prism 4. As barras representam a média (+/-SEM) e quando assinalados com (*) indicam diferença estatística entre grupos com a mesma dieta (C x A ou HC x HCA) e com (#) indicam diferença entre obesos e não obesos (C x HC ou A x HCA) ($P < 0,05$). Barras cheias (OVA+) indicam animais sensibilizados e barras vazias (OVA-) animais não sensibilizados.

Para avaliar se o aumento do número de eosinófilos no duodeno dos camundongos alimentados com a dieta HC foi devido à ingestão de ovalbumina ou devido à sobrecarga de nutrientes, um experimento foi conduzido à parte, onde os animais eram alimentados com a ração comercial (Labina ®) ou dieta HC, porém sem sensibilização com OVA e sem ingestão de ovalbumina em água. Ao final do

experimento os intestinos (duodeno proximal) foram coletados e processados conforme metodologia já citada.

Os camundongos alimentados com a dieta HC apresentaram aumento no número de eosinófilos por campo quando comparados aos camundongos alimentados com ração comercial ($C = 5,18 \pm 0,4$ X $HC = 13,73 \pm 0,6$); no entanto, não houve diferença no número de células PAS-positivas ($C = 6,00 \pm 1,1$ X $HC = 6,47 \pm 0,6$) (FIGURA 9).

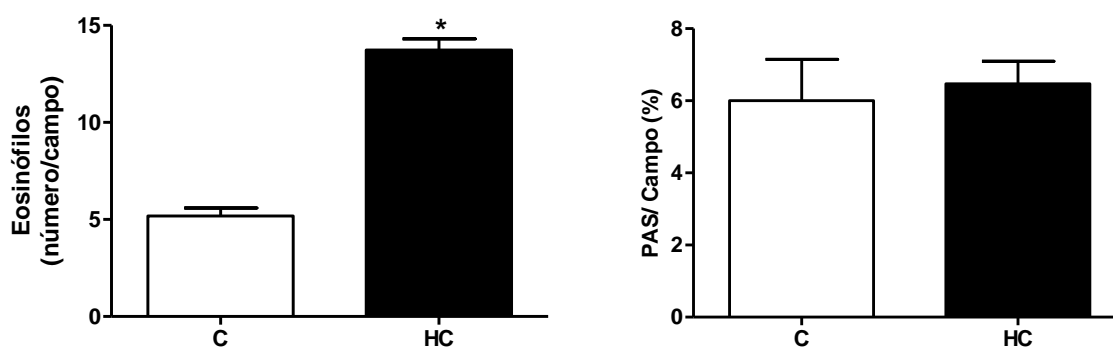


Figura 9: Infiltrado de eosinófilos intestinais de camundongos BALB/c alimentados com dieta HC ou ração comercial não sensibilizados e não desafiados com OVA. Cortes do duodeno proximal foram corados em H&E e fotografados em microscópio óptico (Olympus) em aumento de 40X. Os eosinófilos foram contados em 10 campos diferentes de cada animal e os dados analisados no programa estatístico GraphPad Prism 4. As barras representam a média (+/-SEM) sendo os animais controle C (barras vazias) e HC animais com dieta hiperglicídica (barras cheias). Médias assinaladas com (*) indicam diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0,05$).

5.2 O padrão de secreção de mediadores inflamatórios TNF e IL-6 e anti-inflamatório IL-10 no intestino são semelhantes, independentemente da dieta consumida.

Embora tenham sido encontradas importantes mudanças nos intestinos dos animais do grupo A e grupo HC, os níveis das citocinas da mucosa intestinal TNF- α , IL-6 e IL-10 não se alteraram significativamente (FIGURA 10).

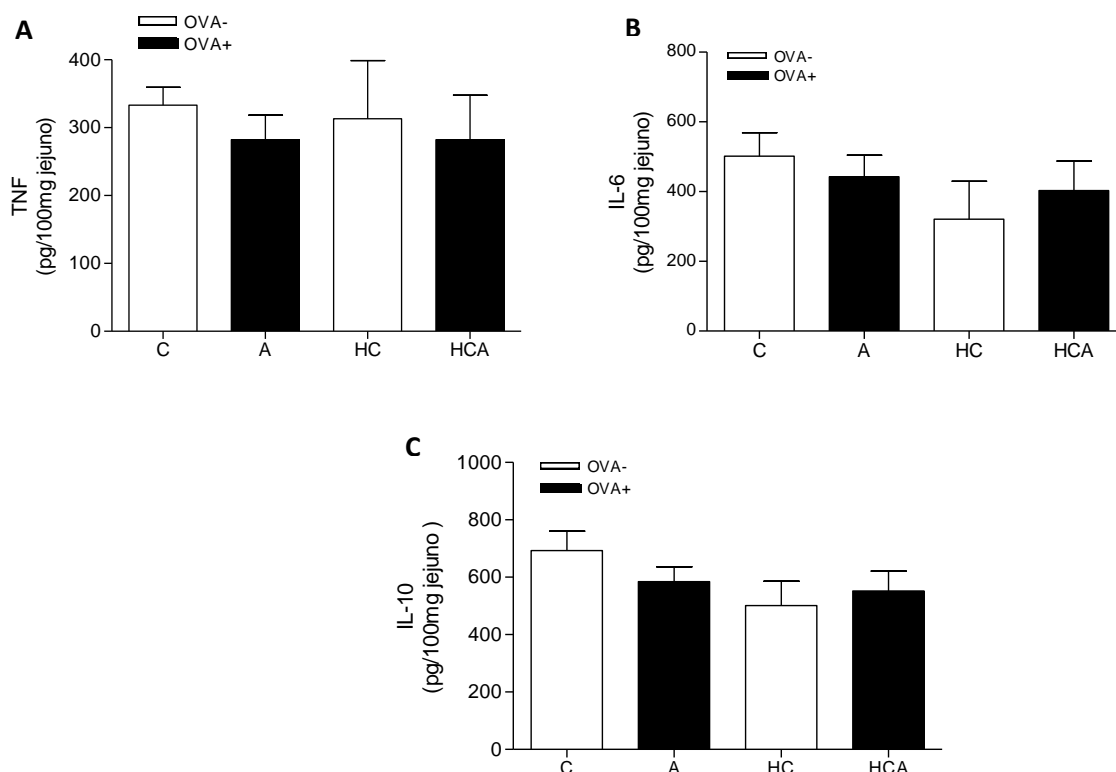


FIGURA 10 – Concentração de citocinas no duodeno proximal. As barras representam a média (\pm SEM) sendo C: controle, A: alérgico, HC: dieta hiperglicídica e HCA: alérgicos com dieta HC. TNF: Fator de necrose tumoral; IL: interleucinas. A dosagem das citocinas foi avaliada no sobrenadante do tecido intestinal homogeneizado, por meio de método de ELISA através de Kits de análise (R&D Systems, USA) conforme determinado pelo fabricante. Barras vazias (OVA-) indicam grupos não sensibilizados, barras cheias (OVA+) indicam animais sensibilizados, $n= 8$ ($P < 0,05$).

5.3 Camundongos com obesidade leve e alergia alimentar perdem massa gorda somente no sítio próximo ao foco de inflamação alérgica

Os camundongos do grupo A exibiram menor adiposidade em comparação com camundongos C alimentados com a mesma dieta (FIGURAS 11A - 11D). Animais alimentados com dieta HC apresentaram maior adiposidade que os alimentados com dieta controle. Em comparação com o grupo HC, os camundongos do grupo HCA apresentaram adiposidade inalterada na maioria dos tecidos (FIGURAS 11A, C e D), com exceção do tecido adiposo mesentérico que apresentou importante redução

(FIGURA 11B). Estes dados foram confirmados por meio de uma análise histológica do TAE e TAM (FIGURA 12).

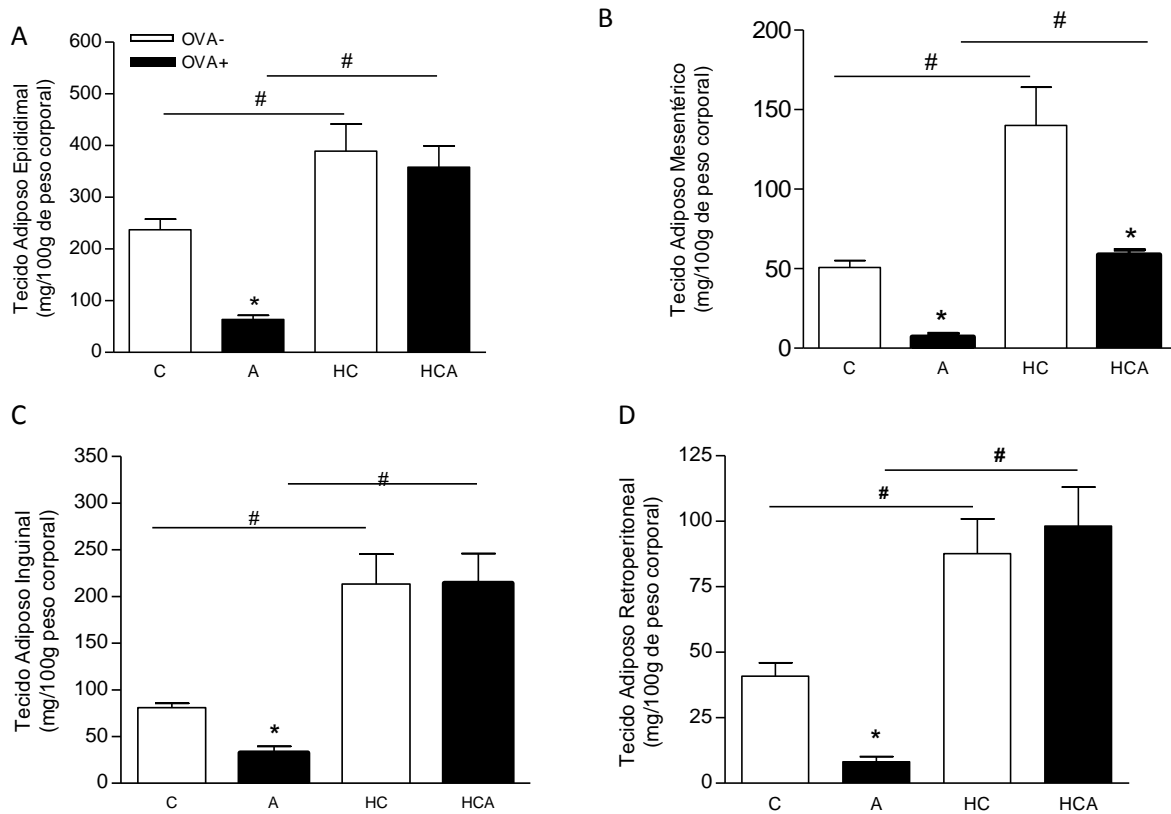


FIGURA 11 - Análise dos sítios adiposos. Os tecidos adiposos dos sítios (A) Tecido Adiposo Epididimal, (B) Tecido Adiposo Mesentérico, (C) Tecido Adiposo Inguinal e (D) Tecido Adiposo Retroperitoneal, foram retirados ao final do experimento e mensurados em balança analítica. As barras representam a média (+/-SEM) e quando assinalados com (*) indicam diferença estatística entre grupos com a mesma dieta (C x A ou HC x HCA) e com (#) indicam diferença entre obesos e não obesos (C x HC ou A x HCA) ($P < 0,05$). Barras cheias (OVA+) indicam animais sensibilizados e barras vazias (OVA-) animais não sensibilizados.

Os adipócitos do TAE de camundongos do grupo HCA mostraram área semelhante em comparação aos do grupo A, enquanto os adipócitos do TAM dos camundongos HCA apresentaram área menor (FIGURA 12 A e B).

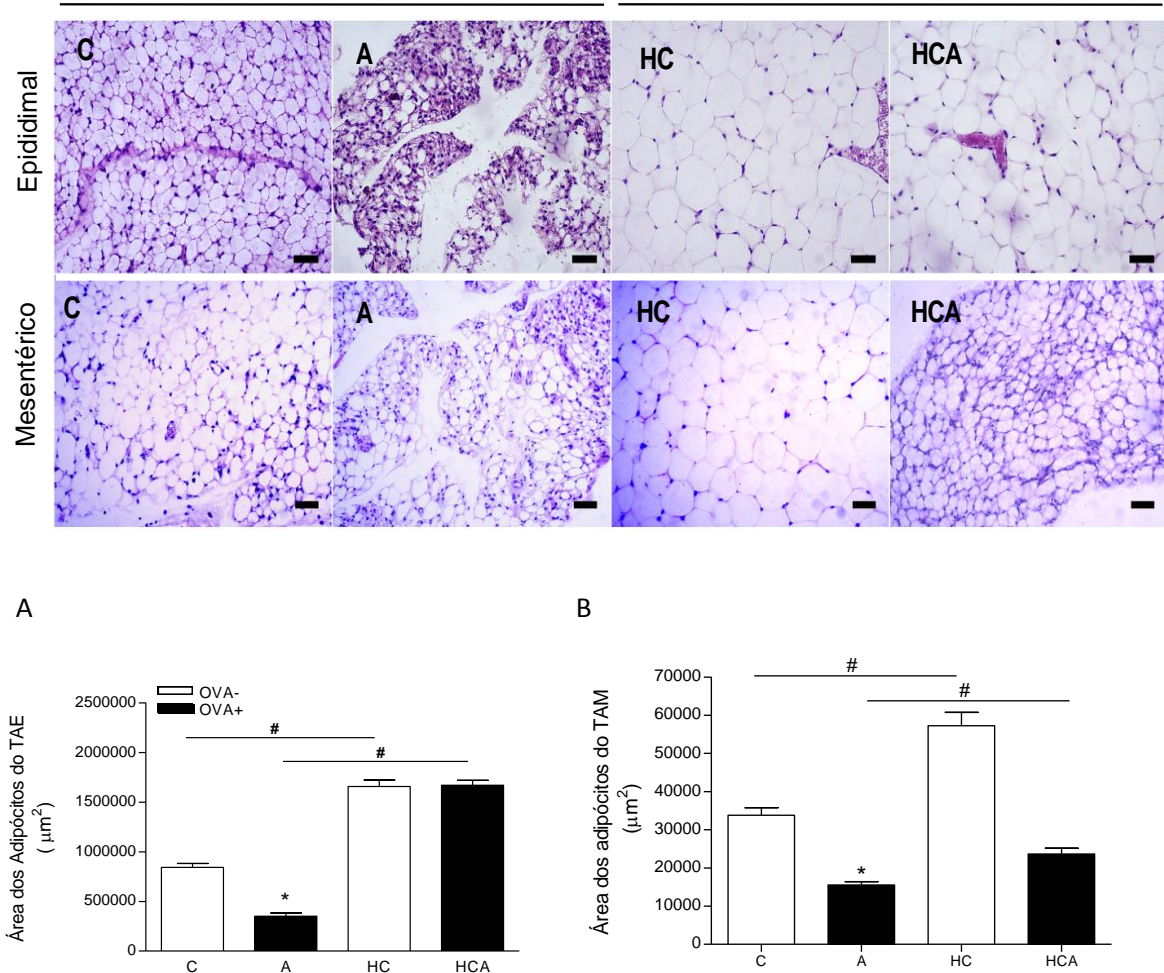


FIGURA 12 - Análises morfométrica e histológica do tecido adiposo epididimal (TAE) e mesentérico (TAM). As lâminas foram coradas com H&E e foram fotografadas em microscópio óptico (Olympus) em aumento de 10X. Barra no canto inferior direito = 50µm (imagens representativas). As medidas dos adipócitos foram obtidas pelo cálculo da área de circunferência de 50 células de cada animal, pelo programa ImageJ, e analisadas no programa GraphPad Prism 4. As colunas representam a média (+/-SEM) e quando assinalados com (*) indicam diferença estatística entre grupos com a mesma dieta (C x A ou HC x HCA) e com (#) indicam diferença entre obesos e não obesos (C x HC ou A x HCA) (P<0,05). Barras cheias (OVA+) indicam animais sensibilizados e barras vazias (OVA-) animais não sensibilizados.

5.4 Os tecidos adiposos de camundongos alérgicos ou com obesidade leve não alérgicos e alérgicos se encontram inflamados.

Para avaliar a ocorrência de estímulo inflamatório no tecido adiposo foi realizada microscopia intravital no TAE e no TAM que evidencia o recrutamento de células do sistema imunológico (leucócitos) para o tecido adiposo. Os camundongos do

grupo alérgico (A) apresentaram maior número de células rolando e maior adesão de leucócitos tanto nos tecidos adiposos epididimal quanto no mesentérico quando comparados aos camundongos do grupo controle (C) (FIGURA 13A - 13D). Os camundongos do grupo obeso e alérgico (HCA) exibiram maior rolamento de leucócitos do que o grupo obeso (HC) no tecido adiposo epididimal; entretanto, não houve alteração na adesão de leucócitos neste tecido quando comparados aos seus controles alérgico (A) e obesos (HC) (FIGURA 13A e 13B). O número de células rolando no tecido adiposo mesentérico dos camundongos HCA foi menor do que seus controles alérgico (A) e obesos (HC), mas o número de células aderidas na parede dos vasos foi similar nestes três grupos (FIGURAS 13C e 13D).

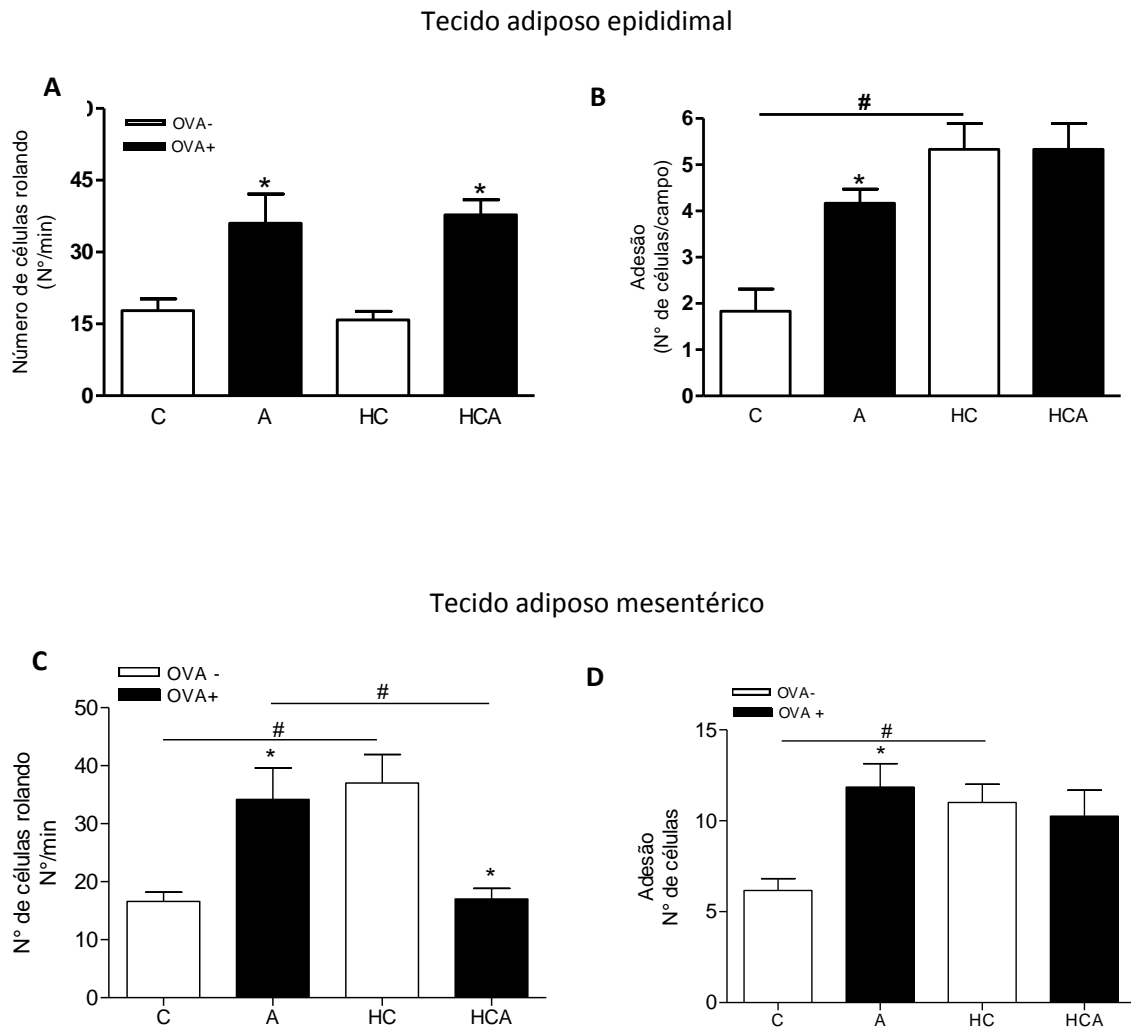


FIGURA 13 – Rolamento e adesão de leucócitos no TAE e TAM. Os leucócitos em rolamento (**A e C**) foram avaliados contando-se o número de células que passavam por um determinado ponto da vênula por minuto. (**B e D**) Adesão de leucócitos na parede do vaso. O leucócito foi considerado aderido se permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos, sendo a adesão leucocitária total quantificada como o número de células aderidas em 100 μ m de extensão da vênula. As barras representam a média (+/-SEM) e quando assinalados com (*) indicam diferença estatística entre grupos com a mesma dieta (C x A ou HC x HCA) e com (#) indicam diferença entre obesos e não obesos (C x HC ou A x HCA) (P<0,05). Barras cheias (OVA+) indicam animais sensibilizados e barras vazias (OVA-) animais não sensibilizados.

Analizamos também a concentração das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 tanto no TAE quanto no TAM dos animais alérgicos alimentados com ração comercial ou HC. Não foram observadas diferenças na concentração destas citocinas no TAE (FIGURA 14A). Em contraste, os níveis de IL-6 e IL-10 no TAM de camundongos alérgicos alimentados com a dieta HC foram superiores aos encontrados nos camundongos alérgicos alimentados com a ração comercial (FIGURA 14B).

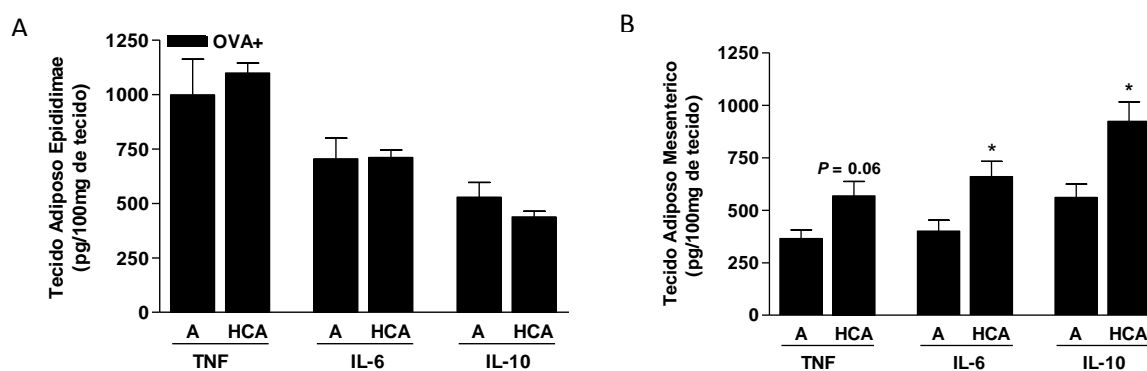


FIGURA 14 - Concentração de citocinas nos tecidos adiposos epididimal (TAE) e mesentérico (TAM) de animais alérgicos (OVA+). Sendo A: grupo alérgico com dieta comercial e HCA: grupo alérgico com dieta HC (rica em carboidratos simples). A dosagem das citocinas foi avaliada no sobrenadante do tecido adiposo homogeneizado, por meio de método de ELISA através de Kits de análise (R&D Systems, USA) conforme determinado pelo fabricante Barras representam a média (+/-SEM) e quando assinaladas com (*) indicam diferença estatística em relação ao controle alérgico (P<0,05).

Para avaliar a inflamação sistêmica, foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos circulantes. Os animais controle apresentaram o menor número células totais circulantes quando comparado aos demais grupos que apresentaram valores quase três vezes maiores (P<0,05) (FIGURA 15, A). Esse aumento foi devido principalmente ao número de células mononucleares (principalmente monócitos e linfócitos) que representaram 70 a 80 % do total de leucócitos (FIGURA 15, C).

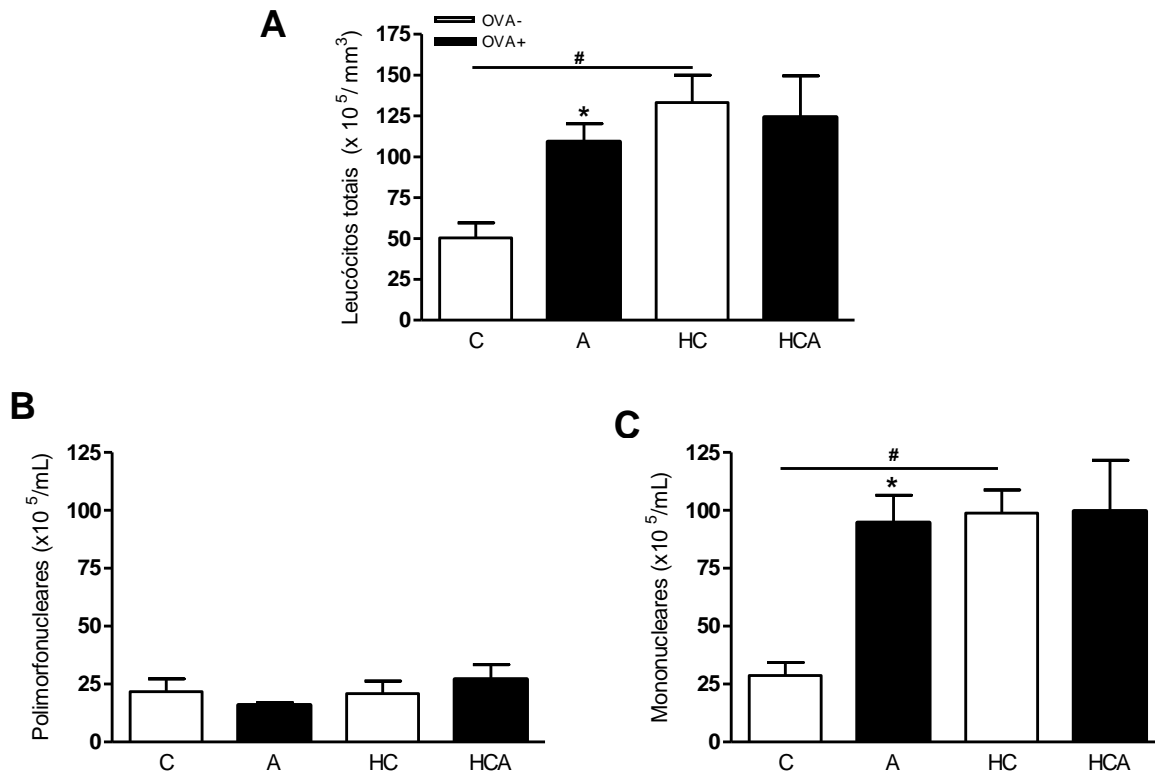


FIGURA 15 - Contagem de leucócitos circulantes. 10 μ L de sangue foram coletados da cauda dos animais e diluído na proporção de 1:10 em solução de Türk. A contagem total (**A**) foi realizada em microscópio ótico (Olympus), usando câmara de Neubauer. A contagem diferencial (**B e C**) foi realizada após aplicação da técnica de coloração com kit Panóptico nas lâminas com o esfregaço sanguíneo e contadas 100 células, ao microscópio ótico em aumento de 100X com óleo de imersão. Médias assinaladas com (*) indicam diferença estatística entre grupos com a mesma dieta (C x A ou HC x HCA) e com (#) indicam diferença entre obesos e não obesos (C x HC ou A x HCA) ($P < 0,05$). Barras cheias (OVA+) indicam animais sensibilizados e barras vazias (OVA-) animais não sensibilizados. (n= 8 – 10).

Os animais alimentados com dieta HC apresentaram aumento da concentração sérica de triglicérides, colesterol e glicose, além de maior intolerância à glicose se comparados aos controles (C). Por outro lado, os animais alérgicos apresentaram menores concentrações de colesterol e glicose quando comparados aos animais controles. Embora a alergia ou a obesidade modifiquem o perfil metabólico de

camundongos isoladamente, os animais do grupo HCA não apresentaram disfunção metabólica diferente da observada nos animais do grupo HC (Tabela 3)

Quanto as adipocinas séricas, a concentração de resistina e adiponectina foi semelhante entre os grupos avaliados. Já para a leptina, o grupo HCA apresentou concentrações elevadas quando comparadas aos animais tanto do grupo A quanto do grupo HC, sendo mais de duas vezes maior que nestes controles (Tabela 3).

TABELA 3 - Análises séricas em camundongos alérgicos e não alérgicos alimentados com dieta comercial padrão ou com dieta rica em carboidratos simples (HC).

Dosagens	Dieta comercial		Dieta HC	
	C	A	HC	HCA
Triglicérides (mg/dL)	48,6 ± 5,2	68,7 ± 2,83	84,0 ± 12,1 [#]	88,6 ± 13,5
Colesterol total (mg/dL)	81,3 ± 3,9	67,4 ± 4,82 [*]	99,7 ± 3,9 [#]	92,0 ± 2,1
Glicose sérica (mg/dL)	188,3 ± 18,2	139,1 ± 4,2 [*]	228,0 ± 13,9 [#]	258,6 ± 15,1 [#]
Área sob a curva (TTOG)	14054 ± 300	12253 ± 1617	17112 ± 372,5 [#]	16742 ± 886 [#]
Adiponectina (µg/mL)	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,07 ± 0,04	1,06 ± 0,04
Resistina (ng/mL)	246,1 ± 34,8	341 ± 47,4	314,2 ± 17,72	365,4 ± 13,14
Leptina (pg/mL)	567,6 ± 56,6	424,4 ± 12,1	964,8 ± 96,7 [#]	1260 ± 59,9 ^{* #}

Os dados representam a média ± SEM de 8 camundongos por grupo.

(*) $P < 0.05$ comparação entre animais com a mesma dieta (CxA ou HCxHCA) ;

(#) $P < 0.05$ entre animais obesos e não obesos (CxHC ou AxHCA) .

6 DISCUSSÃO

Doenças tais como a alergia e a obesidade podem induzir a disfunção metabólica e inflamação no tecido adiposo (MATSUZAWA-NAGATA *ET AL.*, 2008; DOURADO *ET AL.*, 2011; LEE *ET AL.*, 2011; OLIVEIRA *ET AL.*, 2013). No entanto, ainda não se sabe com clareza como e se a inflamação crônica de baixa intensidade, promovida pela obesidade, pode interferir na resposta alérgica. Em 2007, Hersoug e Linneberg propuseram um mecanismo para essa associação, baseados em evidências epidemiológicas que mostravam uma forte relação entre o índice de massa corporal elevado e atopia em humanos (TANTISIRA *ET AL.*, 2003; HANCOX *ET AL.*, 2005; WICKENS *ET AL.*, 2005). Nesta hipótese eles sugeriam que a obesidade poderia promover alterações tais que resultariam em diminuição da tolerância imunológica aos antígenos, tornando esses indivíduos mais suscetíveis às doenças imunomediadas, consequência da ação das citocinas secretadas pelo tecido adiposo como a leptina, TNF e IL-6 (HERSOUG E LINNEBERG, 2007).

Atualmente, pesquisas têm sido realizadas também em modelos murinos, em um esforço da comunidade científica para esclarecer essa relação entre obesidade e reações de hipersensibilidade imediata (MITO *ET AL.*, 2002; DE VRIES *ET AL.*, 2009; CALIXTO *ET AL.*, 2010; DIETZE *ET AL.*, 2012). Modelos animais são imprescindíveis para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos tanto na obesidade quanto na alergia, assim como as interações entre os sistemas imune e metabólico. Nesse sentido, este trabalho investigou essas interações utilizando um modelo de alergia alimentar à ovalbumina associado ao consumo de uma dieta rica em carboidratos simples, que induz ao aumento de adiposidade abdominal e síndrome metabólica. Os modelos foram previamente estudados, de forma isolada, pelo nosso grupo de pesquisa (SALDANHA *ET AL.*, 2004; OLIVEIRA *ET AL.*, 2013). Os principais resultados encontrados neste estudo podem ser resumidos como se segue: (i) o consumo de dieta rica em carboidratos induziu obesidade de intensidade leve e inflamação do tecido adiposo em camundongos sensibilizados com OVA. A alergia alimentar foi desenvolvida e atestada imunologicamente por meio da avaliação do aumento da concentração de IgE total e IgE e IgG1 específicas ao antígeno; pelas manifestações clínicas e sintomas da alergia alimentar: diarreia, sangue oculto nas fezes e desenvolvimento do fenômeno de

aversão ao antígeno e ainda por meio das análises histológicas e morfométricas onde observou-se o aumento do número de eosinófilos e de células-PAS positivas na mucosa do intestino. (MORO *ET AL.*) A dieta HC não exacerbou os parâmetros de alergia alimentar em camundongos BALB/c machos. Na verdade, a perda de peso e de gordura abdominal após a exposição ao antígeno foram atenuadas nestes animais, sendo que a perda de massa adiposa ocorreu apenas no sítio adiposo mesentérico. (iii) A localização da camada de gordura (TAM) próxima ao intestino, foco da alergia, pode ser relacionada a uma inflamação mais intensa desse tecido e a uma maior susceptibilidade para perder gordura, devido ao elevado gasto calórico durante processo inflamatório e a associação ao tecido linfóide mesentérico. (iv) A alergia alimentar não modificou o perfil metabólico dos camundongos com obesidade de grau leve, indicando que apesar do quadro catabólico promovido pela alergia, esses animais continuaram com concentrações séricas elevadas de glicose, triglicérides e colesterol total.

O principal marcador para a maioria das reações de hipersensibilidade imediata conhecida como alergia ou atopia, é o aumento na produção de imunoglobulina isotipo E (IgE) (ISHIZAKA E ISHIZAKA, 1978). Numa primeira fase, chamada de indutora, ocorre a sensibilização alérgica onde o contato com o antígeno mobilizam células do sistema imunológico que levam a ativação dos linfócitos B e produção de IgE, que por sua vez é lançada na corrente sanguínea e se liga com alta afinidade aos receptores presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, sensibilizando-os (STONE *ET AL.*, 2010). A partir dessa sensibilização, uma nova exposição ao antígeno inicia a fase efetora, onde os mastócitos sensibilizados com IgE ligam-se ao antígeno através de ligações cruzadas (*crosslinking*) e se degranulam, liberando histamina, prostaglandinas e outros mediadores lipídicos que vão desencadear o processo alérgico. Neste estudo observou-se que a ingestão oral do antígeno aumentou caracteristicamente as concentrações de IgE total e de IgE e IgG1 anti-ovalbumina nos camundongos sensibilizados, independentemente da composição da dieta consumida. Apesar dos animais com obesidade de grau leve terem ficado alérgicos a OVA, os dados sugerem que a dieta HC não causou aumento nos níveis de produção das imunoglobulinas e que, portanto, não houve exacerbação da resposta alérgica de caráter imunológico. Estudos em modelo de asma alérgica onde os camundongos eram alimentados com uma dieta rica em gordura para indução de

obesidade (dieta *high fat* - HF) descreveram aumento das concentrações de IgE e IgG específicas quando comparados aos animais com ração comum (MITO *ET AL.*, 2002; DE VRIES *ET AL.*, 2009; CALIXTO *ET AL.*, 2010). Wang et al., (2009) também demonstraram que a administração de OVA associada a lipídeos de cadeia longa (LCT) foi capaz de afetar a resposta imunológica aos antígenos, modulando positivamente a sua absorção e transporte durante a formação dos quilomicrons, aumentando sua excreção na via linfática pelas células epiteliais intestinais (WANG *ET AL.*, 2009). Essa associação entre os lipídeos da dieta e proteínas alergênicas poderia explicar a resposta imunológica intensificada nos modelos que utilizam a dieta HF, o que não ocorreu no nosso modelo com a dieta HC, onde os animais não apresentaram aumento na concentração sérica de imunoglobulinas após desafio antigênico, diferentemente dos camundongos alimentados com dieta rica em gordura. Sugere-se aqui que a composição da dieta possa influenciar a absorção de antígenos e, conseqüentemente, modular a resposta alergênica. Estes achados nos levam a hipotetizar que a composição da dieta de indivíduos obesos, que têm manifestado cada vez mais reações de hipersensibilidade, pode ser uma das chaves que favoreçam o aumento dos casos desta patologia e não somente a adiposidade e a inflamação crônica de baixa intensidade, como proposto em outros estudos (MITO *ET AL.*, 2002; DE VRIES *ET AL.*, 2009; CALIXTO *ET AL.*, 2010; DIETZE *ET AL.*, 2012).

Além da avaliação da concentração de IgE e de IgG, os sinais clínicos são igualmente importantes para diagnosticar a alergia alimentar como diarreia, presença de sangue oculto nas fezes e perda de peso corporal. Tais sintomas foram utilizados na criação de um escore que pontua o índice de atividade da doença, denominado escore DAI (YU *ET AL.*, 2004). A pontuação DAI combina três manifestações observadas na alergia alimentar: (i) a perda de peso após o desafio, (MORO *ET AL.*) a ocorrência de diarreia e sua intensidade e (iii) a presença de sangue oculto nas fezes. Camundongos alérgicos apresentam pontuação elevada no escore DAI e aversão ao antígeno presente na dieta. Essas alterações foram observadas nos animais alérgicos dos grupos A e HCA, independentemente da composição da dieta. Sabe-se que as manifestações de alergia alimentar, por si só já promovem alterações intestinais como descamação da mucosa e relaxamento das junções intercelulares, que levam a um aumento da permeabilidade a macromoléculas (STONE *ET AL.*, 2010). A entrada de macromoléculas como a proteína ovalbumina, agrava ainda mais a reação alérgica,

aumentando a liberação de histamina e mediadores lipídicos que promovem o aumento da permeabilidade vascular gerando desequilíbrio eletrolítico, com perda de íons e água, levando à diarreia (ABBAS, 2008). Curiosamente, os camundongos obesos não alérgicos (grupo HC) também mostraram escore DAI elevado. Apesar de os camundongos obesos do grupo HC não apresentarem perda de peso, a pontuação DAI foi similar aos camundongos alérgicos. Além disso, os camundongos com obesidade leve também manifestaram aversão alimentar à OVA. A aversão alimentar é um fenômeno que vem sendo estudado e já foi demonstrado estar fortemente ligada ao aumento nos níveis séricos de IgE, ao desconforto intestinal gerado pela diarreia e sangramento e foi relacionada ainda ao aumento dos níveis de IL-4 e IgG1 (CARA ET AL., 1994; DOURADO ET AL., 2010). Ambos os grupos alérgicos apresentaram níveis de IgE e IgG1 aumentados assim como o escore DAI, o que justifica essa aversão ao antígeno presente na água. Mas, no caso dos animais obesos do grupo HC essas concentrações elevadas de IgE sanguínea não justificariam a aversão observada, uma vez que essas imunoglobulinas não foram detectáveis no soro destes animais e, portanto, a aversão neste caso não parece estar associada a um componente imunológico. Estudos prévios mostram que animais IL-4^{-/-} submetidos ao protocolo de sensibilização com a ovalbumina, não apresentaram aversão a OVA em solução aquosa adocicada, porém, quando estes camundongos recebiam o soro de animais selvagens sensibilizados, a aversão era restaurada (DOURADO ET AL., 2010), este achado mostra que concentrações elevadas de IL-4 interferem positivamente na geração desse fenômeno. Análises realizadas no modelo de obesidade com dieta HC demonstraram aumento na concentração de IL-4 (dados ainda não publicados). Esse dado poderia ajudar a explicar o fato dos animais do grupo HC também rejeitarem a água com ovalbumina. Outro fator que pode ajudar a explicar porque os grupos alérgicos e grupo HC apresentaram essa aversão é o componente neurológico. Estudos mostram que o desconforto intestinal promovido pela inflamação alérgica faz com que os animais passem instintivamente a rejeitar o antígeno, como senso de auto-preservação diante de uma ameaça a sua integridade (GARCIA ET AL., 1985; PACHECO-LOPEZ E BERMUDEZ-RATTONI, 2011). A decisão de evitar a água contendo ovalbumina parece ter sido uma resposta adaptativa resultante do estímulo negativo sobre a mucosa intestinal provavelmente, devido ao desconforto provocado pela diarreia e pelo sangramento.

Outra manifestação característica da alergia analisada foi a produção de muco pelas células caliciformes intestinais. O aumento do muco promovido pelas células caliciformes intestinais é resultante da ação da histamina liberada pelos mastócitos ativados, sobre essas células da mucosa. Apesar dos animais do grupo HCA apresentarem piora clínica e alterações histológicas condizentes com uma reação alérgica, o desafio antigênico não causou intensificação na produção do muco sendo esta ainda menor que a produção de muco nos grupos A e HC. Por outro lado apesar de não verificarmos diferença nas concentrações de citocinas no tecido intestinal, essas foram diferentes no tecido adiposo intimamente ligado ao intestino, o TAM. No TAM os níveis de IL-10 se encontravam aumentados em animais HCA quando comparados aos A. Já foi demonstrado que níveis aumentados de IL-10 produzidos pelas células da Placa de Peyer, seriam capazes de controlar a alergia alimentar (FROSSARD *ET AL.*, 2004) e que a IL-10 agiria sobre a célula epitelial do intestino, fazendo-a responder às infecções e outras agressões, modulando a resposta imune e a inflamação no trato digestivo (KUHNS *ET AL.*, 1993). Além disso, essa citocina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, a ativação de células Th2 e a troca de isotipo para IgE nas células B (HAWRYLOWICZ E O'GARRA, 2005). A presença dessa IL-10 no tecido adiposo adjacente poderia estar refletindo no tecido intestinal, intimamente ligado ao TAM e interferindo nessa produção de muco pelas células caliciformes. Nossos dados revelaram também menor produção de muco em animais obesos do grupo HC. Como estes animais já eram obesos anteriormente, a resposta imunológica gerada pela presença do antígeno no trato gastrointestinal pode ter ocorrido de forma mais branda do que nos animais não obesos, pelo fato de já estarem “*primados*”, ou seja, com todo sistema imunológico preparado para responder a um estímulo inflamatório.

Neste estudo observamos também a perda de peso corporal e diminuição no tecido adiposo visceral e subcutâneo no grupo alérgico. Em estudos prévios, Dourado et al. (2011) mostraram que a alergia alimentar desencadeia importante redução no peso corporal, principalmente devido à perda de massa gorda. Esses autores demonstraram ainda que a diminuição da adiposidade nos camundongos alérgicos pode estar relacionada a uma maior lipólise nos adipócitos, necessária para responder ao elevado gasto de energia durante o processo inflamatório (DOURADO *ET AL.*, 2011). Outros pesquisadores já demonstraram anteriormente que a lipólise parece ser

impulsionada pelo aumento do número de leucócitos e dos níveis de citocinas no tecido adiposo (KUHNE *ET AL.*, 2003; DOURADO *ET AL.*, 2011; SACKMANN-SALA *ET AL.*, 2012). Surpreendentemente, os camundongos alérgicos e obesos não apresentaram perda de peso corporal expressiva se comparados ao grupo alérgico, embora mostrassem sinais claros de alergia alimentar. Também não mantiveram o ganho de peso corporal como os animais do grupo HC. Ao analisar os sítios adiposos isoladamente, observou-se que esses perderam massa gorda apenas no tecido adiposo mesentérico (TAM), sítio adiposo localizado próximo ao intestino. Além disso, os camundongos alérgicos e obesos apresentaram concentrações de citocinas mais elevadas no TAM quando comparados aos animais do grupo alérgico. Os níveis mais elevados de citocinas neste tecido podem estar relacionados com a perda de gordura devido ao aumento da lipólise e a proximidade do tecido adiposo mesentérico com o foco da inflamação no intestino. Estudo realizado com pacientes asmáticos submetidos à cirurgia bariátrica demonstrou que a perda de peso melhorou os sintomas da asma, independente dos níveis de IgE, modulando a ação das células T e o perfil de citocinas pró-inflamatórias (DIXON *ET AL.*, 2011). A perda de gordura faz com que os adipócitos diminuam de tamanho e com isso a circulação sanguínea nesse tecido se torna mais fácil e podemos supor que a chegada das células do sistema imunológico é mais rápida, conseqüentemente, a produção de mediadores inflamatórios aumenta. Essa maior vascularização e proximidade do foco de inflamação alérgica poderiam explicar porque esse tecido é mais afetado quando o organismo precisa responder a uma elevada demanda de energia e indicam sua participação como fornecedor ativo dessa energia durante a resposta inflamatória alérgica (SACKMANN-SALA *ET AL.*, 2012).

Outro resultado característico da alergia alimentar a OVA, foi o aumento do infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal nos grupos alérgicos em relação aos camundongos controle (C). O grande infiltrado eosinofílico também é observado em outros tipos de doenças como a asma, sendo resultante de reações alérgicas tardias e contribuem para muitos dos processos patológicos em doenças de hipersensibilidade imediata (LUKACS *ET AL.*, 2001). Sob o estímulo de citocinas como a IL-5, liberada pelos linfócitos Th2, ocorre um aumento da produção de eosinófilos na medula óssea que são posteriormente liberados na corrente sanguínea e atraídos aos locais de inflamação por fatores quimiotáticos como a eotaxina. Já no tecido, esses granulócitos liberam mediadores citotóxicos como a proteína básica principal, proteína catiônica

eosinofílica e peroxidase, além de outros mediadores inflamatórios que podem induzir a produção de moléculas de adesão, o aumento da permeabilidade vascular e a produção de muco, além de agirem como células apresentadoras de antígeno promovendo o aumento de células Th2 em tecidos inflamados, intensificando assim o processo inflamatório (HOGAN *ET AL.*, 2001; ROTHENBERG *ET AL.*, 2001; SHI, 2004). No intestino, o infiltrado de eosinófilos promove danos ao tecido e disparam o gatilho para a diarreia e o sangramento intestinal, que podem contribuir também para o fenômeno de aversão ao antígeno (GARCIA *ET AL.*, 1985; STONE *ET AL.*, 2010).

Curiosamente, o intestino dos camundongos obesos também apresentou aumento no infiltrado de eosinófilos na mucosa antes mesmo do desafio oral. Este achado sugere, que a dieta HC gerou um estímulo inflamatório capaz de atrair esses granulócitos até o intestino e promover alterações importantes que não estão relacionadas a um fator imunológico. As alterações observadas no tecido adiposo mesentérico nos leva a supor que a resposta inflamatória mais intensa neste sítio possa ter gerado uma forte sinalização, por meio das citocinas, que acabam influenciando tecidos adjacentes, nesse caso o intestino. Sabe-se que o tecido adiposo está intimamente ligado ao tecido linfoide (MORO *ET AL.*, 2010) e que o maior compartimento linfoide do organismo está associado ao intestino, o GALT (MESTECKY *ET AL.*, 2005). É fato conhecido que os quilomicrons formados no período pós-prandial são drenados via vasos linfáticos e são transportados através dos nódulos linfóides mesentéricos, antes de alcançarem a corrente sanguínea. Essa formação de quilomicrons estimula a proliferação de células T mesentéricas (MIURA et al. 1993, ___ 1998). Recentemente foi descoberto um novo tipo de linfócito em uma estrutura linfoide associada aos tecidos adiposos e que produz grandes quantidades de citocinas Th2, tais como IL-5, IL- 6 e IL-13 (MORO *ET AL.*, 2010). Um estudo anterior também demonstrou que os níveis séricos de IL-5 são mantidos por células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) residentes em tecidos adiposos periféricos e que secretam IL-5, IL-13 e eotaxina, resultando em acúmulo de eosinófilos. Estes investigadores também demonstraram que células ILC2 no intestino delgado expressam IL- 5 e IL-13 e que esta expressão é aumentada após o consumo de calorias (NUSSBAUM *ET AL.*, 2013). Outros estudos tem demonstrado ainda que os eosinófilos tem estreita relação com fatores relacionados à obesidade, um exemplo é a expressão de receptor para leptina na superfície de eosinófilos de humanos, que em níveis elevados aumenta a

sobrevivência desses granulócitos (CONUS *ET AL.*, 2005). Wu *et al.* (2011) observaram ainda que, na ausência de eosinófilos, a via alternativa de ativação de macrófagos no tecido adiposo era atenuada e os animais com dieta hiperlipídica desenvolviam resistência à insulina e intolerância à glicose. Baseado nesses dados os autores sugeriram que os eosinófilos podem desempenhar um importante papel na homeostase metabólica no tecido adiposo (WU *ET AL.*, 2011). Estudos de nosso grupo mostram também que a dieta HC aumenta a secreção de IL-13 e eotaxina no tecido adiposo (dados ainda não publicados). Essas evidências podem explicar o fato de animais em dieta HC apresentarem aumento de eosinófilos na mucosa intestinal, mesmo não sendo alérgicos. Mais estudos ainda são necessários para poder esclarecer como e por que essas manifestações clínicas ocorrem.

Previamente à indução da alergia alimentar, os animais obesos já apresentavam inflamação crônica de baixa intensidade e alterações metabólicas – conforme demonstrado anteriormente por Oliveira *et al.* (2013). O consumo agudo e crônico de dieta HC induz alterações no número de leucócitos circulantes, remodelamento do tecido adiposo (com hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, aumento do infiltrado de macrófagos e outras células do sistema imunológico), assim como disfunção no metabolismo (com hiperglicemia, hiperlipidemia, intolerância a glicose, resistência a insulina) e alterações nas concentrações circulantes de adipocinas (OLIVEIRA *ET AL.*, 2013). Postula-se que tais achados sejam decorrentes, pelo menos em parte, à sobrecarga de nutrientes, que leva a alterações no metabolismo de glicose e de lipídios. O elevado índice glicêmico aumenta concomitantemente os índices de insulina, estimulando a captação da glicose pelos adipócitos e conseqüente aumento da lipogênese (ISKEN *ET AL.*, 2009). O aumento do tamanho dos adipócitos eleva a produção de mediadores inflamatórios como TNF, leptina, IL-6 e CCL2, favorecendo o desenvolvimento do diabetes (WEYER *ET AL.*, 2000; SKURK *ET AL.*, 2007). Neste trabalho análises do TAE e TAM mostraram elevadas concentrações das citocinas TNF e IL-6 nos animais A e HCA. Estas citocinas são mediadores pró-inflamatórios que, entre outras funções, recrutam leucócitos. Esse recrutamento para o tecido adiposo foi confirmado pela técnica de microscopia intravital, que demonstrou aumento do rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura desse tecido tanto nos animais obesos como nos alérgicos (A, HC e HCA). O aumento da adesão de leucócitos ocorre devido a sinalização vinda do tecido

adjacente ao vaso que leva ao aumento das moléculas de adesão. Essa sinalização ativa a expressão endotelial de moléculas, responsáveis pela infiltração das células mononucleares e polimorfonucleares no tecido (KNEILLING *ET AL.*, 2009; LEVI-SCHAFFER E ELIASHAR, 2009; MINAI-FLEMINGER E LEVI-SCHAFFER, 2009). Da mesma forma, Dourado (2010) observou aumento de leucócitos tanto em rolamento quando aderidos na microvasculatura do tecido adiposo epididimal em camundongos BALB/c alérgicos e associou esse aumento à alta concentração local da quimiocina MCP-1/CCL-2, o que sugere a ocorrência de recrutamento de monócitos/macrófagos para este tecido (DOURADO *ET AL.*, 2011). Além disso, o perfil do recrutamento celular em nosso experimento correlacionou-se com o aumento na contagem de leucócitos totais circulantes, indicando a existência também de uma inflamação sistêmica. Esses dados indicam que o TAM e o TAE se encontravam inflamados dos animais dos grupos A, HC e HCA, sendo o grau de inflamação mais grave no TAM de animais HCA quando comparados aos animais A pelo perfil de citocinas encontrado e pela perda de peso mais acentuada. Por outro lado, os níveis de IL-10 no TAM também se mostraram elevados, sendo os dos camundongos do grupo HCA ainda maiores do que nos animais do grupo A. Essa citocina tem caráter anti-inflamatório e sua elevação pode estar sinalizando a tentativa do organismo para a resolução do processo inflamatório. Esse achado reforça o fato de os camundongos do grupo HCA estarem contornando mais rapidamente o processo inflamatório desencadeado pela alergia, apesar de ainda apresentarem inflamação crônica de baixa intensidade devido à obesidade prévia, ao invés de exacerbarem os sintomas alérgicos. A perda de peso neste tecido pode ter contribuído também para esse perfil.

Tanto a alergia alimentar como a obesidade alteram o metabolismo dos animais. Dourado et al. (2011) demonstraram que na alergia alimentar os níveis de TG e CT bem como o de ácidos graxos livres se encontravam reduzidos quando comparados aos controles não alérgicos sendo que o tecido adiposo destes animais apresentava elevada lipólise, consequência da demanda de energia gerada pela inflamação (DOURADO *ET AL.*, 2011). No caso dos camundongos obesos estes níveis tendem a aumentar devido ao fornecimento contínuo de grandes quantidades de glicose, aumentando o depósito de gordura no tecido adiposo e a ocorrência da resistência à insulina (FLANAGAN *ET AL.*, 2008; YANG *ET AL.*, 2010). O grupo HCA apresentou aumento nos níveis de glicose sérica de jejum e intolerância à glicose

(TTOG) quando comparado ao grupo A. Apesar das concentrações séricas de resistina terem sido semelhantes para todos os grupos, as elevadas concentrações de glicose associada a uma grande área sob a curva do TTOG, pode estar indicando um quadro de resistência à insulina, efeito da sobrecarga de carboidratos simples na dieta. Esse quadro metabólico sinaliza para a manutenção da obesidade e síndrome metabólica, com a possibilidade de geração de diabetes do tipo 2 (GROSS *ET AL.*, 2004; BUETTNER *ET AL.*, 2007). Portanto, no presente trabalho, animais obesos e alérgicos mantiveram alterações metabólicas similares aos animais obesos o que demonstra que o efeito da obesidade sobrepôs-se ao da alergia.

7 CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que camundongos com obesidade de grau leve e alérgicos apresentam características patológicas semelhantes aos camundongos magros alérgicos. Os distúrbios metabólicos gerados pela obesidade foram mantidos nos animais com alergia alimentar. De forma inusitada observou-se que a obesidade leve provocou distúrbios intestinais importantes como aumento no infiltrado de eosinófilos, elevada pontuação DAI e o fenômeno de aversão ao antígeno. No presente trabalho, focamos no efeito da obesidade leve induzida por uma dieta rica em carboidratos em camundongos com alergia alimentar. No entanto, torna-se importante compreender o efeito de diferentes graus de obesidade e da composição da dieta sobre a resposta alérgica e sobre o quadro metabólico na alergia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. L., H.L.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ASBAI, A. B. D. A. E. I. **Alergia alimentar**. Disponível em: <http://www.asbai.org.br/secao_detalhes.asp?s=81&id=306> Acesso em 17 abr. 2014.

AZAGURY, D. E.; LAUTZ, D. B. Obesity overview: epidemiology, health and financial impact, and guidelines for qualification for surgical therapy. **Gastrointest Endosc Clin N Am**, v. 21, n. 2, p. 189-201, Apr 2011.

BACH-NGOHOU, K. et al. Apolipoprotein E kinetics: influence of insulin resistance and type 2 diabetes. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, n. 11, p. 1451-8, Nov 2002.

BERG, A. H. et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 947-53, Aug 2001.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 96, n. 9, p. 939-49, May 13 2005.

BISCHOFF, S. C. et al. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 14, p. 8080-5, Jul 6 1999.

BLANCHARD, C. et al. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. **J Immunol**, v. 172, n. 6, p. 3775-83, Mar 15 2004.

BRASIL. **VIGITEL**. SAÚDE, M. D. 2013. Disponível em <<https://biavati.files.wordpress.com/2014/05/vigitel-2013.pdf>> .Acesso em 17 abr. 2014.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. 4, p. 798-808, Apr 2007.

BULLO, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obes Res**, v. 11, n. 4, p. 525-31, Apr 2003.

CALIXTO, M. C. et al. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **Br J Pharmacol**, v. 159, n. 3, p. 617-25, Feb 1 2010.

CANCELLO, R. et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1554-61, Jun 2006.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 6, p. 1331-41, Jun 1994.

CONUS, S.; BRUNO, A.; SIMON, H. U. Leptin is an eosinophil survival factor. **J Allergy Clin Immunol**, v. 116, n. 6, p. 1228-34, Dec 2005.

CORBETTA, S. et al. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 4, p. 2397-402, Apr 2005.

DE VRIES, A. et al. High-fat feeding redirects cytokine responses and decreases allergic airway eosinophilia. **Clin Exp Allergy**, v. 39, n. 5, p. 731-9, May 2009.

DIETZE, J. et al. Obesity lowers the threshold of allergic sensitization and augments airway eosinophilia in a mouse model of asthma. **Allergy**, v. 67, n. 12, p. 1519-29, Dec 2012.

DIXON, A. E. et al. Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, n. 3, p. 508-15 e1-2, Sep 2011.

DIXON, A. E. et al. Effect of obesity on clinical presentation and response to treatment in asthma. **J Asthma**, v. 43, n. 7, p. 553-8, Sep 2006.

DOURADO, L. P. et al. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. **Cell Immunol**, v. 262, n. 1, p. 62-8, 2010.

DOURADO, L. P. A. et al. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. **Cellular Immunology**, v. 270, n. 2, p. 198-206, 2011.

EIGENMANN, P. A. T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 13, n. 3, p. 162-71, Jun 2002.

FARIA, A. M. et al. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Front Immunol**, v. 4, p. 102, 2013.

FERNANDEZ-RIEJOS, P. et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 568343, 2010.

FERNANDEZ-RIVAS, M. et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. **J Allergy Clin Immunol**, v. 112, n. 4, p. 789-95, Oct 2003.

FERNANDEZ, C. M. et al. S-resistin inhibits adipocyte differentiation and increases TNFalpha expression and secretion in 3T3-L1 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, n. 10, p. 1131-41, Oct 2010.

FERREIRA, C. T.; SEIDMAN, E. Food allergy: a practical update from the gastroenterological viewpoint. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 1, p. 7-20, Jan-Feb 2007.

FLANAGAN, A. M. et al. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 8, p. 505-13, Aug 2008.

FROSSARD, C. P. et al. Lymphocytes in Peyer patches regulate clinical tolerance in a murine model of food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, n. 5, p. 958-64, May 2004.

GAMBERO, A. et al. Mesenteric adipose tissue alterations resulting from experimental reactivated colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 11, p. 1357-64, Nov 2007.

GARCIA, J. et al. A general theory of aversion learning. **Ann N Y Acad Sci**, v. 443, p. 8-21, 1985.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 415-45, 2011.

GROSS, L. S. et al. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 774-9, May 2004.

HANCOX, R. J. et al. Sex differences in the relation between body mass index and asthma and atopy in a birth cohort. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 5, p. 440-5, Mar 1 2005.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 4, p. 271-83, Apr 2005.

HERSOUG, L. G.; LINNEBERG, A. The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance? **Allergy**, v. 62, n. 10, p. 1205-13, Oct 2007.

HERZ, U. Immunological basis and management of food allergy. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 47 Suppl 2, p. S54-7, Nov 2008.

HOGAN, S. P. et al. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 353-60, Apr 2001.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. **N Engl J Med**, v. 356, n. 3, p. 213-5, Jan 18 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1 1993.

IBGE, B. **POF: Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE**. IBGE. Rio de Janeiro: 150 p. 2011.

ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Mechanisms of reaginic hypersensitivity and IgE antibody response. **Immunol Rev**, v. 41, p. 109-48, 1978.

ISKEN, F. et al. Metabolic effects of diets differing in glycaemic index depend on age and endogenous glucose-dependent insulinotrophic polypeptide in mice. **Diabetologia**, v. 52, n. 10, p. 2159-68, Oct 2009.

IYER, A. et al. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 6, n. 2, p. 71-82, Feb 2010.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K. J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Adv Nutr**, v. 2, n. 4, p. 304-16, Jul 2011.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1494-505, Jun 2006.

KNEILLING, M. et al. Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1696-706, Aug 20 2009.

KNEILLING, M.; ROCKEN, M. Mast cells: novel clinical perspectives from recent insights. **Exp Dermatol**, v. 18, n. 5, p. 488-96, May 2009.

KUHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-74, Oct 22 1993.

KUHNKE, A. et al. Bioenergetics of immune cells to assess rheumatic disease activity and efficacy of glucocorticoid treatment. **Ann Rheum Dis**, v. 62, n. 2, p. 133-9, Feb 2003.

LANG, J. E. et al. Effect of obesity on pulmonary inflammation induced by acute ozone exposure: role of interleukin-6. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 294, n. 5, p. L1013-20, May 2008.

LEE, Y. S. et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474-83, Oct 2011.

LEVI-SCHAFFER, F.; ELIASHAR, R. Mast cell stabilizing properties of antihistamines. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 11, p. 2549-51, Nov 2009.

LUKACS, N. W.; GLOVSKY, M. M.; WARD, P. A. Complement-dependent immune complex-induced bronchial inflammation and hyperreactivity. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 280, n. 3, p. L512-8, Mar 2001.

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1920-5, Mar 25 2005.

MAEDA, N. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nat Med**, v. 8, n. 7, p. 731-7, Jul 2002.

MAI, X. M.; BOTTCHER, M. F.; LEIJON, I. Leptin and asthma in overweight children at 12 years of age. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 15, n. 6, p. 523-30, Dec 2004.

MATSUZAWA-NAGATA, N. et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57, n. 8, p. 1071-7, Aug 2008.

MAYER, L. Mucosal immunity. **Pediatrics**, v. 111, n. 6 Pt 3, p. 1595-600, Jun 2003.

MCTERNAN, C. L. et al. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. **Lancet**, v. 359, n. 9300, p. 46-7, Jan 5 2002.

MESTECKY, J.; MOLDOVEANU, Z.; ELSON, C. O. Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens. **Vaccine**, v. 23, n. 15, p. 1800-3, Mar 7 2005.

MINAI-FLEMINGER, Y.; LEVI-SCHAFFER, F. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. **Inflamm Res**, v. 58, n. 10, p. 631-8, Oct 2009.

MITO, N. et al. Effect of diet-induced obesity on ovalbumin-specific immune response in a murine asthma model. **Metabolism**, v. 51, n. 10, p. 1241-6, Oct 2002.

MORO, K. et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 540-4, Jan 28 2010.

NAUTA, A. J. et al. Mechanisms of allergy and asthma. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 2-3, p. 354-60, May 13 2008.

NHANES. **Health, United States, 2012: with special feature on emergency care. 1999-2012.**

NUSSBAUM, J. C. et al. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. **Nature**, v. 502, n. 7470, p. 245-8, Oct 10 2013.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.

PACHECO-LOPEZ, G.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Brain-immune interactions and the neural basis of disease-avoidant ingestive behaviour. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 366, n. 1583, p. 3389-405, Dec 12 2011.

PANG, T. T.; NARENDHAN, P. The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1150, p. 143-5, Dec 2008.

PEREIRA, A. C. S. M., S. M.; CONSTANT, P. B. L. . Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. . **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde.**, v. 29, p. 189-200, 2008.

RAJALA, M. W. et al. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. **J Clin Invest**, v. 111, n. 2, p. 225-30, Jan 2003.

ROTHENBERG, M. E. et al. Gastrointestinal eosinophils in health and disease. **Adv Immunol**, v. 78, p. 291-328, 2001.

SACKMANN-SALA, L. et al. Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 1, p. 101-11, Jan 2012.

SALDANHA, J. C. et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 6, p. 809-16, Jun 2004.

SAMPSON, H. A. Update on food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, n. 5, p. 805-19; quiz 820, May 2004.

SANZ, Y. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 6 Suppl, p. 2000S-2005S, Dec 2011.

SCHERER, P. E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26746-9, Nov 10 1995.

SHI, H. Z. Eosinophils function as antigen-presenting cells. **J Leukoc Biol**, v. 76, n. 3, p. 520-7, Sep 2004.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1793-801, Jul 2006.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S116-25, Feb 2010.

SKURK, T. et al. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 3, p. 1023-33, Mar 2007.

SPINDLER, S. R. Rapid and reversible induction of the longevity, anticancer and genomic effects of caloric restriction. **Mech Ageing Dev**, v. 126, n. 9, p. 960-6, Sep 2005.

STEPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307-12, Jan 18 2001.

STOFKOVA, A. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. **Endocr Regul**, v. 44, n. 1, p. 25-36, Jan 2010.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S73-80, Feb 2010.

STROBEL, S.; MOWAT, A. M. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 6, n. 3, p. 207-13, Jun 2006.

SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 10, p. 2062-8, Oct 2005.

TANTISIRA, K. G. et al. Association of body mass with pulmonary function in the Childhood Asthma Management Program (CAMP). **Thorax**, v. 58, n. 12, p. 1036-41, Dec 2003.

TRIGGIANI, M. et al. Allergy and the cardiovascular system. **Clin Exp Immunol**, v. 153 Suppl 1, p. 7-11, Sep 2008.

TUGWOOD, J. D. et al. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. **EMBO J**, v. 11, n. 2, p. 433-9, Feb 1992.

UNTERSMAJR, E.; JENSEN-JAROLIM, E. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 6, p. 1301-8; quiz 1309-10, Jun 2008.

UNTERSMAJR, E. et al. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: a fish allergy model in BALB/c mice. **J Allergy Clin Immunol**, v. 112, n. 3, p. 616-23, Sep 2003.

VAN WIJK, F.; KNIPPELS, L. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. **Biomed Pharmacother**, v. 61, n. 1, p. 8-20, Jan 2007.

VICARIO, M. et al. Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 7, p. 1166-75, Oct 2010.

VIEIRA, V. J. et al. Elevated atopy in healthy obese women. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 3, p. 504-9, Sep 2005.

VISNESS, C. M. et al. Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 5, p. 1163-9, 1169 e1-4, May 2009.

WANG, Y. et al. Chylomicrons promote intestinal absorption and systemic dissemination of dietary antigen (ovalbumin) in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8442, 2009.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1785-8, Dec 2003.

WEYER, C. et al. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. **Diabetologia**, v. 43, n. 12, p. 1498-506, Dec 2000.

WHO. **Global Infobase 2010**. 2010. Disponível em: < <https://apps.who.int/infobase/> >.

WICKENS, K. et al. Obesity and asthma in 11-12 year old New Zealand children in 1989 and 2000. **Thorax**, v. 60, n. 1, p. 7-12, Jan 2005.

WOZNIAK, S. E. et al. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. **Dig Dis Sci**, v. 54, n. 9, p. 1847-56, Sep 2009.

WU, D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, n. 6026, p. 243-7, Apr 8 2011.

YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1288-95, Nov 2002.

YANG, H. et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. **J Immunol**, v. 185, n. 3, p. 1836-45, Aug 1 2010.

YINGZHONG, Y. et al. Regulation of body weight by leptin, with special reference to hypoxia-induced regulation. **Intern Med**, v. 45, n. 16, p. 941-6, 2006.

YU, W. G. et al. Pathophysiological significance of a reaction in mouse gastrointestinal tract associated with delayed-type hypersensitivity. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 15, p. 2254-8, Aug 1 2004.

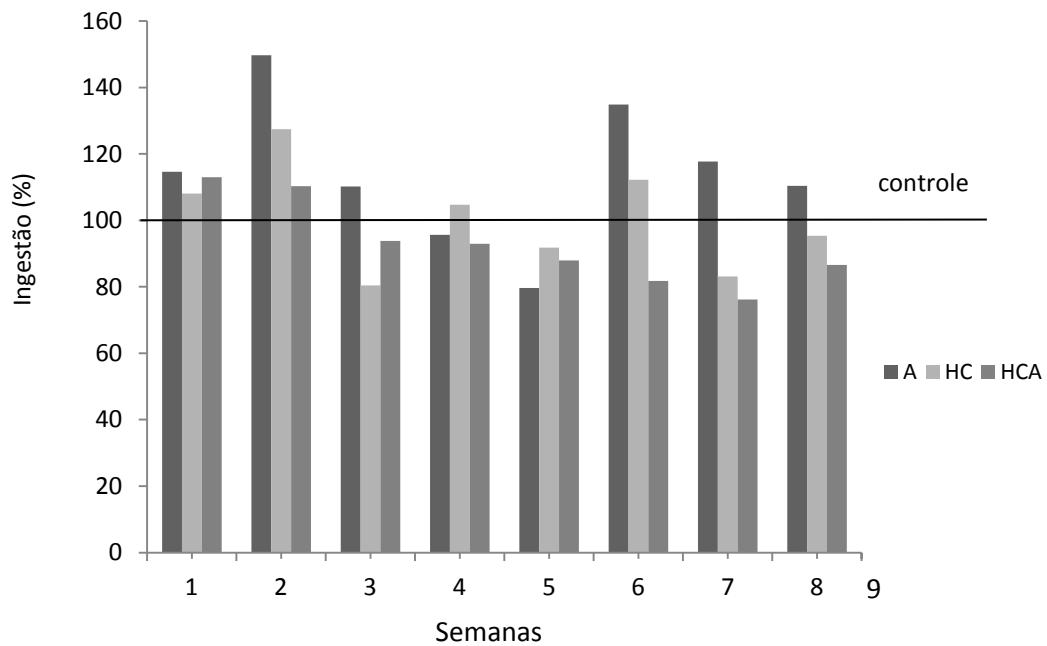
ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1 1994.

ANEXO 1**Dieta rica em carboidratos simples – Dieta HC**

Componentes	Quantidades (%)
Leite condensado	45
Ração comercial Labina® em pó	45
Açúcar refinado	10
Água	q.s.p.

ANEXO 2

INGESTÃO ALIMENTAR SEMANAL (%) *



*A ingestão semanal dos animais controle foi considerada 100% e a ingestão alimentar dos demais grupos foi então calculada relacionando-se ao controle.