



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Luísa Lemos dos Santos

**CONFLITO NEURO-IMUNOLÓGICO NA ALERGIA ALIMENTAR: ENTRE A
AVERSÃO E A RECOMPENSA?**

Belo Horizonte

2018

Luísa Lemos dos Santos

**CONFLITO NEURO-IMUNOLÓGICO NA ALERGIA ALIMENTAR: ENTRE A
AVERSÃO E A RECOMPENSA?**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Prof. Ana Cristina Gomes Santos

Belo Horizonte

2018

043

Santos, Luísa Lemos dos.

Conflito neuro-imunológico na alergia alimentar: entre a aversão e a recompensa [manuscrito] / Luísa Lemos dos Santos. – 2018.

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

Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Caetano de Faria. Co-Orientadora: Prof. Dra. Ana Cristina Gomes Santos.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Hipersensibilidade Alimentar. 3. Lactoglobulinas. 4. Recompensa. 5. Modalidades Alimentares. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Santos, Ana Cristina Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LUISA LEMOS DOS SANTOS. Aos vinte e dois dias do mês de novembro de 2018 às 14.00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Conflito Neuro-Imunológico na alergia alimentar: entre a aversão e a recompensa?", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Momtchilo Russo (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Alexandre Salgado Basso (Universidade Federal de São Paulo), aprovada; Dra. Denise Carmona Cara Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ana Cristina Gomes Santos - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de novembro de 2018.

Dr. Momtchilo Russo (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Salgado Basso (Universidade Federal de São Paulo)

Dra. Denise Carmona Cara Machado (UFMG)

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG)

Dr. Ana Cristina Gomes Santos - Coorientadora (UFMG)

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

[Handwritten signatures in blue ink corresponding to the names listed on the left]

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Dedico este trabalho a todos os cientistas curiosos, a todos aqueles que acreditam na ciência e, especialmente, à minha família por crer que eu já sou uma dessas pessoas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse possível:

Aos meus amigos do LIB, por todo empenho e carinho em me ajudar durante esse projeto, especialmente Helder, Dani Reis e Juliana Lima, meus anjos da guarda! Ao Rafa pelos *papers*, discussões, paciência e traduções! À Thaís por todo suporte durante meu projeto e fora dele. Aos antigos alunos do LIB que fazem parte da minha história e que me ensinaram muito. Tem muito de vocês aqui! Ao Hermes e Ildinha, sem os quais não teríamos o melhor biotério de se trabalhar e à Dona Carminha, muito cuidadosa com nossos materiais e muito amável! Muito obrigada!!

À minha querida amiga Maria Cecília (Cis) pela inspiração na ciência e na vida, por todos os experimentos que fizemos juntas, todas as dificuldades superadas. Eu cresci muito com você e te agradeço por tudo!

À minha orientadora Ana Maria Caetano Faria, uma pessoa excepcional e indescritível. Já disseram que a Ana é um gênio e não estavam errados. De fato, a Ana é a pessoa mais formidável e elegante que eu conheço. Eu te agradeço bastante pela nossa década juntas, por todos os grandes ensinamentos, não somente na ciência, mas na vida.

À minha co-orientadora Ana Cristina, por todo apoio no meio do percurso, a leveza nas ideias e as gargalhadas diante dos meus medos, você me inspira todos os dias!

Aos laboratórios amigos, em especial da Leda, Jacque e Vasco, por me auxiliar sempre que eu preciso de qualquer ajuda, vocês são parte de tudo! E, com isso, agradeço em especial meus amigos Fillipe e Bárbara que estiveram presentes em momentos muito importantes dessa tese. Vocês têm minha eterna gratidão!

Ao meu querido amigo Paulo por sempre me salvar no departamento e fora dele! Sempre me ajudando a tornar meu trabalho mais elegante!

Aos secretários do departamento, Orlando e Alexandre pelos serviços rápidos e eficientes que sempre nos ajudaram a cumprir prazos! Obrigada.

Aos meus colaboradores: Luara Augusta e Julia Gomes, do laboratório da professora Danielle Aguiar; Muiara e Luciana, do laboratório do prof. Bruno Rezende.

Aos meus pais e minha irmã, pelo suporte, incentivo, motivação e bastante orgulho da minha trajetória, coisas que me incentivavam sempre. Eu jamais teria feito um doutorado sem o apoio incondicional de vocês e a admiração que me veem. Eu agradeço demais e tenho orgulho de ser a primeira doutora de nossa família!

Aos meus tios, especialmente tio Zezé e tia Christina, por acreditarem no meu sucesso e sempre me incentivarem a ir mais longe, e minha madrinha Dora e Tio Marco Antônio, por serem bons exemplos de resiliência e sabedoria. Aos meus avós, pelo carinho em compreender meus rumos distintos, especialmente meu avô José Francisco Lemos Filho, que sempre contribuiu com meus estudos.

Ao meu primo Daniel, que foi responsável por me levar até o laboratório e me apoiar nas decisões acadêmicas, sempre tendo um ombro amigo quando precisei!

À minha querida Symone Fulgêncio, sem a qual eu não teria conhecido o fantástico mundo da imunologia.

Aos meus amigos, especialmente Samara, Natália e Aline Queiroz por aqueles sorrisos e gargalhadas que faziam tudo se acalmar no meio do caos. Muitos momentos foram difíceis e sem vocês, eles teriam sido muito mais. Sou muito grata pelo carinho!

Ao Jean, meu amigo de todas as horas, uma pessoa que me ajuda todos os dias a superar meus desafios, a me tornar uma pessoa mais forte e melhor. Eu te agradeço toda nossa caminhada!

Ao Caio, por me ajudar, literalmente, na tese, sempre me apoiando, acompanhando e dizendo que tudo daria certo.

Aos meus alunos pelo carinho e apreço por mim, sempre me incentivando e mostrando que eu posso ir além, vocês participaram dessa formação sem nem perceberem! Me sinto muito feliz e grata por ter vocês comigo nesse momento! Obrigada!

A todos que participaram do meu doutorado, do tempo que eu me dediquei, do tempo que eu me ausentei em tantos compromissos para poder chegar até aqui! A todos que sempre estiveram na torcida por mim, de longe e de perto, eu sou muito grata! Eu não teria conseguido sem todos vocês! Muito obrigada pelo carinho.

True ignorance is not the absence of knowledge, but the refusal to acquire it.

Karl Popper

RESUMO

A alergia alimentar é resposta imune anormal frente a antígenos presentes pela dieta. A alergia alimentar ao leite de vaca é bastante frequente principalmente em crianças. Dentre os alérgenos presentes no leite, a β -lactoglobulina (BLG) é o mais imunogênico. Indivíduos alérgicos tendem a ser mais ansiosos, hipervigilantes e já foi descrito que eles apresentam aversão ao consumo do alérgeno. Em camundongos, a alergia alimentar à proteína da clara do ovo ovalbumina também acompanha do fenômeno da aversão. Para estudar a aversão e seus correlatos neuroimunológicos em modelo experimental alergia alimentar à BLG, camundongos BALB/c foram sensibilizados por via intraperitoneal com BLG e desafiados por via oral com solução contendo BLG. Observamos que os camundongos sensibilizados e desafiados por via oral exibiram níveis elevados de IgE específica para BLG, porém, os camundongos alérgicos desenvolveram aversão apenas parcial à solução contendo BLG. Mediante a possibilidade de escolha entre consumir a solução contendo o alérgeno ou apenas água, os camundongos, ainda que sensibilizados e com níveis elevados de IgE no soro, optaram por ingerir a solução alergênica. Para elucidar os processos comportamentais envolvidos na aversão ou preferência ao consumo da BLG, utilizamos um teste em labirinto do tipo *Zero maze* e observamos que os camundongos não sensibilizados que apenas ingeriram a solução contendo BLG por 7 dias gastaram mais tempo nos braços abertos do labirinto quando comparados aos demais grupos sugerindo um comportamento exploratório compatível com baixo grau de ansiedade. Na análise da ativação de áreas cerebrais relacionadas à ansiedade pela expressão de c-Fos por neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), camundongos que beberam solução contendo BLG, sensibilizados ou não à BLG, tiveram níveis mais baixos de c-Fos quando comparados a seus controles que não beberam BLG e, portanto, menor ativação dessa região. Provavelmente, a solução contendo BLG tem algum efeito ansiolítico que estabelece um conflito com o efeito aversivo produzido pela sensibilização alérgica ao alérgeno. A preferência por soluções contendo BLG é clara em camundongos não sensibilizados que, frente a opção de ingerir outras soluções, optaram por aquelas que continham BLG. O efeito direto da BLG na aversão foi testado em um modelo clássico de alergia alimentar à ovalbumina (OVA) no qual fornecemos, aos camundongos sensibilizados com OVA, uma solução misturada com OVA e BLG. Surpreendentemente, a introdução da BLG à mistura diminuiu a aversão ao consumo de OVA. Nossa hipótese de trabalho é que a ingestão de BLG ativa áreas cerebrais do sistema de recompensa e que, frente ao conflito entre a aversão e a recompensa, esta última prevalece.

Palavras chave: Alergia alimentar, beta-lactoglobulina, aversão, recompensa

ABSTRACT

Food allergy is an abnormal immune response to antigens present in the diet. Food allergy to cow's milk is quite frequent, especially in children. Among the allergens present in milk, β -lactoglobulin (BLG) is the most immunogenic. Allergic individuals tend to be more anxious, hypervigilant and it has been described that they have aversion to the consumption of the allergen. In mice, food allergy to the egg white protein ovalbumin is also accompanied by the phenomenon of aversion. To study aversion and its neuroimmune correlates in an experimental food allergy model to BLG, BALB/c mice were sensitized intraperitoneally with BLG and challenged orally with BLG containing solution. We observed that mice sensitized and challenged orally had high levels of BLG specific IgE, however, allergic mice developed only partial aversion to the BLG-containing solution. When mice were given the option of consuming the solution containing the allergen or only water, although they were sensitized and with high levels of serum IgE, they chose to ingest the allergen-containing solution. To elucidate the behavioral processes involved in BLG consumption or aversion, we used a Zero maze test and we observed that the non-sensitized mice that only ingested the BLG-containing solution for 7 days spent more time in the open arms of the labyrinth when compared to the other groups suggesting an exploratory behavior compatible with low levels of anxiety. Analysis of activation of the anxiety-related brain areas by c-Fos expression by neurons of the hypothalamus paraventricular nucleus (PVN) showed that mice drinking BLG-containing solution, sensitized or not to BLG, had lower levels of c-Fos when compared to its controls that did not drink BLG and, therefore, less activation of this region. It is likely that the BLG-containing solution has some anxiolytic effect that conflicts with the aversive effect produced by allergic sensitization to the allergen. The preference for solutions containing BLG is clear in non-sensitized mice that, in contrast to the option to ingest other solutions, chose those containing BLG. The direct effect of BLG on aversion was tested in a classical model of food allergy model to ovalbumin (OVA) in which OVA-sensitized mice were given a solution mixed with OVA and BLG. Surprisingly, addition of BLG into the blend decreased the OVA aversion. Our working hypothesis is that BLG intake activates brain areas of the reward system and, in face of the conflict between aversion and reward, the reward prevails.

Keywords: Food allergy, beta-lactoglobulin, aversion, reward system

LISTA DE ABREVIATURAS

PAF: Fator de agregação plaquetária
BLG: β -lactoglobulina
OVA: Ovalbumina
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
I.g: Intergástrica
CGRP: Gene de calcitonina
SP: Substância P
5-HT: Serotonina
NGF: Fator de crescimento dos nervos
HPA: Eixo hipotálamo-pituitária
CADM1: molécula de adesão celular tipo 1
PGE: Prostaglandina E
LTC: Leucotrienos
LCE: labirinto de cruz elevado
NAc: Núcleo *accumbens*
BLA: Amígdala basolateral
I.p: intraperitoneal
PBS: Tampão fosfato-salino
PFA: p-formaldeído
BSA: Albumina sérica bovina
PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo
OPD: o-fenilenediamina
DAB: Diaminobenzidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos imunológicos da alergia alimentar.....	23
Figura 2 - Imagem representativa do posicionamento das mamadeiras na gaiola experimental para o teste de preferência alimentar.	43
Figura 3 - Níveis séricos de anticorpos IgE anti-BLG.	48
Figura 4 - Consumo da solução contendo o alérgeno em camundongos alérgicos a BLG durante o desafio oral.....	50
Figura 5 - Níveis de IgE específica para OVA e consumo da solução contendo o alérgeno.....	51
Figura 6 - Teste de preferência alimentar.....	52
Figura 7 - Análise do comportamento de camundongos sensibilizados e não sensibilizados em labirinto do tipo <i>Zero Maze</i>	53
Figura 8 - Neurônios ativados no núcleo paraventricular do hipotálamo de camundongos sensibilizados com BLG.....	55
Figura 9 - Níveis de IgE total para BLG e consumo líquido.....	57
Figura 10 - Teste de preferência por soluções contendo sacarina, OVA ou BLG.	58
Figura 11 - Parâmetros do modelo de alergia alimentar a OVA em camundongos.....	60
Figura 12 - Avaliação da expressão de cFos em camundongos.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	ESTADO DA ARTE	18
2.1	Alergia alimentar	19
2.2	Mecanismos imunológicos da alergia alimentar	20
2.3	Alergia alimentar ao leite de vaca	23
2.4	Modelos experimentais de alergia alimentar a alérgenos comuns: amendoim, ovo e leite de vaca	25
2.5	Os fenômenos de aversão e preferência ao alimento	28
2.6	Correlatos neurológicos da atividade imunológica	31
2.7	Circuitos neurais e imunes	33
2.8	A alergia como proteção do organismo.....	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	METODOLOGIA	41
4.1	Animais	42
4.2	Indução da Alergia Alimentar	42
4.3	Consumo de líquido da mamadeira	42
4.4	Teste de preferência alimentar	42
4.5	Coleta do Soro	43
4.6	ELISA para medida da concentração de IgE sérica anti β -lactoglobulina	44
4.7	ELISA para medida da concentração sérica de IgG1 anti β -lactoglobulina.....	44
4.8	Teste comportamental em Labirinto elevado (<i>Zero Maze</i>)	45
4.9	Quantificação de c-fos no cérebro por imunohistoquímica.....	45
4.10	Análise Estatística	46
5	RESULTADOS	47

5.1 Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados com <i>whey protein</i> se tornaram alérgicos	48
5.2 Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados oralmente com <i>whey protein</i> desenvolveram aversão parcial ao antígeno	49
5.3 Camundongos sensibilizados para BLG optaram por consumir solução contendo o alérgeno	52
5.4 Camundongos sensibilizados e desafiados oralmente com <i>whey protein</i> exibiram comportamento alterado em relação a camundongos não sensibilizados	52
5.5 Camundongos sensibilizados e desafiados oralmente com <i>whey protein</i> tiveram níveis intermediários de C-fos quando comparados aos controles não sensibilizados e aos animais apenas sensibilizados.....	54
5.6 Camundongos sensibilizados e desafiados com BLG purificada apresentaram níveis mais altos de IgE sérica anti-BLG mas sem comportamento clássico de aversão ao alérgeno	55
5.7 Camundongos não sensibilizados preferiram ingerir BLG.	57
5.8 A preferência pelo consumo de BLG foi capaz de subverter o fenômeno da aversão ao alérgeno OVA.....	59
5.9 Camundongos sensibilizados para BLG e OVA apresentaram modificações na ativação de áreas do sistema nervoso	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS.....	76
9 ANEXOS	93

1 Introdução

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imune anormal frente aos antígenos introduzidos no organismo por meio da alimentação. Indivíduos que apresentam suscetibilidade genética a desenvolver reatividade alérgica (atopia) a esses antígenos podem sofrer distúrbios desencadeados após a ingestão de determinados alimentos, tais como: leite, ovos, crustáceos e castanhas (Sicherer & Sampson, 2010). Nesses indivíduos, as alergias alimentares estão relacionadas à presença de anticorpos séricos específicos (principalmente da classe IgE) para tais antígenos (Thijs et al., 2011).

Dentre todas as alergias alimentares, a alergia ao leite de vaca é a mais frequente e mais precoce, afetando cerca de 2,5% de crianças em seu primeiro ano de vida (Sicherer & Sampson, 2010), podendo apresentar sintomas considerados relativamente brandos ou até ameaçadores à vida das crianças (Wood, 2003), como esofagite, desnutrição, diarreia, dermatite atópica, náusea, vômitos e dor abdominal (Sicherer, 2003). A maioria das crianças após os três anos de idade, deixa de ser alérgica ao leite de vaca. Outras desordens alérgicas, tais como asma alérgica e eczema atópico e passam a ser mais frequentes nesses indivíduos (Saarinen, Pelkonen, Mäkelä, & Savilahti, 2005).

Até o presente momento, não há cura para alergia alimentar. Os diagnósticos e tratamentos são baseados na identificação dos alimentos causadores de alergia e sua eliminação da dieta, fato que contribui para déficits nutricionais e prejuízo no crescimento, principalmente das crianças. Os pacientes alérgicos são orientados a lerem os rótulos com os ingredientes de determinado alimento, evitar contaminação cruzada e buscar orientações médicas e nutricionais (Lanser, Wright, Orgel, Vickery, & Fleischer, 2015). O tratamento dos sintomas na alergia alimentar é feito através do uso de epinefrina, corticoesteroides e anti-histamínicos, nem sempre eficazes (Grunau et al., 2015). A constante vigilância e o potencial risco a que são expostos deixam os pacientes alérgicos em um estado de ansiedade, muitas vezes comprometendo suas tarefas diárias (Sampath, Sindher, Zhang, & Nadeau, 2018).

O sistema imune tem diversos meios de contatar o sistema nervoso central, as principais vias de sinalização são: direta, com sinalização através de nervos sensoriais até o sistema nervoso central, sinais, por exemplo, citocinas, sinalizando nos nervos periféricos (van der Kleij et al., 2010), e citocinas que atuam diretamente no sistema nervoso central, dentre outros.

Denise Cara e colaboradores (1994), trabalhando no laboratório do professor Nelson Vaz, descreveram o fenômeno da aversão como consequência comportamental do desencadeamento da alergia alimentar ao alérgeno da clara do ovo, ovalbumina (OVA). Esses autores delinearum um experimento em que eram ofertadas para camundongos duas

mamadeiras simultaneamente, uma contendo água e a outra contendo uma solução adocicada de clara de ovo. Diante disso, camundongos não sensibilizados para OVA preferiam as soluções adocicadas, enquanto que os animais sensibilizados com o antígeno apresentavam aversão à ingestão da solução, demonstrando que o sistema imune é capaz de interferir no comportamento dos camundongos levando a fenômenos de aversão e preferência (Cara et al 1994). Nesse caso, a aversão expôs um conflito para os animais: ingerir uma solução adocicada, considerada preferencial para os camundongos, ainda que o antígeno para o qual eles foram sensibilizados estivesse presente, levando à alergia alimentar ou ingerir água. Alguns anos depois, Basso e colaboradores (2003) elaboraram um experimento similar com o mesmo antígeno OVA e colocaram os camundongos em um aparato denominado labirinto em cruz elevado (LCE) para analisarem se os camundongos apresentavam algum comportamento relacionado a ansiedade, medo e aversão. O resultado foi que os camundongos sensibilizados para o antígeno, quando expostos ao labirinto, apresentavam comportamentos de ansiedade, com ativação de áreas cerebrais relacionadas ao comportamento: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo central da amígdala (CeA), e essa ativação era dependente de IgE (Basso et al., 2003).

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar se os mesmos correlatos comportamentais e neurológicos podem ser observados em camundongos com alergia alimentar à β -lactoglobulina (BLG) do leite bovino.

2 Estado da arte

2.1 Alergia alimentar

As proteínas são fundamentais para a obtenção de um balanço positivo de nitrogênio e a aquisição de aminoácidos essenciais pela nutrição. Essas proteínas são assimiladas de maneira eficiente através da ação de proteases gástricas, pancreáticas e do intestino delgado, resultando principalmente na sua redução em aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos que são facilmente absorvidos pelas células epiteliais intestinais. A quebra das proteínas muitas vezes resulta na perda dos principais epítopos imunogênicos (Erickson & Kim, 1990). Produtos da proteólise e proteínas inteiras que escapam do processo de digestão são antígenos capazes de desencadear processos imunes na mucosa intestinal. Na maioria dos indivíduos, o contato com as proteínas da dieta induz mecanismos imuno-reguladores como aqueles envolvidos na tolerância oral, mas respostas imunes alérgicas podem também ser desencadeadas em indivíduos suscetíveis (Chehade & Mayer, 2005).

Fisiologicamente, o contato antigênico pela mucosa intestinal resulta na produção de IgA secretória (SIgA) e na indução de tolerância oral (Vaz, Maia, Hanson, & Lynch, 1977). A SIgA é uma subclasse não inflamatória de imunoglobulina presente em todas as secreções mucosas e é responsável pela exclusão de microrganismos patogênicos sem a geração de respostas inflamatórias nesse processo (Macpherson, McCoy, Johansen, & Brandtzaeg, 2008). A tolerância oral é um fenômeno conhecido desde 1909 quando Besredka demonstrou que porquinhos da Índia alimentados previamente com uma ração contendo leite não poderiam ser imunizados contra proteínas lácteas (Faria & Weiner, 2005).

De maneira geral, os indivíduos são tolerantes a proteínas da alimentação e à própria microbiota. Esse fenômeno já foi bem descrito tanto para animais experimentais quanto para humanos (Andrade et al., 2006; Mestecky et al., 1996; Round, O'Connell, & Mazmanian, 2010). Entretanto, a falha em estabelecer a tolerância oral ou a quebra de um estado de tolerância já existente podem provocar a indução de reações de hipersensibilidade aos antígenos da dieta culminando em um processo conhecido como alergia alimentar (Saurer & Mueller, 2009).

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imune anormal frente aos antígenos introduzidos no organismo por meio da alimentação. Indivíduos que apresentam suscetibilidade genética a desenvolver reatividade alérgica (atopia) a esses antígenos podem sofrer distúrbios desencadeados após a ingestão de determinados alimentos (Sicherer & Sampson, 2010).

Os antígenos desencadeadores de reações alérgicas, também chamados de alérgenos, são geralmente proteínas ambientais comuns. Os alimentos que causam reações imunológicas contêm macromoléculas com propriedades semelhantes: geralmente apresentam baixo peso molecular, são glicosilados e de alta solubilidade em fluidos corporais. Tais características provavelmente conferem proteção aos antígenos frente à desnaturação e à degradação no trato gastrointestinal dos indivíduos suscetíveis e permitem sua absorção de forma intacta, embora ainda não se saiba por que alguns alimentos podem ser mais alergênicos do que outros (Helm et al., 2002). Relativamente, poucos alimentos são responsáveis pela maioria das reações alérgicas. Esses alimentos incluem: leite, ovo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar (Seibold, 2005). De todos esses, a alergia às proteínas do leite de vaca é a mais frequente (Monaci, Tregouat, Van Hengel, & Anklam, 2006). As alergias alimentares não têm cura e, conseqüentemente, indivíduos alérgicos podem ter uma piora na qualidade de vida. O tratamento disponível atualmente para os sintomas da alergia alimentar é o uso de epinefrina, corticoesteroides e anti-histamínicos, nem sempre eficazes (Grunau et al., 2015), por isso, a principal conduta é a exclusão dos alimentos que contém o alérgeno (Heine, 2018).

Estima-se que fatores genéticos exerçam papel fundamental na expressão da doença alérgica (Bergmann et al., 1997; Hansen, Halcken, Host, Moller, & Oster-Balle, 1993; Wahn & Von Mutius, 2001). A propensão à produção de IgE sofre influência de vários genes hereditários. Provavelmente, mais de 20 genes estão envolvidos no desenvolvimento de doenças alérgicas (Leung, 1998). Vários estudos já identificaram genes candidatos ou *loci* que podem estar envolvidos na alergia. Um desses *loci* para a atopia está no cromossomo 5q, próximo ao sítio do aglomerado de genes que codifica as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e o receptor de IL-4. Essa região é de grande interesse por causa da conexão entre vários genes aí localizados e os mecanismos de regulação de IgE, bem como com o crescimento e diferenciação de mastócitos e eosinófilos (Xu et al., 2000).

Embora não haja, no momento, testes genéticos diagnósticos disponíveis para identificar indivíduos com risco de alergia alimentar, a história familiar de atopia, incluindo a própria alergia alimentar, ainda consiste no melhor indicativo indireto de risco para seu desenvolvimento (Zeiger, 2003).

2.2 Mecanismos imunológicos da alergia alimentar

Em adultos, aproximadamente 2% dos antígenos alimentares ingeridos são absorvidos de forma intacta pelo organismo (Husby, Foged, Host, & Svehag, 1987). A absorção dessas

moléculas antigênicas permite com que elas sejam apresentadas a linfócitos T helper (Th) através das células apresentadoras de antígeno (APC). Esse processo gera a produção de citocinas liberadas por linfócitos Th, tais como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 (Bacharier & Geha, 2000).

Classicamente, as células Th2 eram conhecidas como as principais células produtoras de IL-4, citocina importante para a proliferação de linfócitos B e responsável pela troca de classe de IgG1 para IgE (Guo et al., 2015). O fenótipo das células Th2 pode ser induzido, também, por meio da citocina IL-33. Foi demonstrado que a alarmina IL-33 regula a diferenciação de células Th para Th2 e a expansão dessas últimas em células de memória, que contribuem para a produção de IL-5, IL-9 e IL-13, dentre outras (Murakami-Satsutani et al., 2014).

A ideia de que as células Th2 seriam as principais responsáveis por induzir a produção de IgE foi um dos dogmas da literatura por muito tempo. No entanto, recentemente, foi demonstrado que células T auxiliares foliculares (Tfh) são as principais células envolvidas na troca de isotipo para IgE e estão presentes nos centros germinativos. Essas células são CD4+, expressam CD40L, CXCR5 e secretam IL-4 (Tangye, Ma, Brink, & Deenick, 2013) fatores importantes na troca de isotipo para IgE e IgG1.

Apesar da importância das respostas de IgE, pouco se conhecia sobre a biologia das células produtoras dessa imunoglobulina. Anticorpos IgE de alta afinidade podem ser gerados de forma não convencional. A troca de isotipo se inicia no centro germinativo (GC), mas essas células são diferenciadas em plasmócitos e a maior parte delas é encontrada fora das áreas dos GC. As imunoglobulinas IgE apresentam hipermutação somática e maturação de afinidade e células IgG1+ com perfil de memória ou não, podem fazer troca de isotipo para IgE dependente de IL-4 (Erazo et al., 2007). Uma primeira resposta de IgE parece, assim, ser induzida por células Tfh. Após essa resposta inicial, no entanto, a secreção de IL-21 pelas células Tfh inibe a produção de IgE e estimula a troca de isotipo para IgG1. Acredita-se que, posteriormente às ações das células Tfh, as células Th2 contribuam para proliferação de células B por meio da secreção de IL-4 e pela produção da IgE nos centros germinativos (Noble & Zhao, 2016).

Uma vez circulantes, as moléculas de IgE específicas para o alérgeno produzidas pelas células B percorrem na circulação e podem se ligar a receptores FcεRI expressos na membrana de mastócitos e basófilos, fenômeno chamado de sensibilização. Em um momento posterior à exposição ao antígeno, por exemplo um segundo contato do indivíduo já sensibilizado com o mesmo antígeno, esse poderá se ligar ao complexo FcεRI – IgE na membrana de mastócitos espalhados pelo tecido conjuntivo de diferentes órgãos, iniciando uma reação celular de

liberação de vários mediadores inflamatórios, fenômeno chamado de degranulação dos mastócitos (Bischoff & Crowe, 2005). A ligação do antígeno na IgE provoca uma cascata de fosforilações que alteram a morfologia da célula, levando à degranulação (Sibilano, Frossi, & Pucillo, 2014).

A degranulação dos mastócitos, por sua vez, leva a liberação de mediadores pré-formados (histamina, serotonina), mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos) e, posteriormente, citocinas. Esse conjunto de reações citadas ocorre na fase imediata da alergia (Sibilano et al., 2014). A ligação da histamina ao endotélio gera contração celular e, como consequência, o extravasamento do plasma para os tecidos. Outras consequências da liberação desse mediador incluem a estimulação de células endoteliais a sintetizarem relaxantes vasculares para as células dos músculos lisos, provocando vasodilatação. Por outro lado, há também o efeito histamínico de constrição da musculatura lisa no intestino, podendo contribuir para o aumento dos movimentos peristálticos, associados à ingestão do alérgeno (Akdis & Blaser, 2003). Dentre os mediadores lipídicos, as prostaglandinas, em especial a prostaglandina D₂, são importantes, pois elas atuam em células de musculatura lisa e sustentam a vasodilatação iniciada pela histamina. Além disso, elas promovem a quimiotaxia de neutrófilos em sítios inflamatórios (Bingham & Austen, 2000).

A fase tardia da reação alérgica ocorre com a produção de leucotrienos, citocinas (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, entre outras) e também quimiocinas produzidas por mastócitos. Esses mediadores recrutam eosinófilos e linfócitos Th₂ para o local da inflamação (Lukacs, 2001). É importante salientar que os eosinófilos são recrutados para o tecido inflamado principalmente em resposta à produção local de eotaxina (Foster et al., 2002). No sítio inflamatório, sob o estímulo de citocinas e quimiocinas, essas células podem liberar moléculas pró-inflamatórias que são capazes de induzir a produção de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade vascular e produção de muco (Rothenberg & Hogan, 2006).

SENSIBILIZAÇÃO

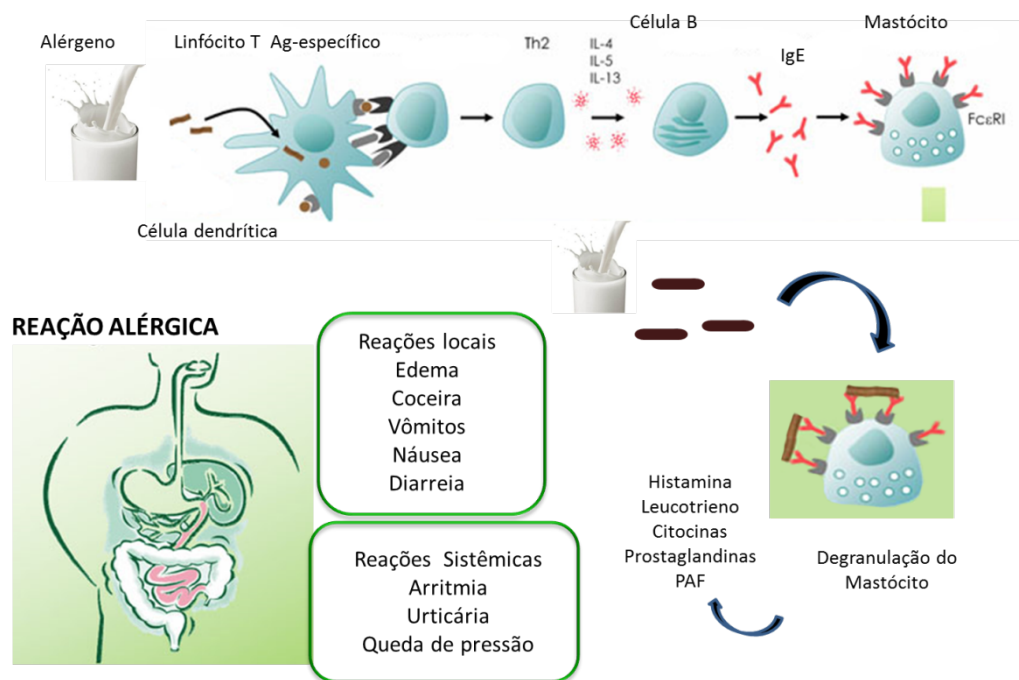


Figura 1 - Mecanismos imunológicos da alergia alimentar. Ao entrar em contato com os alérgenos, células dendríticas fazem a captura desses antígenos e os apresentam aos linfócitos Th antígeno-específicos. Essa apresentação antigênica, aliada à sinalização promovida pela célula apresentadora do antígeno, promove a geração de células Th2 com a liberação de citocinas, dentre elas: IL-4, IL-5 e IL-13. Estimulados por essas citocinas, em especial IL-4, linfócitos B passam a secretar IgE, que se liga em receptores FcεRI em mastócitos, processo conhecido como sensibilização. Em um momento posterior, a nova exposição ao mesmo alérgeno promove a degranulação de mastócitos, que secretam mediadores pró-inflamatórios, levando a sinais clínicos da alergia. PAF: fator de agregação plaquetária.

2.3 Alergia alimentar ao leite de vaca

As alergias alimentares podem afetar entre 1% a 10% da população, podendo prejudicar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos e elas não têm cura. Dentre as alergias alimentares, a alergia às proteínas do leite de vaca é a mais comum e uma das mais agressivas para o organismo (Acker et al., 2017; Nwaru et al., 2014).

O leite de vaca contém duas principais fontes proteicas: as caseínas (30g/L) e as proteínas do soro do leite (5g/L). As caseínas consistem principalmente de: αS1-, αS2-, κ- e β-caseína, enquanto as proteínas derivadas do soro do leite, conhecidas como *whey protein* são: α-lactoalbumina, albumina bovina sérica, imunoglobulinas séricas, lactoferrina e a β-lactoglobulina (BLG) (Monaci L, Tregoeat V, van Hengel AJ, 2006). Estudos realizados com

crianças vêm demonstrando que, dentre essas proteínas, a β -lactoglobulina é considerada a mais imunogênica e também a mais frequente dentre as proteínas do soro do leite. Cinquenta por cento ou mais das proteínas do soro de leite são compostas por BLG (Bahna, 2002; Wal, 2002).

A β -lactoglobulina, também designada por Bos d5, é pertencente a família de alérgenos da lipocalina, contendo duas pontes dissulfeto e um grupo de cisteína livre, consistindo de 162 aminoácidos e 18kDa. Existem duas isoformas da BLG e aparecem em formas de dímeros que estabilizam a porção globular da proteína (Lindholm Bøgh, Barkholt, & Bernhard Madsen, 2013). As variantes genéticas A (BLGA) e a B (BLGB), se diferenciam nos aminoácidos 64 e 118 (ácido aspártico e valina na BLGA e glicina e alanina na BLGB). As pontes dissulfeto nessa proteína contribuem para sua alta estabilidade contra proteases e hidrólises (Wal, 2004).

Embora isolada há algumas décadas, as funções da β -lactoglobulina ainda são desconhecidas. Algumas características descritas dessa molécula incluem sua capacidade de ligação ao cálcio, ao zinco e a algumas moléculas hidrofóbicas, como colesterol e vitamina D₂ (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004; Walzem, Dillard, & German, 2002). Entretanto, Wit e seus colaboradores, em 1998, atribuíram a essa proteína a capacidade de transportar a provitamina A. De acordo com o autor, a BLG é estável frente aos ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, o que a torna um resistente carreador de retinol (provitamina A) da vaca para seu filhote. Contudo, essa função biológica não parece ser crucial para humanos, o que talvez explique o fato do leite humano não conter BLG permanecendo ainda desconhecida, ou possivelmente inexistente, a proteína do leite humano com função equivalente (de Wit, 1998). A família de proteínas a qual a BLG pertence, as lipocalinas (Flower, North, & Sansom, 2000) apresenta uma série de funções, muitas das quais envolvem interação com diversos ligantes e, por isso, especula-se que a BLG possa ter função semelhante, uma vez que a quantidade de BLG no leite de vaca seja bastante significativa, entre 2 a 3g/L, dependendo da raça do animal, dieta e estágio de lactação (Kontopidis et al., 2004).

A resistência da BLG à digestão associada ao fato de não estar presente no leite humano, tem sido proposta como um dos principais fatores que a tornam bastante imunogênica (Fiocchi et al., 2010). Estudos em humanos indicam que até 76% dos pacientes com alergia alimentar ao leite de vaca são alérgicos à β -lactoglobulina (Restani, Ballabio, Tripodi, & Fiocchi, 2009).

As propriedades da BLG têm sido estudadas há algum tempo (Kinsella & Whitehead, 1989). Peptídeos bioativos já foram isolados através de enzimas digestivas, incluindo proteínas de leite (Yamada, Mizushige, Kanamoto, & Ohinata, 2014). A β -lactotensina (His-Ile-Arg-Leu,

HIRL) é um peptídeo que foi isolado da digestão por quimiotripsina da BLG (Yamauchi et al., 2003) e foi demonstrado que ele possui um efeito ansiolítico em camundongos frente a testes comportamentais (Hou et al., 2011) e efeito anti-stress (Yamauchi et al., 2003). Alguns pesquisadores demonstraram que a BLG possui peptídeos que foram denominados wheylin-1 (Met-Lys-Gly) e wheylin-2 (Met-His), sendo que o primeiro apresenta atividade ansiolítica mais pronunciada, um fato que nos chamou a atenção (Yamada et al., 2014).

2.4 Modelos experimentais de alergia alimentar a alérgenos comuns: amendoim, ovo e leite de vaca

Os modelos animais são ferramentas poderosas para ajudar a responder algumas das difíceis questões envolvidas no desenvolvimento da alergia alimentar. As pesquisas em humanos são limitadas por questões éticas e a chance de se gerar uma reação anafilática fatal no indivíduo estudado é preocupante (Bock, Muñoz-Furlong, & Sampson, 2001). Esses fatos têm estimulado o interesse no uso de modelos animais para prever possíveis gatilhos da alergia e identificar quais são os mecanismos que envolvem as vias alérgicas, bem como propor novos tratamentos terapêuticos.

Camundongos são os animais predominantemente utilizados no estudo de várias doenças, devido a seu tamanho relativamente pequeno, ao fato de serem animais prolíficos de ciclo reprodutivo rápido, fáceis de serem acondicionados, de permitirem a manipulação genética e apresentarem um sistema imune muito semelhante ao humano em vários aspectos (Aldemir, Bars, & Herouet-Guicheney, 2009). O uso de camundongos na pesquisa por muitas décadas levou ao contínuo desenvolvimento de ferramentas moleculares que permitiram melhor compreensão dos fenômenos investigados. A caracterização da biologia, imunologia e genética dos camundongos já é bem estabelecida. Todo esse conhecimento fez com que as espécies murinas se tornassem bons modelos para estudar alergia alimentar. Várias linhagens já foram utilizadas nesses estudos, incluindo C3H/HeJ, BALB/c, C57BL/6 e DBA/2 (McClain & Bannon, 2006). Uma das maiores barreiras envolvendo modelos murinos no estudo da alergia alimentar é a forte tendência dos animais escolhidos desenvolverem tolerância oral aos antígenos ingeridos (Bailón et al., 2012; Thang, Baurhoo, Boye, Simpson, & Zhao, 2011). Para evitar esse fato, as pesquisas têm se concentrado em certas linhagens que mais rapidamente desenvolvem uma resposta imune do tipo Th2 (ou seja, indutora de alergia), a saber: C3H/HeJ (X. M. Li et al., 2000; Morafo et al., 2003) e BALB/c (Bailón et al., 2012; Gonipeta, Parvataneni, Paruchuri, & Gangur, 2010; Morafo et al., 2003).

Como a alergia ao amendoim é uma das mais persistentes e pode ser fatal em todas as idades, modelos de alergia a amendoim utilizando camundongos BALB/c tem sido elaborados desde os anos 2000 (X. M. Li et al., 2000; Strid, Hourihane, Kimber, Callard, & Strobel, 2005; Strid, Thomson, Hourihane, Kimber, & Strobel, 2004).

Em 2004, Saldanha e colaboradores também descreveram um modelo murino de alergia alimentar a uma das proteínas da clara do ovo, a ovalbumina (OVA) (Saldanha et al., 2004) Nesse modelo, camundongos BALB/c sensibilizados subcutaneamente com OVA e hidróxido de alumínio como adjuvante com um reforço subcutâneo com o mesmo alérgeno quatorze dias depois foram desafiados, por via oral, com soluções contendo 20% de solução de clara de ovo, contendo aproximadamente 10mg OVA/ml. Uma semana após o desafio oral, os camundongos sensibilizados desenvolvem uma forma de alergia com características semelhantes à alergia alimentar humana. A sensibilização foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgG1 e IgE anti-OVA e, após o desafio oral, esses níveis eram ainda mais elevados. A ingestão do antígeno promoveu aumento da permeabilidade vascular e edema nos vilos do jejuno proximal do intestino. Os camundongos sensibilizados e desafiados com a solução contendo OVA apresentaram infiltrado inflamatório na mucosa do intestino delgado com a evidente presença de eosinófilos. É interessante salientar que os eosinófilos estavam presentes em frequência mais elevada quando comparado aos animais controle não sensibilizados até o fim do desafio oral de 21 dias. Outras observações importantes que marcaram esse modelo de alergia alimentar foram ainda a perda de peso acentuada (20% do seu peso corporal) que ocorre progressivamente durante todo o desafio oral, o aumento de muco e de células caliciformes em camundongos sensibilizados e desafiados. Esse mesmo grupo mostrou, em outro trabalho, que os camundongos BALB/c deficientes para o receptor de IL-4 não produzem IgE quando são sensibilizados e não perdem peso quando desafiados, indicando que o modelo de alergia alimentar a OVA depende da ação da citocina do tipo Th2, IL-4 (Dourado et al., 2010).

O leite está entre os alimentos mais alergênicos e vários modelos para estudar alergia alimentar ao leite foram desenvolvidos. Um dos modelos mais clássicos foi descrito por Li e colaboradores (1999). Os pesquisadores usaram camundongos fêmeas da linhagem C3H/HeJ de três semanas de idade para os quais eram fornecidas, durante seis semanas, diferentes doses de proteínas de leite de vaca acompanhadas de toxina colérica como adjuvante. O desafio oral foi realizado usando duas administrações dessas proteínas por via intragástrica (i.g.) com intervalo de trinta minutos entre elas. Como parâmetros importantes da alergia, foram avaliados o índice de anafilaxia, a permeabilidade vascular, os níveis séricos de IgE, a produção de histamina e de citocinas e a histologia de intestino delgado (Li, 1999). Outro modelo murinho

semelhante utiliza camundongos C3H/HeJ fêmeas de três semanas que, durante cinco semanas, são sensibilizados com proteína de leite de vaca por via intragástrica sendo o teste de anafilaxia realizado ao final de 6 semanas (Man, Bertelli, Regoli, Chambers, & Nicoletti, 2004). O grupo de Frossard e colaboradores (2007) desenvolveu também um modelo utilizando camundongos da linhagem C3H/HeJ fêmeas de 4 a 5 semanas sensibilizados por via intragástrica com BLG e toxina colérica como adjuvante. O desafio era realizado pela mesma via com 100mg de BLG em dose única. O grupo constatou o desencadeamento da alergia pela avaliação do índice de anafilaxia, da permeabilidade vascular, dos níveis de IgE, IgG1 e IgG2a, da proliferação celular e da produção da citocina IL-10 (Frossard, Steidler & Eigenmann, 2007).

Embora esses modelos citados mimetizem características importantes da alergia alimentar ao leite de vaca, consideramos que todos eles requerem intensa manipulação animal, consistindo de protocolos muito longos e de utilização de toxina colérica como adjuvante. Nosso grupo descreveu, em 2015, um novo modelo de alergia alimentar a uma das proteínas mais alergênicas do leite de vaca, a BLG, em camundongos BALB/c com características interessantes: o modelo é barato, envolve pouca manipulação dos animais e é desencadeado por um protocolo rápido (Gomes-Santos et al., 2015). Esse modelo consiste em sensibilizar camundongos BALB/c jovens (6-8 semanas de idade) com 20ug de BLG adsorvida em 1mg de hidróxido de alumínio por via intraperitoneal (i.p.) e, quatorze dias depois, realizar um reforço i.p. na sensibilização, desta vez com BLG diluída em salina. Uma semana após esse reforço (*booster*), é iniciado o desafio oral, substituindo a água das mamadeiras por solução contendo 20% da fração proteica do soro do leite (*whey protein*) contendo o antígeno BLG. Para avaliar os efeitos da alergia alimentar, escolhemos dois tempos experimentais de desafio: durante 7 ou 14 dias de oferta exclusiva de *whey protein* 20%.

Observamos que os camundongos que foram sensibilizados e desafiados com a solução de *whey protein* 20% contendo BLG se tornaram alérgicos. Esses animais perderam peso corporal e tecido adiposo perigonadal, sendo que essa perda não estava associada à redução no consumo de ração. Especulamos que, provavelmente, a perda de tecido adiposo ocorreu devido à intensa inflamação, marcada pelo aumento de eosinófilos e linfócitos intraepiteliais no jejuno proximal, além do encurtamento dos vilos intestinais, um sinal clássico de dano tecidual (Gomes-Santos et al., 2015). Dourado e colaboradores, de fato, evidenciaram que a perda de peso no modelo de alergia alimentar à OVA estava diretamente associada à inflamação alérgica, com aumento de mastócitos no tecido adiposo epididimal em camundongos alérgicos para OVA. Esses autores propuseram que os mastócitos do tecido adiposo podem ser sensibilizados com IgE anti-OVA por meio dos receptores FcεRI. Dessa

forma, a OVA poderia ser parcialmente transportada por quilomícrons até o tecido adiposo. O contato dos complexos IgE-OVA com mastócitos sensibilizados resultaria na produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Dourado et al., 2011).

O desenvolvimento do modelo de alergia alimentar à BLG mostrou, nos parâmetros imunológicos mais importantes, grandes semelhanças com relação ao modelo de alergia alimentar à OVA descrito por Saldanha e colaboradores. Em ambos observamos a produção progressiva de IgE após a ingestão do antígeno nos animais sensibilizados, sinais clássicos de inflamação da mucosa do intestino delgado como o aumento da frequência de eosinófilos e de linfócitos intra-epiteliais, perda de peso acentuada.

No entanto, com relação ao comportamento dos animais notamos uma diferença bastante curiosa. Enquanto que os camundongos BALB/c sensibilizados para OVA apresentam, ao serem desafiados por via oral com uma solução contendo o alérgeno, um comportamento de aversão progressiva ao consumo da solução, os camundongos BALB/c sensibilizados para BLG e posteriormente desafiados com a solução contendo BLG (*whey protein*), não evitam o consumo da solução. Além disto, observamos também que a ingestão da solução contendo BLG era muito apreciada pelos camundongos sendo que o consumo dessa solução foi muito maior do que a ingestão diária normal de líquido pelos camundongos. Ou seja, enquanto que a alergia alimentar à OVA provocava um fenômeno de aversão ao consumo do alérgeno, a alergia à BLG pouco alterava a preferência dos animais pela BLG.

2.5 Os fenômenos de aversão e preferência ao alimento

Evolutivamente, para que um indivíduo de qualquer espécie sobreviva e prospere, alguns comportamentos facilitam a aquisição de comida, sexo e outras recompensas naturais para esse indivíduo, da mesma forma que evitar predadores e situações de desconforto também são comportamentos selecionados evolutivamente. Existe, portanto, um componente biológico robusto para que o sistema nervoso elabore estruturas e mecanismos para gerar comportamentos adaptativos, à base de aversão e recompensa que irão promover a continuidade da espécie (Hu, 2016).

A recompensa induz sentimentos prazerosos, gerando reforço comportamental (Schultz, 2010). Reciprocamente, os estímulos aversivos (ou punições) envolvem emoções negativas, incluindo medo e evasão da situação aversiva. A perspectiva de obter recompensas

ou evitar punições é uma força essencial para a impulsionar a tomada de decisões de um indivíduo (Hu, 2016)

Em 1981, Nelson Vaz observou um fenômeno bastante interessante: a aversão ao antígeno. Camundongos *naïve* quando expostos a variados antígenos, ingerem alimentos de forma preferencial, optando por um alimento em detrimento do outro. É interessante salientar que a seleção da dieta é um problema de extrema complexidade que animais enfrentam constantemente em ambientes naturais, tendo a possibilidade de ingerir uma gama de diversos alimentos, porém, nem todos são consumidos. Além de estar claro que existe um componente biológico que influencia esse fato, sabe-se também que a preferência alimentar está ligada a fatores sociais. O pesquisador Nelson Vaz observou que, se imunizados para o antígeno que antes era preferido, os camundongos alteram seu comportamento e passam a evitá-lo. Esta foi a primeira observação registrada pelo autor sobre esse fato (Dado não publicado).

No ano de 1994, Cara e colaboradores mostraram, pela primeira vez, que camundongos sensibilizados com OVA apresentando níveis altos de IgE específica no soro evitavam o consumo de soluções que continham esse antígeno, ainda que essa solução tivesse concentrações de sacarina para se tornar mais palatável. O protocolo utilizado para avaliar o comportamento dos animais consistia em disponibilizar duas mamadeiras para um teste de preferência. Animais controle ou sensibilizados para OVA recebiam água em uma mamadeira e uma solução de OVA adocicada em outra durante 24 horas sem que houvesse condicionamento prévio dos animais em relação às soluções. Mesmo sendo a solução contendo OVA adocicada mais palatável, camundongos sensibilizados evitavam seu consumo, fenômeno descrito como “aversão antigênica” (Cara et al, 1994). Evidências mais recentes também sugerem que a alergia alimentar influencia o comportamento dos indivíduos e é capaz de alterar funções cerebrais. Um exemplo foi a demonstração de que animais sensibilizados e com aversão ao antígeno apresentavam níveis elevados de ansiedade e aumento na atividade neuronal em áreas do cérebro relacionadas com a percepção emocional (Basso et al., 2003).

Igualmente importante ao fenômeno de aversão, a preferência a um determinado alimento por camundongos pode ser medida por meio de um teste denominado *Two Bottle Test*. Um exemplo dessa aplicação foi publicado por Mirotti e colaboradores (2010). Nesse trabalho, camundongos alérgicos e controles eram individualizados em gaiolas durante três dias sendo fornecidas para eles duas mamadeiras idênticas contendo água. No primeiro dia do teste, uma das mamadeiras era preenchida com uma solução adocicada contendo 20% de clara de ovo associada a adoçantes naturais e artificiais em diferentes concentrações variando de 0,02% de sacarina ou 1%, 4%, 8% ou 16% de sacarose. A segunda mamadeira continha apenas água.

Ambas foram ofertadas para os camundongos alérgicos durante 24 horas, e, de 4 em 4 horas nas primeiras 12h do teste tiveram sua posição na gaiola alterada para evitar preferência por localização. O grupo de pesquisadores mostrou que, ao serem expostos à oferta de OVA com adição de 4% de sacarose, camundongos BALB/c permaneciam com aversão ao antígeno, enquanto que camundongos da linhagem C57BL/6 revertiam totalmente o comportamento aversivo. Esses dados nos permite inferir que a aversão pode ser modulada e que a decisão de evitar o contato com o alérgeno depende da recompensa que é oferecida ao animal quando esse é ingerido (Luciana Mirotti, Mucida, de Sá-Rocha, Costa-Pinto, & Russo, 2010). Esse fenômeno é de extrema importância, pois demonstra uma fina regulação ainda não totalmente esclarecida com relação à escolha pelo alimento ligada à palatabilidade do mesmo e a eventos imunológicos subsequentes.

Os eventos de aversão ao antígeno também ficaram evidenciados em experimentos em que camundongos imunizados para OVA evitaram compartimentos que previamente foram associados com o antígeno ao qual foram expostos em testes comportamentais. Apesar de se sentirem mais seguros em áreas escuras de um determinado ambiente, os camundongos imunizados com OVA evitavam entrar em ambientes que foram expostos à OVA, preferindo áreas mais abertas, antes consideradas mais aversivas (Frederico Azevedo Costa-Pinto, Basso, Britto, Malucelli, & Russo, 2005).

O sabor de uma determinada substância, além de sua função sensorial, é intimamente relacionado a uma série de comportamentos. O sistema gustativo é anatomicamente localizado no início do canal alimentar, sendo essencial na homeostasia entre ingestão de nutrientes e fluidos (Boughter & Bachmanov, 2007). Existe uma relação em termos de conectividade recíproca entre sabor e alimentação em áreas cerebrais (Scott, 2001). O consumo de substâncias adocicadas, por exemplo, envolve a integração entre o sistema periférico sensorial e o sistema nervoso central. A detecção de sabores doces em mamíferos é modulada por fatores neurais e hormonais (Atchley, Weaver, & Eckel, 2005; Curtis, Stratford, & Contreras, 2005). Esse feedback, fornecido por esses fatores, se estende ao nível de receptores celulares para sabores e nervos aferentes (Shigemura et al., 2004; Simon, Liu, & Erickson, 2003). Tradicionalmente, estudos de comportamento baseado na genética de animais foram conduzidos usando teste do tipo *Two Bottle*. Esses testes medem o consumo de uma substância com sabor determinado durante um período de 24 a 48 horas, comparado ao consumo de água. Geralmente, sabores doces são preferencialmente escolhidos, enquanto que sabores amargos são evitados. Estudos mostram que o genótipo para preferência por sacarina

(*Sac*), por exemplo, influencia respostas aferentes de nervos ao sabor adocicado (Bachmanov et al., 1997).

Sabe-se, também, que as escolhas de consumir determinado alimento ou líquido se baseiam também nas vivências do indivíduo. O comportamento de aversão condicionada se dá pelo simples fato de que animais (incluindo os seres humanos) rejeitarão alimentos que previamente os fizeram passar mal ou ficar doente. A aversão a determinados sabores é importante para a sobrevivência, do ponto de vista evolutivo, uma vez que é uma ferramenta que permite aos animais evitar sabores que previamente causaram algum mal estar, ainda que em concentrações pequenas (Gaillard & Stratford, 2016).

Uma das questões interessantes com relação ao comportamento aversivo que acompanha a alergia alimentar é qual seria a relação entre os componentes imunes acionados pela reação alérgica e aqueles do sistema nervoso que desencadeariam comportamentos complexos como a aversão.

2.6 Correlatos neurológicos da atividade imunológica

O sistema imune e o sistema nervoso durante muito tempo foram considerados entidades autônomas e independentes entre si, tendo cada um desses sistemas estruturas e funções distintas e, conseqüentemente, foram estudados separadamente durante muitos anos (Talbot, Foster, & Woolf, 2016) Atualmente existe um consenso de que o sistema imune e o sistema nervoso trabalham de forma integrada em busca da homeostasia do organismo (McMahon, La Russa, & Bennett, 2015). Um dos exemplos dessa funcionalidade está no fato de que neurônios sensitivos respondem a estímulos nocivos e células do sistema imune são capazes de detectar bactérias (Chiu et al., 2013). A interface entre esses sistemas também é notória no fato de que neurônios autonômicos podem suprimir inflamação (Andersson & Tracey, 2012). Ambos sistemas compartilham a habilidade de detectar estímulos ambientais, sinais de perigo e coordenar respostas, sendo mais eficazes trabalhando em conjunto (Talbot et al., 2016).

A comunicação entre esses sistemas, considerando os mecanismos, se dá por meio de receptores de proteína quinase e tirosina quinase na superfície de células, permitindo respostas aos sinais fornecidos (Chiu, Von Hehn, & Woolf, 2012; McMahon et al., 2015). Citocinas como a IL-1 β podem ser detectadas por receptores (IL-1R) expressos em neurônios e gerar dor (Binshtok et al., 2008), impulsos neuronais podem causar a liberação de neurotransmissores

que iniciam inflamação neurogênica e levam à resposta imune. Esses transmissores agem em células imunes que expressam receptores capazes de reconhecer esses neuro-ligantes (Chovatiya & Medzhitov, 2014; McMahon et al., 2015).

As interações neuroimunes ocorrem sob várias perspectivas: respostas a danos teciduais (von Hehn, Baron, & Woolf, 2012), infecções (Chovatiya & Medzhitov, 2014), danos neuronais em respostas autoimunes (Bhat & Steinman, 2009; Talbot et al., 2016) dentre outros. Neurônios sensoriais e células do sistema imune são capazes de detectar estímulos danosos, patogênicos e injúrias teciduais e promover defesa e reparação tecidual (Medzhitov, 2008; Shepherd, Downing, & Miyan, 2005), e expressam receptores para bactérias, ácidos, neuropeptídeos e citocinas inflamatórias. Dessa forma, células do sistema imune respondem a moléculas classicamente definidas como neuropeptídeos, como substância P (SP) (Augustyniak, Nowak, & Lundy, 2012; Franco, Pacheco, Lluís, Ahern, & O'Connell, 2007), fatores de crescimento neurotróficos como o fator de crescimento dos nervos (NGF) (Hepburn et al., 2014), e neurotransmissores como serotonina (5-HT) (Mössner & Lesch, 1998). De forma semelhante, neurônios sensoriais também detectam produtos do sistema imune: IL-1 β (Binshtok et al., 2008), histamina (Shim et al., 2007) e prostaglandina E2 (PGE2) (Samad et al., 2001; Samad, Sapirstein, & Woolf, 2002).

As modulações fisiológicas da imunidade começaram na França, nos anos 1920, com o uso dos estímulos condicionados de Pavlov, revisitados por Ader e Cohen que reafirmaram os fenômenos de imunossupressão condicionada. A dupla de pesquisadores mostrou que foi possível aumentar o efeito imunossupressor da ciclofosfamida quando ratos eram submetidos a um pareamento do gosto de uma solução contendo sacarina com a exposição dos efeitos adversos da ciclofosfamida (Ader & Cohen, 1975). Esses experimentos foram muito importantes para revelar a rede de comunicações entre os sistemas nervoso e imune. Coletivamente, as pesquisas interdisciplinares ganharam campo cada vez mais amplo: neuroanatomistas demonstraram a existência de inervações simpáticas em órgãos linfoides primários e secundários neuroendocrinologistas descreveram a expressão e função de alguns receptores neuroendócrines em células do sistema imune (Middleton, 1970; Pert, Weber, Herkenham, & Herkenham, 2018), e biólogos celulares mostraram que a ativação de células do sistema imune é capaz de liberar fatores moleculares identificados anteriormente no sistema neuroendócrino, como a adrenocorticotrofina. Adicionalmente, Besedovsky e colaboradores (Besedovsky & Sorkin, 1977) demonstraram, elegantemente, a ativação do eixo hipotálamo-pituitária (HPA) e o sistema nervoso simpático durante a produção de anticorpos em

camundongos vacinados com antígeno específico para linfócitos T, porém, a base molecular que explicaria esses fenômenos ainda não foi elucidada.

A interação entre sistema imune e sistema nervoso é visível também diante de uma resposta a um agente infeccioso, por meio do comportamento de indivíduos doentes frente à doença: inatividade, diminuição da responsividade a estímulos externos, perda de apetite, sono e isolamento social são os sinais mais usuais em uma infecção de origem microbiana. Tais alterações comportamentais são associadas frequentemente a mal-estar e dor, sendo estratégias do organismo para adaptação ao custo metabólico caro de construir uma resposta imune e febre (B. L. Hart, 1991; Benjamin L. Hart, 2011). Durante muito tempo, os estudos de comportamento relacionado a produção de citocinas esteve focado nos eventos de febre e ativação do eixo HPA, porém, depois da identificação da relação entre doença e depressão, um novo campo de estudo tem surgido entre os sistemas imune e nervoso. Por exemplo, as alterações comportamentais em animais injetados com LPS ou citocinas é similar às mudanças em indivíduos doentes (Gautron et al., 2013)

Neal Miller foi o primeiro pesquisador a propor que as alterações comportamentais desenvolvidas em indivíduos doentes são a expressão de um estado motivacional que compete com comportamentos normais. Sua hipótese foi baseada na observação de que ratos injetados com endotoxinas eram menos dispostos a trabalhar por comida, água ou para ganharem recompensas estimulatórias, porém, esses mesmos animais ainda eram capazes de se esforçar em troca de descanso quando eram submetidos a testes de esforço (Dantzer, 2018).

Esses estudos sugerem que reações imunológicas podem acionar componentes do sistema nervoso e interferir ou mesmo desencadear comportamentos complexos como a busca de recompensa, o medo e a ansiedade.

2.7 Circuitos neurais e imunes

Em um contexto evolutivo, medo e ansiedade são emoções naturais que aumentam a chance de sobrevivência dos indivíduos frente a diferentes estímulos estressógenos e, portanto, possuem um valor adaptativo de suma importância (Blanchard, Griebel, & Blanchard, 2003; Nesse, 1999). A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação considerada aversiva, de difícil controle e de provável ocorrência. O medo, no entanto, pode ser definido como uma reação a uma situação real considerada perigosa, bem definida e, para muitos autores, é um estado que pode ocorrer independente da ansiedade. Ainda assim, pode ser difícil separar ambas situações (Ramos & Mormède, 1997).

O circuito neural envolvido em medo/ansiedade, tanto natural quanto patológico, envolve, primeiramente a percepção e integração de informações sensoriais que são provenientes de diversos estímulos que sinalizam perigo (sendo inatos ou aprendidos). Durante e após o processamento sensorial, as informações resultantes são enviadas ao tálamo que, por sua vez, projeta tais informações para a amígdala. Essa projeção pode ocorrer basicamente por dois caminhos distintos: uma via direta (tálamo-amígdala) e uma via indireta, com interface com regiões corticais (tálamo-córtex-amígdala), que organizam, então, uma série de reações fisiológicas aos estímulos capturados, gerando comportamentos de defesa para o organismo. As informações provenientes da via indireta são enviadas pelo tálamo ao córtex cerebral, o qual, após análise mais refinada das informações de perigo/atenção, projeta, então, para a amígdala, uma estrutura relacionada a processamentos emotivos (Fanselow & LeDoux, 1999).

Em neurociências comportamentais, como biopsicologia e a neurobiologia, os modelos animais permitem investigar as relações entre o cérebro e o comportamento, com a finalidade de relacionar o comportamento humano e seus processos neuronais e neuroendocrinológicos subjacentes. As informações mais relevantes, certamente, são provenientes dos estudos em humanos, porém, nem sempre são possíveis. As disfunções comportamentais e os processos neurobiológicos somente podem ser investigados em humanos em um ambiente clínico controlado, logo uma abordagem comparativa baseada em modelos animais pode ser usada para responder questões relativas a comportamentos e seus componentes neurais (van der Staay, 2006).

Nos anos 80, Handley tentou classificar os modelos animais de ansiedade de acordo com a natureza do estímulo aversivo ao qual eram submetidos e a consequente resposta evocada em tal situação, sugerindo que o controle neuronal da ansiedade pode diferir de acordo com a interpretação do estímulo aversivo. A interpretação dos sinais aversivos podem ser inatas ou aprendidas e podem gerar respostas de ação frente a esse estímulo ou inibir comportamentos prolongados que geram recompensas (Bourin, Petit-Demoulière, Nic Dhonnchadha, & Hascöet, 2007).

Os modelos animais de ansiedade podem ser divididos em dois grupos: o primeiro envolve respostas condicionadas do animal frente a estímulos estressores ou dolorosos, por exemplo, exposição a choques controlados na pata e, o segundo, inclui comportamentos que são reações espontâneas e naturais frente a uma determinada situação, por exemplo, aversão e *freezing* e ainda estímulos que não geram dor e desconforto físico, por exemplo a exposição dos animais a uma câmera iluminada ou a um predador (Bourin et al., 2007).

Uma das formas de se testar os comportamentos em roedores é através do labirinto em cruz elevado (LCE) (Handley & Mithani, 1984). O LCE é um modelo animal etologicamente baseado no medo natural e instintivo de roedores a espaços abertos e elevados, inicialmente desenvolvido para estudar comportamentos de ratos (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). A exposição ao labirinto em cruz elevado consiste em introduzir ratos ou camundongos na encruzilhada de quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados, dispostos perpendicularmente uns aos outros e elevados cerca de 50cm em relação ao solo, combinando elementos de não familiarização com a situação a qual estão expostos, ambiente aberto e elevado, situações naturalmente aversiva para roedores que tendem evitar espaços abertos, gerando um conflito entre exploração e a aversão (Bourin et al., 2007).

Quando os animais são colocados frente a essa situação experimental, tendem a evitar os braços abertos, permanecendo nos braços fechados, consideradas mais seguros. A altura e, principalmente, os braços abertos e a novidade do ambiente são as principais causas do comportamento de defesa em se esconder nos braços fechados (Treit, Menard, & Royan, 1993). Os testes no labirinto em cruz elevado analisam comportamentos espontâneos e não condicionados, uma vez que irão levar em conta neofobia e aversão (Bourin et al., 2007).

Lister, em 1987, validou o modelo do labirinto em cruz elevado para camundongos durante estados de ansiedade (Lister, 1987). Os índices primários de ansiedade no labirinto em cruz elevado eram a frequência de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos. O número de entradas (total de entradas = número de entradas no aberto + número de entradas no fechado) sendo considerado como índice de atividade locomotora (Treit et al., 1993). A ordem de preferência dos camundongos frente ao LCE é: estar em braços fechados, no centro do aparato e, por último, expostos em áreas abertas. Essa tendência pode ser modificada com o uso de ansiolíticos e é potencializada frente a agentes ansiogênicos (Bourin et al., 2007). Tradicionalmente, os escores medidos no LCE são feitos por meio de vídeos ou enquanto o teste é realizado por um observador treinado. Os camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento de avaliação de risco (*risk assessment*) o que pode ser relacionado ao estado de hipervigilância apresentada por indivíduos ansiosos (Blanchard et al., 2003). A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento de caráter evolutivo e adaptativo. No LCE para camundongos, em alguns laboratórios, novas medidas estão sendo utilizadas, como *head-dipping* (movimento exploratório com a cabeça para os lados dos braços abertos), espreitas e retornos aos braços fechados, que parecem participar dos requisitos de uma avaliação de risco (*risk assessment*). Assim sendo, os animais mais cautelosos se aproximarão vagarosamente da saída da plataforma

central, exibindo alta frequência de espreitas, de *head dippings* e de retornos aos braços fechados (Rodgers & Johnson, 1995).

2.8 A alergia como proteção do organismo

A reatividade alérgica permanece sendo um dos grandes mistérios da atividade imunológica. O sistema imune é capaz de proteger o hospedeiro contra uma variedade de agentes infecciosos. Os mamíferos, em especial, desenvolveram diversas estratégias para lidar com os mais variados tipos de patógenos. A imunidade referida como tipo I atua principalmente na morte direta de patógenos ou células infectadas e é composta por Th1, Th17, células citotóxicas e algumas classes de anticorpos como IgM e IgG. Por outro lado, a imunidade tipo II protege contra macroparasitas, por exemplo, helmintos e é mediada por células Th2 e anticorpos IgE, se valendo de defesas como barreiras epiteliais, produção de IgG, mastócitos, basófilos, eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados (Allen & Maizels, 2011; Anthony, Rutitzky, Urban, Stadecker, & Gause, 2007).

É estabelecido que respostas Th2 e IgE são responsáveis por proteger o organismo contra parasitas multicelulares. Entretanto, há que se considerar que essas mesmas respostas que seriam protetoras podem causar eventos alérgicos quando, de forma inadvertida, são ativadas por antígenos ambientais não infecciosos. Essa resposta, então, passa a ser vista como uma exacerbação de respostas tipo II que são nocivas para o organismo. Essa concepção traz alguns problemas, por exemplo: embora alguns alérgenos possam mimetizar atividades imunogênicas relacionadas a macroparasitas, por exemplo, quitina, a maioria dos alérgenos não apresenta similaridade com helmintos (McKerrow, Caffrey, Kelly, Loke, & Sajid, 2006).

Um outro fato bastante intrigante é que as reações anafiláticas aos alérgenos ocorrem de forma bastante rápida, ao passo que a replicação dos parasitas multicelulares ocorre de forma lenta, em horas ou dias, portanto, não existe, até então, uma razão de fato óbvia para que haja uma resposta de extrema urgência a eles (Palm, Rosenstein, & Medzhitov, 2012). Outro ponto muito importante é que a hipersensibilidade alérgica depende da ativação de mastócitos e basófilos por IgE. De fato, os níveis de IgE em camundongos ou humanos com infecções por helmintos é alto, entretanto, a IgE por si só é dispensável na imunidade contra a maior parte dos helmintos (Harris & Gause, 2011). Outro fato interessante é que entre os maiores alérgenos ambientais, como pólen, amendoim, venenos de insetos, látex, penicilina, frutos do mar e outros, não existem características químicas similares que possam, de fato, explicar sua alergenicidade (Thomas, Hales, & Smith, 2005).

Um outro olhar sobre a função imunológica da alergia vem sido pensado há algumas décadas. Em 1965 foi demonstrado pela primeira vez um papel benéfico dos mastócitos na desintoxicação de venenos e na proteção contra efeitos nocivos do envenenamento (Higginbotham, 1965). Com isso, uma alternativa que explicaria a existência de reações alérgicas, porém bastante ignorada na ciência, seria a proteção contra toxinas ambientais (Higginbotham & Karnella, 1971; Profet, 1991). Essa visão traz a ideia de que as respostas alérgicas podem ser intencionais e benéficas, não se tratando apenas de consequências patológicas na defesa contra parasitas.

Situações de envenenamento podem causar danos teciduais severos ao indivíduo, porém as respostas alérgicas que são geradas pelo contato com os venenos podem ter evoluído para proteger o organismo do contato direto com esses danos e, então, a anafilaxia se resultaria de um resultado exacerbado dessa proteção, particularmente quando essa resposta é sistêmica (Higginbotham & Karnella, 2012; Metz et al., 2006). A exposição a haptenos reativos também podem estimular a ativação inflamatória (Sutterwala et al., 2006) e induzir reações de hipersensibilidade na pele, mediada principalmente por Th1 e T CD8+ (Kalish & Askenase, 1999) Entretanto, quando essa barreira da pele é rompida, os haptenos induzem respostas do tipo Th2 (Kondo, Ichikawa, & Imokawa, 1998), contribuindo para uma proteção contra agentes químicos nocivos. As respostas alérgicas podem proteger desses xenobióticos por meio do aumento na produção de muco, hiperplasia dos queratinócitos, prurido, broncoconstrição, vômito e diarreia. Todas essas reações podem ou reduzir a entrada de antígenos ou expulsá-los (Palm et al., 2012).

A detecção de substâncias nocivas também se dá devido ao reconhecimento dos estímulos que induzem defesas alérgicas através de caminhos somato-sensoriais. As fibras nervosas do tipo C são relevantes nesse contexto de inflamação alérgica, podendo ser estimuladas por mediadores endógenos de danos teciduais. A substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) produzidos pelas fibras do tipo C tem atividade inflamatória e induzem degranulação e mastócitos, promovendo uma conexão importante entre os danos teciduais e a inflamação alérgica. As fibras do tipo C podem ser ativadas por histamina e outros mediadores derivados da degranulação de mastócitos (Jeffrey, Kim, & Chen, 2011). A interação entre IgE e mastócitos é importante para a ativação das vias somato-sensoriais por alérgenos que se ligam à IgE, consequentemente, pode-se inferir que haja uma associação entre o reconhecimento antigênico pela IgE associada a estímulos variados, resultando em reações alérgicas condicionadas (Siegel & Kreutzer, 1997).

A estratégia de evitar exposição a substâncias ambientais consideradas nocivas por meio da hipersensibilidade alérgica pode ser benéfica afim de proteger o organismo e promover sobrevivência em condições ambientais hostis. Após o contato com substâncias nocivas e a geração de IgE específica para as mesmas, é gerada uma memória ao alérgeno que o indivíduo entrou em contato, provocando uma sensibilização ao mesmo. Posteriormente, qualquer contato com o mesmo antígeno, ainda que em quantidades pequenas, é capaz de gerar uma reação alérgica que possui funções importantes para esse organismo: minimizar os efeitos alérgicos, por exemplo, evitando o espalhamento desses antígenos, promovendo desintoxicação e expulsão dos mesmos. Em segundo lugar, esses indivíduos passam a evitar ambientes que contém o alérgeno, como forma protetora de sobrevivência (Palm et al., 2012).

Assim, a alergia e suas consequências podem estar conectadas a comportamentos selecionados como protetores do organismo. Como esses comportamentos podem ser desencadeados ou modificados pela atividade imunológica ainda é uma área amplamente desconhecida. Alguns modelos experimentais de alergia podem, no entanto, ajudar a desvendar esses enigmas.

O estudo paralelo dos modelos de alergia alimentar a OVA e a BLG particularmente tem se mostrado bastante frutífero como forma de entender a relação entre alergia, comportamento e circuitos neurais. A alergia alimentar à BLG tem similaridades com a alergia experimental à OVA em camundongos BALB/c (Saldanha et al., 2004) no que se refere ao perfil inflamatório e produção de IgE específica quando camundongos são desafiados por 7 ou 14 dias com solução contendo o alérgeno (Lemos, 2015). Porém, nos chamou atenção o fato de que, no modelo de alergia à BLG, a produção de IgE específica aumentou com a exposição continuada ao antígeno e, concomitantemente, os camundongos continuaram bebendo a solução contendo BLG. Assim, enquanto que a aversão ao consumo do alérgeno acompanha o desenvolvimento da alergia alimentar à OVA, os camundongos alérgicos à BLG não apresentam o mesmo comportamento.

Como o fenômeno da aversão está associado a um comportamento evolutivamente conservado e aparentemente protetor, nosso objetivo neste estudo foi estudar em maior detalhe as relações entre a alergia alimentar à BLG e os correlatos comportamentais e neurais ligados a ela.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar os mecanismos neuro-imunológicos envolvidos na aversão e na preferência ao consumo do alérgeno no modelo experimental de alergia alimentar à β -lactoglobulina (BLG).

3.2 Objetivos específicos

- 1- Investigar o fenômeno da aversão ao antígeno ingerido.
- 2- Avaliar o comportamento animal em camundongos desafiados com BLG purificada.
- 3- Estudar os correlatos neuro-imunológicos envolvidos na preferência alimentar à ingestão da BLG em camundongos alérgicos a esse antígeno.
- 4- Comparar a ativação neuronal em áreas do sistema nervoso central relacionadas com ansiedade e com recompensa entre camundongos alérgicos e não alérgicos para BLG.

4 Metodologia

4.1 Animais

Camundongos BALB/c machos com seis a oito semanas de idade foram adquiridos pelo CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia, em gaiolas abertas. Os animais receberam água “*ad libitum*” durante todo o experimento e ração comercial para camundongos (Purina, São Paulo, SP) até o desafio antigênico oral. Todos os procedimentos utilizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais experimentais da UFMG (CEUA UFMG - Protocolo 085/11).

4.2 Indução da Alergia Alimentar

O protocolo de indução da alergia alimentar foi desenvolvido baseado em Saldanha e colaboradores (2004). Os camundongos foram imunizados por via intraperitoneal com 20 µg de BLG + 1 mg de Al (OH)₃ recebendo um reforço i.p. com 20 µg de BLG solúvel 14 dias depois. O desafio oral consistiu na oferta exclusiva de solução contendo *whey protein* 20% por 7 ou 14 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados ao final da última administração de BLG na mamadeira. A *whey protein* foi gentilmente cedida pela empresa EDETEC. Esse concentrado de proteínas do soro do leite continha em torno de 80% de BLG.

Parte dos experimentos foi realizada seguindo o mesmo protocolo acima, porém, durante o desafio oral os camundongos receberam, alternativamente, 1mg/ml de BLG ou de OVA ou soluções misturadas de OVA + BLG na concentração de 1mg/ml.

4.3 Consumo de líquido da mamadeira

O consumo líquido foi mensurado por meio da verificação da quantidade remanescente de líquido na mamadeira e da quantidade ofertada no dia anterior. Assim, a partir da quantidade consumida pelos animais da gaiola, foi feita a média de consumo por grupo.

4.4 Teste de preferência alimentar

Para verificar se os animais apresentavam alguma preferência ao consumo de BLG em detrimento de água, realizamos um teste de preferência alimentar (*two-bottle test*). Três dias

antes de o teste ocorrer, os animais foram separados individualmente em gaiolas convencionais do biotério para que pudessem se acostumar ao novo ambiente. Nesse mesmo dia, duas mamadeiras idênticas, transparentes, com bicos de vidro e contendo água foram colocadas para cada animal, de forma que ele pudesse optar entre as mamadeiras. O objetivo foi, novamente, ambientá-los na nova situação. No dia do teste de preferência alimentar, foram colocadas duas mamadeiras por gaiola: uma contendo a solução antigênica e a outra apenas água. Foram mensuradas as quantidades de líquido ingerido de 4 em 4 horas durante um período de 24 h, que se deu no primeiro dia de desafio oral. A cada mensuração, em provetas, as mamadeiras eram novamente preenchidas com o líquido, porém, trocava-se a posição das mesmas, para evitar o condicionamento pela localização delas na gaiola.



Figura 2 - Imagem representativa do posicionamento das mamadeiras na gaiola experimental para o teste de preferência alimentar. As mamadeiras eram trocadas de posição a cada 4 horas e media-se o consumo do animal durante esse período, totalizando 24 horas, sendo 6 medidas ao longo do experimento. Os animais foram mantidos individualmente separados durante este teste.

4.5 Coleta do Soro

Após anestesia, os animais tiveram o sangue retirado por meio do plexo subaxilar e colocados em tubos de 1 mL para posterior centrifugação. Para a separação do soro, o sangue foi transferido para geladeira a 4°C, onde permaneceu durante 15 minutos. Após esse procedimento, o sangue foi centrifugado a 10.000 RPM por mais 15 minutos. Após a centrifugação, o soro foi separado com pipeta e congelado a -20 °C para posteriores análises.

4.6 ELISA para medida da concentração de IgE sérica anti β -lactoglobulina

A quantificação da produção de IgE específica para BLG foi realizada pelo método ELISA. As placas foram incubadas com solução (50 μ l/poço) contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongos 0,5 mg mL⁻¹ (Southern Biotechnology) e diluídos (1:250) em tampão carbonato pH = 9,6 por, no mínimo, 18 horas a 4 °C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% m/V caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 μ l/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05% V/V Tween-20 por duas vezes. O soro dos animais (50 μ L soro) foi incubado por 2 h em temperatura ambiente no escuro. Na seqüência, as placas foram novamente lavadas e realizou-se a incubação com BLG + Biotina (1mg/ml), sendo 50 μ L por poço por 1h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas por cinco vezes com solução salina-0,05% V/V Tween-20 e incubadas com estreptavidina ligada a peroxidase (Sigma), 50 μ L/poço na concentração de 1:10000, por 1 hora em temperatura ambiente; finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo conjugado foi feito através da incubação com 4 mg de OPD, 2 μ L de H₂O₂ diluídos em 10 mL de tampão citrato pH 5,0 a 100 μ l/poço. A reação foi paralisada pela adição de 20 μ L/poço de H₂SO₄ 2N. A leitura realizada em leitor de ELISA automático, em comprimento de onda de 492 nm. A reação de ELISA descrita acima teve como controle positivo (padrão), soro de animal imunizado. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

4.7 ELISA para medida da concentração sérica de IgG1 anti β -lactoglobulina

Resumidamente, placas foram incubadas com 100 μ L/poço de uma solução de BLG (2 μ g/poço) diluída em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, após 5 lavagens, foi feito o bloqueio com 200 μ L/ poço de PBS-caseína, por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Após essa etapa, foi adicionado o soro diluído a 1:400, realizadas diluições seriadas e as placas foram incubadas a 37 °C durante uma hora. Após lavagem, foram adicionados os anticorpos anti-isotipo marcados com peroxidase (*Goat anti-mouse IgG1-HRP* Southern Biotechnology Associate Inc) na diluição de 1:15.000 Após incubação durante a 37°C, foi usado o sistema de revelação com H₂O₂ + OPD já descrito anteriormente.

4.8 Teste comportamental em Labirinto elevado (*Zero Maze*)

As análises de comportamento em labirinto foram realizadas no “*Zero Maze*”, similar a um labirinto em cruz elevado (Cruz, Frei, & Graeff, 1994). Esse labirinto é um equipamento feito de plástico e tem dois braços abertos e dois braços fechados e é posicionado de forma que fique a uma altura de 100 cm acima do chão e os braços similares (abertos ou fechados) são posicionados em lados opostos. Para o teste, cada camundongo é colocado, individualmente, na área central do labirinto, onde podem explorar livremente por 15 minutos. O tempo gasto nos braços abertos e fechados é registrado por vídeo, assim como o número de entradas e saídas em cada braço. A porcentagem de tempo gasta nos braços abertos do labirinto é inversamente correlacionada ao nível de ansiedade no teste.

4.9 Quantificação de c-fos no cérebro por imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados com cetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/kg) e perfundidos transcardialmente com tampão fosfato-salino (PBS) 0.01M e paraformaldeído (PFA) 4%. Os cérebros foram pós-fixados *overnight* em PFA 4% e armazenados em solução de sacarose 30% (p/v) a 4°C. Secções (40µm de espessura) foram cortados em um criostato (Leica, CM 1860) e guardados a -20°C em solução crioprotetora (etilenoglicol 30%, sacarose 30%, polivinilpirrolidona 1% e PBS 0.1M). As fatias foram submetidas à imunohistoquímica *free-floating*. Brevemente, as secções foram lavadas em PBS (10x6min) e incubadas em glicina 0.1M em PBS por 10min. Em seguida, foram lavadas em PBS (3x6min) e incubadas em H₂O₂ em PBS por 10min. As fatias foram lavadas em PBS (5x6min) e em seguida em PBS com Triton X-100 (PBS-T) por 30min. Logo após, as fatias foram novamente lavadas em PBS (3x6min) e incubadas na solução de bloqueio (BSA 3% em PBS). Após o bloqueio as fatias foram incubadas na solução de bloqueio com o anticorpo de cFos (1:1500; Santa Cruz, sc-52) a 4°C por 48h. As fatias foram então lavadas em PBS (10x6min) e incubadas com o anticorpo secundário em solução de bloqueio (1:1000, anticorpo biotilado anti-IgG cabra anti-coelho; Vector Laboratories) por 2h em temperatura ambiente. Em seguida as secções foram lavadas em PBS (8x6min) e incubadas com o complexo avidina-biotina (1:500 em PBS; Vector Laboratories) durante 1h em temperatura ambiente e lavadas em PBS (3x6min) e tris-HCL (0.05M; pH 7.6) (3x6min). Após as lavagens as fatias foram incubadas na solução corante (diaminobenzidina (DAB) 0.2mg/mL, sulfato de níquel 25mg/mL e H₂O₂ em tris-HCL 0.05M)

por 10min e lavadas em tris-HCL (3x6min) e PBS (3x3min). Por fim, as secções foram diafanizadas e montadas em entellan.

4.10 Análise Estatística

A significância estatística dos dados obtidos para os grupos foi analisada por meio da utilização do teste de variância ANOVA, com utilização do pós-teste de Tukey, a fim de comparar os grupos experimentais. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O programa utilizado para fazer os testes foi o GraphPad Prism[®] versão 6.

5 Resultados

5.1 Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados com *whey protein* se tornaram alérgicos

Os camundongos BALB/c, ao serem submetidos ao protocolo de sensibilização intraperitoneal com a solução contendo o antígeno adsorvido em adjuvante $[Al(OH)_3]$ e salina, se tornaram alérgicos após o desafio oral com *whey protein* a 20% (contendo BLG). Os níveis de IgE específicas para BLG estavam elevados nos animais que foram previamente sensibilizados e posteriormente desafiados, porém, em animais não sensibilizados e expostos à mesma solução, os níveis de IgE não se mostraram elevados em nenhum dos tempos experimentais, durante desafio oral de 7 ou 14 dias (Figura 3). O grupo de animais sensibilizados que recebeu água durante todo o experimento, ou seja, não desafiado oralmente, apresentou níveis mais altos de IgE anti BLG que os animais não sensibilizados, porém, esses níveis ainda foram significativamente menores quando comparados aos animais sensibilizados e desafiados com o mesmo antígeno. Observamos também que os animais sensibilizados e desafiados oralmente por 14 dias apresentavam níveis mais altos de IgE quando comparados aos animais que consumiram o antígeno por 7 dias, mostrando que a ingestão da solução contendo BLG por períodos mais prolongados foi capaz de gerar um aumento progressivo de IgE específica.

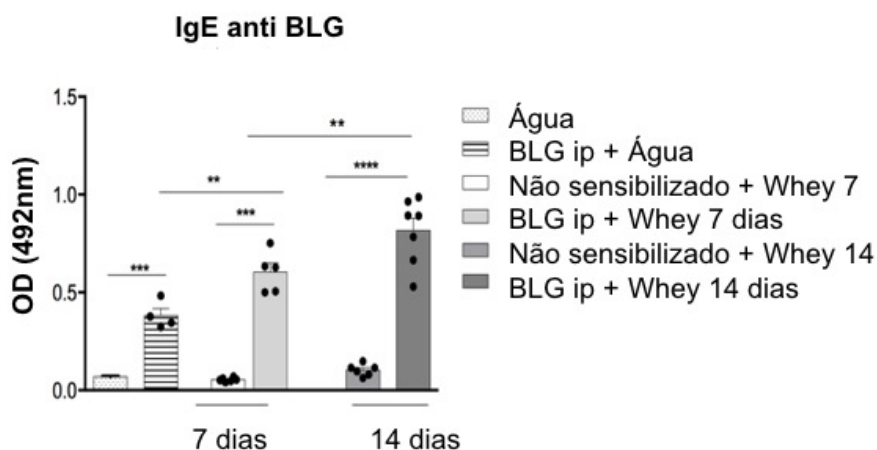


Figura 3 - Níveis séricos de anticorpos IgE anti-BLG. Camundongos BALB/c foram imunizados i.p. com 20ug de BLG + 1mg de $[Al(OH)_3]$, 14 dias depois receberam imunização secundária (20ug de BLG em 200ul de salina) e foram desafiados 7 dias depois da imunização secundária com solução contendo 20% de Whey Protein como única fonte de líquido por 7 ou 14 dias. As barras representam os níveis séricos de IgE anti-BLG medidos por ELISA 24 horas depois do final do desafio oral. O grupo controle água consistiu de camundongos não manipulados. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 4-7) da absorvância obtida em soro total (sem diluir) e expressa em densidade óptica. $P < 0,05$

5.2 Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados oralmente com *whey protein* desenvolveram aversão parcial ao antígeno

O fenômeno de aversão ocorre quando os animais evitam consumir soluções ou dietas contendo o antígeno para o qual são alérgicos (Cara et al, 1994). Para aferir se os animais alérgicos à BLG apresentavam diferenças quanto ao consumo de solução de *whey protein* 20% (contendo BLG), avaliamos diariamente o consumo dessa solução fornecida em mamadeiras. Após 7 ou 14 dias de desafio oral, os camundongos controles não sensibilizados consumiram quantidades elevadas da solução contendo o antígeno, o mesmo acontecendo com os animais alérgicos, embora tenha ocorrido diferença significativa no consumo desses dois grupos. Quando comparados ao grupo controle não sensibilizado que ingeriu apenas água, observamos que os animais alérgicos consumiram menos líquido em relação aos não alérgicos. Ainda assim, esse consumo foi muito maior do que aquele observado para os camundongos controle que ingeriram água (figura 4A).

A partir do 12º dia, os animais sensibilizados e não sensibilizados consumiram a mesma quantidade de solução contendo antígeno (figura 4A). Porém, é interessante notar que nesse experimento, os camundongos não tinham opção de escolha entre soluções, consumindo, então, como fonte única a solução de *whey protein* a 20%. Como observamos que havia uma diferença no consumo líquido de *whey protein* nos últimos dias de desafio oral no tempo experimental de 14 dias, decidimos quantificar, separadamente de acordo com os dias de 0 a 7 e de 7 a 14, a quantidade de líquido ingerida. Como podemos observar (figura 4B), o consumo líquido dos camundongos não sensibilizados que ingeriram água foi igual entre os tempos avaliados. Porém, confirmando os dados acima, nos camundongos sensibilizados com BLG que ingeriram *whey protein* 20%, houve um aumento no consumo líquido quando comparado ao consumo nos primeiros 7 dias de desafios com os dias restantes até o décimo quarto dia, em que o consumo é igual entre camundongos alérgicos e não alérgicos (figura 4A). Esse fato intrigante nos sugeriu que embora houvesse uma aversão ao consumo de solução contendo o alérgeno (figura 4C), essa aversão poderia ser chamada de parcial levando em consideração os resultados supracitados. Para avaliar o grau de aversão à solução contendo BLG, realizamos uma comparação da redução do consumo da solução contendo o alérgeno em relação ao consumo de água ou do alérgeno OVA (figura 4D). Podemos observar que há uma redução de 55% de consumo entre os camundongos sensibilizados para BLG que consumiram solução de *whey protein* contendo BLG em relação ao seu grupo controle não sensibilizado. Surpreendentemente, observamos que o consumo de *whey protein* em camundongos não

sensibilizados era o dobro em relação à água, logo, os camundongos sensibilizados com BLG e desafiados com *whey protein* consumiram 45% mais líquido quando comparado com a ingestão padrão de líquido (água). Ao compararmos os valores desse consumo em camundongos sensibilizados para OVA que consumiram solução contendo OVA, com seus controles não sensibilizados, observamos que a redução também é de 55%. Porém, a aversão à OVA parece ser mais robusta, uma vez que os camundongos alérgicos à OVA consomem 46% menos líquido quando comparado ao consumo da água, representando o controle da ingestão líquida diária dos animais (Figura 4D).

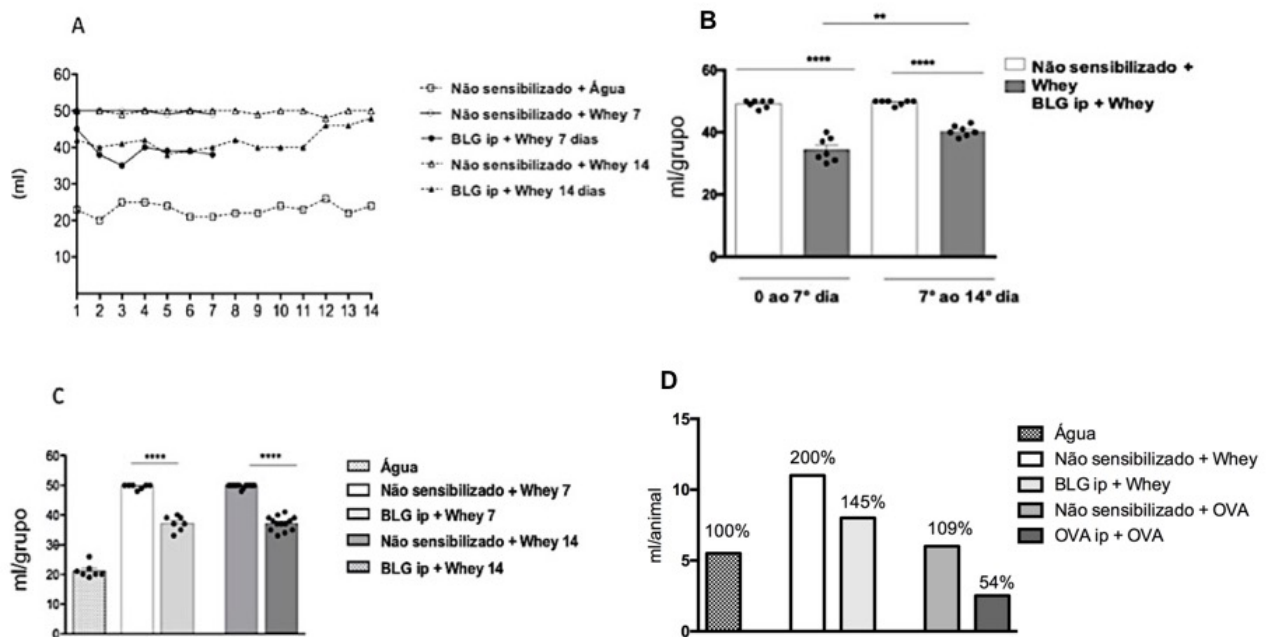


Figura 4 - Consumo da solução contendo o alérgeno em camundongos alérgicos a BLG durante o desafio oral. Camundongos BALB/c não sensibilizados (Não sensibilizados + *Whey*) e os sensibilizados (BLG ip + *Whey*) foram desafiados oralmente com uma solução contendo *whey protein* a 20% durante 7 ou 14 dias. Diariamente, nesses dois tempos experimentais, a quantidade de líquido consumida por grupo era mensurada. (A) Média do consumo líquido ao longo do desafio oral. (B) Média do consumo líquido de cada grupo diferenciando os primeiros sete dias de desafio oral e os sete dias finais. (C) Média do consumo líquido de cada grupo durante o desafio oral. Os resultados foram expressos em média de consumo (em ml) + e.p.m., por grupo de 5 animais ao longo dos tempos experimentais de 7 ou 14 dias de desafio oral. O grupo água oral representa animais não manipulados como controle do consumo líquido em geral ao longo dos dias. (D) Variação total em porcentagem do consumo comparativo de camundongos sensibilizados com BLG que beberam *whey* em relação ao seu controle não sensibilizado que beberam água e camundongos sensibilizados com OVA que beberam solução contendo OVA em relação ao seu controle não sensibilizado que ingeriu OVA ou água.

Esse resultado é bastante curioso, pois quando a antígeno OVA foi testado como alérgeno no mesmo modelo de alergia alimentar, os animais que apresentaram níveis de IgE após sensibilização e desafio oral com OVA 20% (figura 5A) apresentaram redução significativa do consumo do alérgeno OVA (aversão) durante todo o período do desafio (figura 5B). Essa aversão é bastante acentuada e, nestes experimentos, mostramos que houve uma redução de 47% no consumo por parte dos camundongos alérgicos (figura 5C).

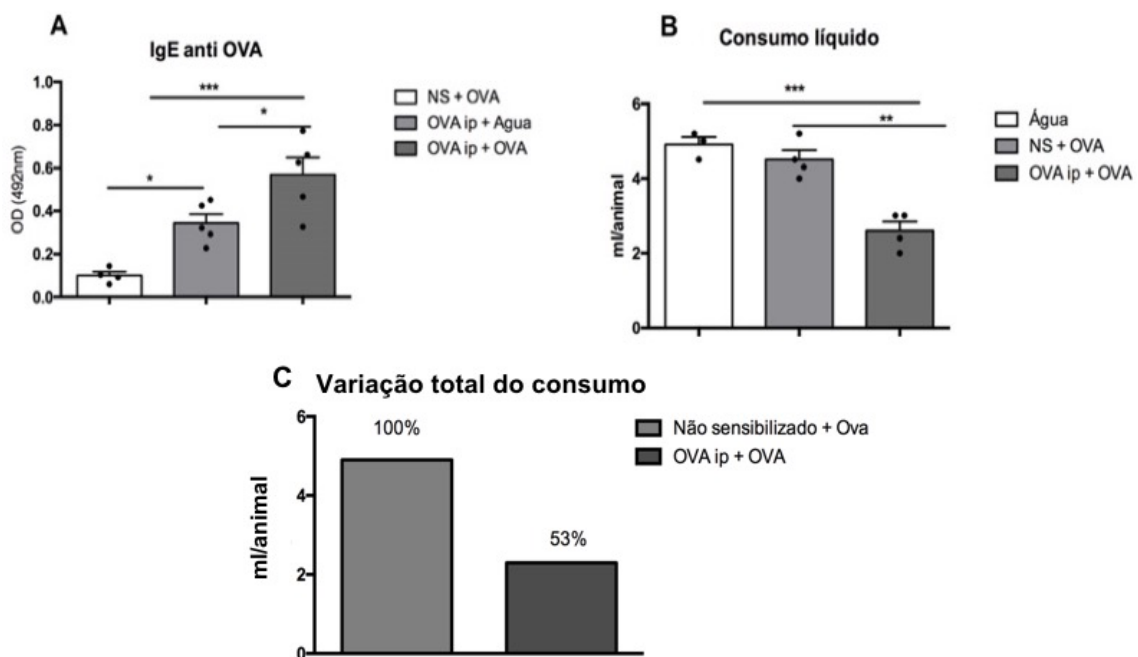


Figura 5 - Níveis de IgE específica para OVA e consumo da solução contendo o alérgeno. Camundongos BALB/c foram imunizados i.p. com 20ug de OVA + 1mg de [Al(OH)₃] 14 dias depois receberam imunização secundária: 20ug de OVA + 200 ul de salina e foram desafiados 7 dias depois da imunização secundária com solução contendo solução de clara de ovo a 20% como única fonte de líquido por 7 dias. Níveis de IgE anti-OVA no soro dos animais medidos por ELISA 24 horas depois do final do desafio oral. O grupo controle água consistiu de animais não manipulados. Os grupos experimentais: NS + OVA (não sensibilizado que bebeu solução de clara de ovo 20%); OVA ip + Água (camundongos sensibilizados que ingeriram água); OVA ip + OVA (camundongos que foram sensibilizados e desafiados com solução de clara de ovo a 20%). As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 3-5) da absorbância obtida em soro total (sem diluir) e expressa em densidade óptica (A). Em (B) está representada a média do consumo líquido por animal durante o desafio ora. Em (C) está representada a variação total do consumo líquido por animal, considerando o grupo não sensibilizado + OVA como controle. *p<0,05.

5.3 Camundongos sensibilizados para BLG optaram por consumir solução contendo o alérgeno

Os camundongos que são sensibilizados para a BLG e são desafiados com *whey protein* contendo BLG consumiram grandes quantidades dessa solução em mamadeiras como única fonte líquida. Para confirmar essa preferência pela solução contendo *whey protein*, realizamos um experimento no formato denominado *two bottle test* (Luciana Mirotti et al., 2010) em que foi oferecida aos animais a escolha entre ingerir água ou solução contendo o alérgeno para o qual foram imunizados durante as primeiras 24 horas iniciais do período de desafio oral. Os camundongos sensibilizados preferiram consumir *whey protein* (contendo BLG) mesmo apresentando altos níveis de IgE anti-OVA no soro (figura 6). As mamadeiras eram idênticas e havia troca de posição entre elas para evitar a preferência guiada por localização.

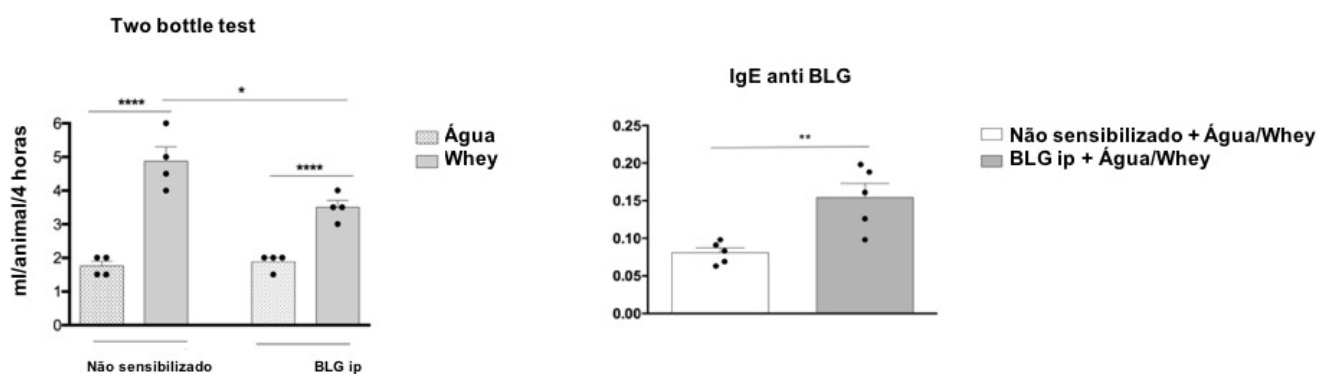


Figura 6 - Teste de preferência alimentar. Camundongos BALB/c sensibilizados para BLG (BLG i.p) ou não sensibilizados (NS) foram individualizados em gaiolas contendo duas mamadeiras idênticas. Em uma delas foi ofertado solução de *whey protein* contendo BLG e a outra continha apenas água. (A). Durante as 24h iniciais do tempo de desafio oral foi mensurado o consumo de cada mamadeira. No dia seguinte ao teste de preferência, o sangue dos camundongos foi coletado para para o teste de ELISA específica anti BLG. Os resultados em (A) são expressos em média + e.p.m e em (B) os resultados foram expressos em média + e.p.m. $p < 0,05$. N=4-5.

5.4 Camundongos sensibilizados e desafiados oralmente com *whey protein* exibiram comportamento alterado em relação a camundongos não sensibilizados

Como podemos perceber, os resultados demonstrados anteriormente nos sugerem que nem todos os alérgenos induzem o comportamento de aversão e a BLG parece ter efeito diferente da OVA embora ambas sejam igualmente alergênicas.

Para elucidar melhor os processos envolvidos no comportamento de aversão ao antígeno e o comportamento em nosso modelo, realizamos um teste em labirinto do tipo *Zero Maze*. Quando analisamos o número de entradas nos braços fechados, não há diferença entre os grupos (figura 7A). Entretanto, os camundongos não sensibilizados que apenas ingeriram a solução de *whey protein* por 7 dias entram mais e gastam mais tempo no labirinto nos braços abertos quando comparados aos demais grupos (figura 7B,C). Não houve diferença entre as distâncias percorridas pelos animais dos dois grupos (figura 7D). Os braços abertos do labirinto são considerados áreas desafiadoras, onde o animal fica exposto ao ambiente externo, portanto, o comportamento padrão é o que animal evite permanecer nessa região (Carobrez & Bertoglio, 2005).

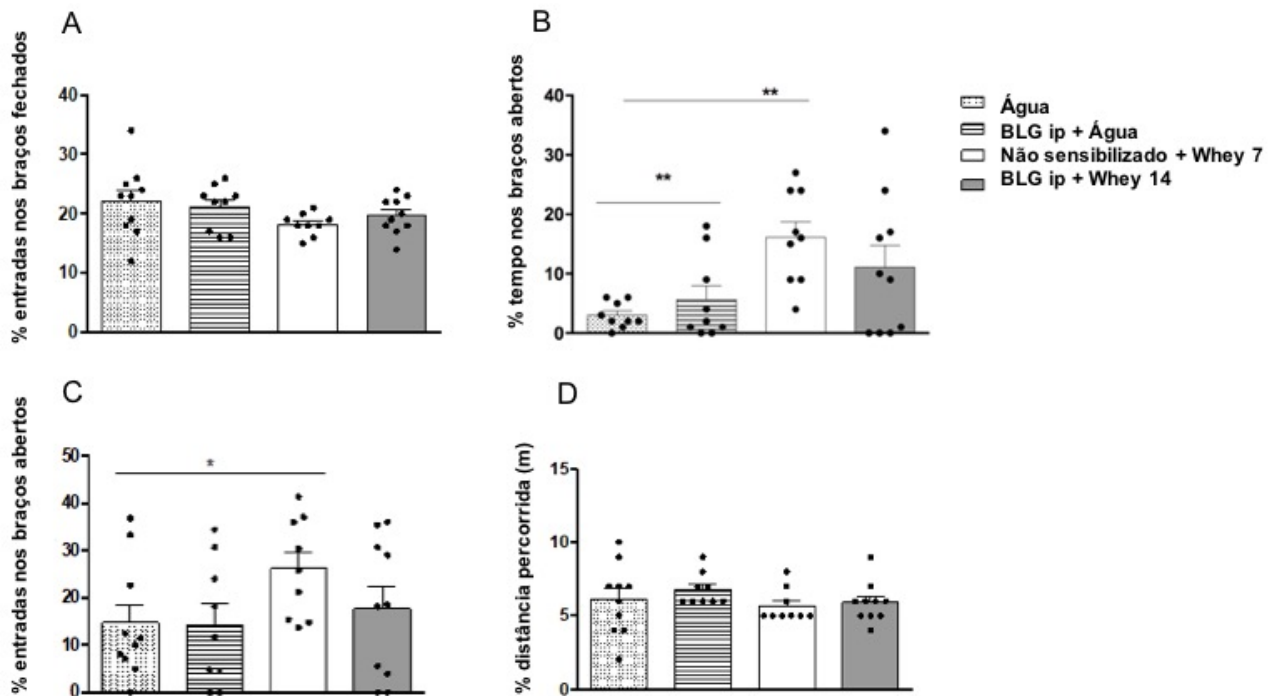


Figura 7 - Análise do comportamento de camundongos sensibilizados e não sensibilizados em labirinto do tipo *Zero Maze*. Camundongos BALB/c sensibilizados com BLG ou não sensibilizados foram colocados um a um em um labirinto do tipo *Zero Maze* por 15 minutos. As barras representam a média + e.p.m. de: (A) a distância total percorrida pelos animais, em (B) número de entradas nos braços fechados do labirinto, em (C), a porcentagem do tempo gasto pelos animais dentro dos braços abertos e em (D), a porcentagem de entradas nos braços abertos. $P < 0,05$. $N = 10$.

5.5 Camundongos sensibilizados e desafiados oralmente com *whey protein* tiveram níveis intermediários de C-fos quando comparados aos controles não sensibilizados e aos animais apenas sensibilizados

Basso e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos alérgicos para OVA apresentam duas áreas cerebrais mais ativas: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo central da amígdala. Essas áreas estão tipicamente mais ativadas em situações de ansiedade e estresse. Por meio da marcação da proteína intracelular c-Fos, os pesquisadores detectaram a ativação dos neurônios dessas áreas cerebrais em camundongos sensibilizados e desafiados oralmente quando comparados aos camundongos não sensibilizados (Basso et al., 2003). A proteína codificada pelo protooncogene c-Fos pode ser rapidamente induzido em neurônios após minutos de estimulação com neurotransmissor, sendo conhecido como um gene de ativação precoce. C-Fos pode formar um complexo com c-Jun, outra proteína codificada por um protooncogene, e esse complexo se liga ao sítio do gene AP-1 para induzir a transcrição de outros genes envolvidos na ativação celular (Rauscher, Voulalas, Franza, & Curran, 1988). No caso dos neurônios, está bem estabelecido que a expressão de c-Fos é um bom marcador de atividade neuronal (Zimmermann & Herdegen, 1994).

Para explorar a repercussão da alergia à BLG no sistema nervoso central, foi realizada a marcação por imunohistoquímica de neurônios em áreas cerebrais especialmente relacionadas a estresse e ansiedade. Ao medirmos c-Fos dos neurônios da região PVN, notamos que camundongos sensibilizados que ingeriram água tiveram mais neurônios ativados quando comparados aos camundongos *naïve*. Curiosamente, os camundongos que receberam apenas solução de *whey protein* (não sensibilizados) tiveram níveis mais baixos de c-Fos quando comparados aos camundongos *naïve* e àqueles sensibilizados. Os animais alérgicos (sensibilizados e desafiados com *whey protein* por 7 dias) apresentaram níveis intermediários de c-Fos (Figura 8).

Provavelmente, a solução de *whey protein* tem algum efeito ansiolítico que é antagonizado pela sensibilização, uma vez que camundongos sensibilizados e desafiados oralmente (alérgicos) ainda mantiveram níveis mais elevados de c-Fos quando comparados animais não sensibilizados, porém, menores do que animais sensibilizados que receberam água durante o período de desafio oral.

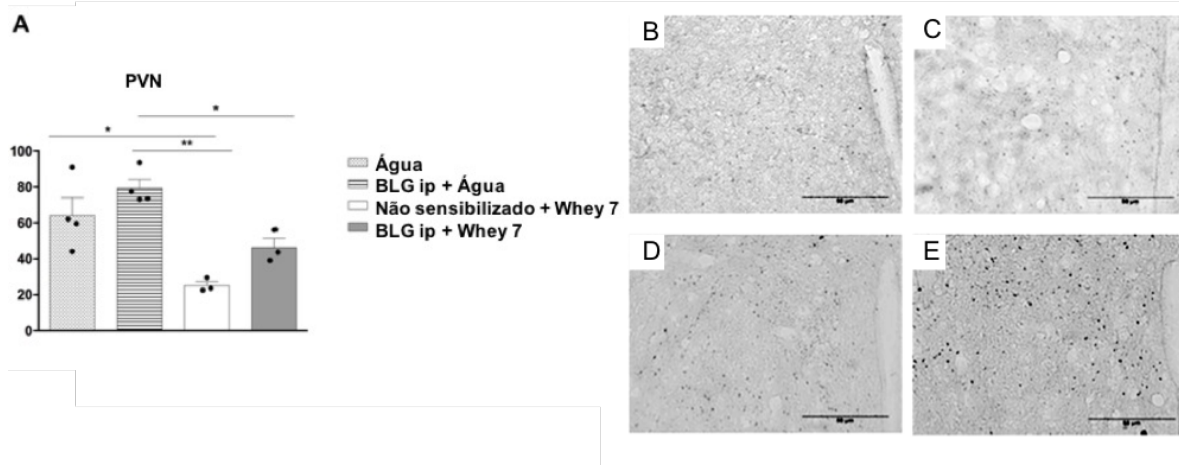


Figura 8 - Neurônios ativados no núcleo paraventricular do hipotálamo de camundongos sensibilizados com BLG. (A) Camundongos sensibilizados e desafiados ou não com *whey protein* por 7 dias percorreram o labirinto do tipo *Zero Maze* por 15 minutos ao final do desafio oral. Noventa minutos após o teste do labirinto, os animais foram eutanasiados e perfundidos com salina e paraformaldeído 4% tiveram seus cérebros removidos para posterior confecção de lâminas e procedimento de imunohistoquímica. Os neurônios foram marcados com c-Fos na região do PVN foram contados. As barras representam quantidade de células positivas para c-Fos.* $p < 0,05$, experimento realizado com 6 animais por grupo. (B) Imagem representativa da área do PVN em camundongo não sensibilizado. (C) Imagem representativa da área do PVN em camundongo sensibilizado com BLG e que recebeu água no período do desafio oral. (D) Neurônios marcados com cFos em camundongos não sensibilizados que receberam solução de *whey protein* (contendo BLG) por 7 dias. (E) Neurônios marcados com cFos em camundongos sensibilizados e desafiados com *whey protein* por 7 dias.

5.6 Camundongos sensibilizados e desafiados com BLG purificada apresentaram níveis mais altos de IgE sérica anti-BLG mas sem comportamento clássico de aversão ao alérgeno

Embora o modelo de alergia alimentar com BLG tenha seu desafio oral realizado com *whey protein*, um composto que contém alta concentração de BLG, e ele mimetize os sinais clínicos da alergia, nos questionamos se os outros componentes da *whey protein* poderiam interferir de alguma forma em nossos resultados. Era especialmente necessário esclarecer se os efeitos comportamentais da solução de *whey protein* se deviam à alteração do alérgeno (BLG) ou de outros componentes dessa solução. Para excluir essa possibilidade, padronizamos o mesmo modelo utilizando, desta vez, a BLG purificada no desafio antigênico por via oral. Uma vez que observamos que a aversão era mais evidente nos três primeiros dias de teste, reproduzimos nosso modelo de alergia alimentar à BLG utilizando um protocolo com as seguintes alterações: desafio oral realizado com BLG purificada (dose de 1mg/ml) e tempo

experimental de três dias de desafio oral. É importante ressaltar que a BLG é encontrada na fração *whey protein* do leite de vaca normalmente na concentração de 3,3 mg/ml (Paul Paquin, 2009), ou seja, 3 vezes mais concentrada que a solução de BLG que utilizamos para o desafio oral.

Foram medidos os níveis de IgE total no soro desses animais e mostramos que três dias de desafio oral com o antígeno purificado (BLG) foram suficientes para aumentar os níveis dessa imunoglobulina quando comparados àqueles apresentados pelos animais apenas sensibilizados que ingeriram água (Figura 9A)

Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados por via oral com BLG purificada ingeriram quantidade menor de líquido do que os camundongos do grupo controle (água). Os animais do grupo “BLG oral” (animais não sensibilizados que recebem BLG por via oral) consumiram quantidade da solução contendo o alérgeno semelhante aos camundongos *naïve* não sensibilizados que ingeriram apenas água. Esse dado indica que os camundongos apresentaram um comportamento natural com relação ao consumo de BLG. Além disto, o resultado demonstra que BLG, em concentrações baixas (1mg/ml), é capaz de alterar o consumo líquido dos camundongos BALB/c (Figura 9B). É interessante salientar que a redução no consumo de solução contendo BLG no grupo de camundongos sensibilizados é de apenas 12% (Figura 9C), um resultado completamente diferente quando comparado ao consumo de OVA pelos camundongos sensibilizados para OVA, em que a redução do consumo é de 58% (Figura 5C) ou seja, uma aversão clássica e robusta.

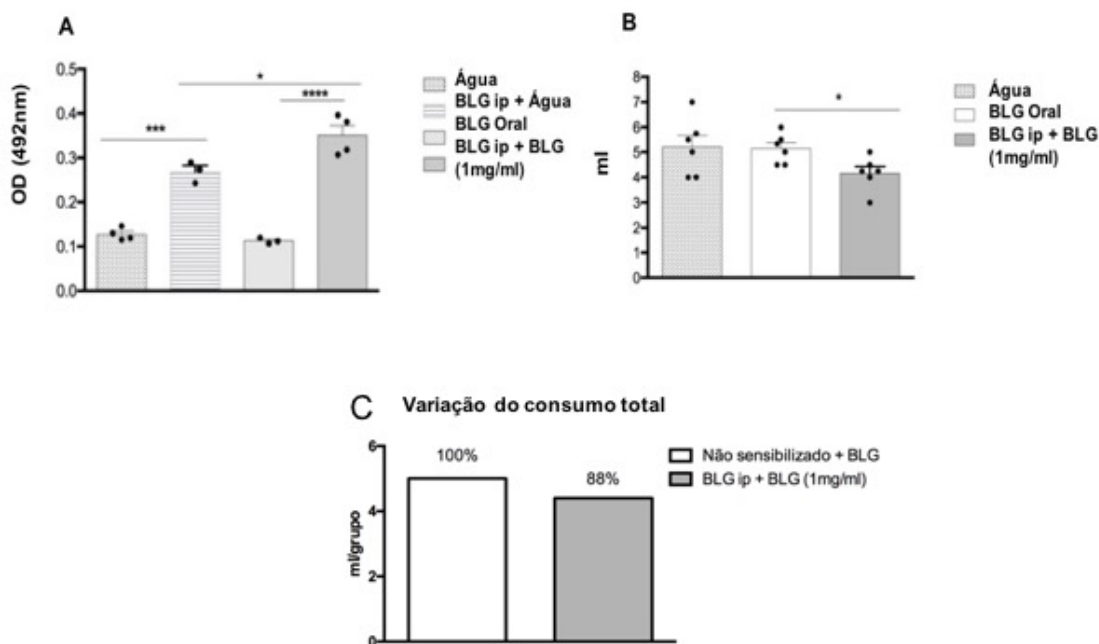


Figura 9 - Níveis de IgE total para BLG e consumo líquido. Camundongos BALB/c foram sensibilizados com BLG e desafiados com BLG purificada na concentração de 1mg/ml. O grupo consistiu de camundongos *naïve* que apenas ingeriram água durante todo o experimento. O grupo BLG i.p. + água foram os camundongos sensibilizados que ingeriram água, sendo controles do processo de sensibilização. Os camundongos BLG oral foram aqueles não sensibilizados que beberam BLG 1mg/ml no desafio oral. (A) Depois do desafio oral, os camundongos foram sacrificados, o soro colhido e a concentração de IgE total foi medida por ELISA. (B) O consumo líquido total foi avaliado durante os 3 dias de consumo da solução contendo BLG. (C) Variação do consumo de solução mostrando a porcentagem. As barras representam média + e.p.m. $p < 0,05$. N=4-6.

5.7 Camundongos não sensibilizados preferiram ingerir BLG.

Esse conjunto de resultados nos oferecia a oportunidade de estudarmos em maior detalhe os correlatos neurológicos da aversão e da preferência na alergia alimentar ao alérgeno BLG. Nos estudos de CARA e colaboradores (Cara et al, 1994) e (Cara, Conde, & Vaz, 1997), foram ofertadas diferentes soluções para que os camundongos sensibilizados ou não, tivessem sua escolha alimentar quantificada. Os pesquisadores observaram que houve preferência dos camundongos por soluções adocicadas. Nossa hipótese explicativa foi então que a BLG, mesmo em presença de alergia a esse antígeno, poderia estimular nesses animais uma preferência forte, comparável àquela despertada pelas soluções adocicadas. Para testar essa hipótese, nosso primeiro passo foi realizar um experimento de preferência alimentar em camundongos *naïve* para sabermos se, independentemente do processo de sensibilização, haveria preferência

alimentar pela BLG purificada. Para garantir que o nosso teste fosse acurado, optamos por realizar o teste de preferência por 48h, medindo o consumo das soluções de 6h em 6h. Comparamos esse consumo entre animais de quatro grupos experimentais: Água x BLG purificada (1mg/ml); OVA x BLG (ambas a 1mg/ml), Água adocicada (1%) x BLG purificada e OVA adocicada x BLG purificada. Observamos que os camundongos preferem a solução contendo BLG purificada em relação à água ou à solução contendo a mesma concentração de ovalbumina (OVA) e não houve diferença significativa entre o consumo de solução contendo BLG purificada ou de soluções adocicadas (água + 1% sacarina sódica) ou OVA + 1% sacarina sódica (Figura 10). Esse resultado nos sugere, então, que a BLG teve um papel no comportamento de preferência alimentar do animal semelhante àquele desempenhado pela sacarina.

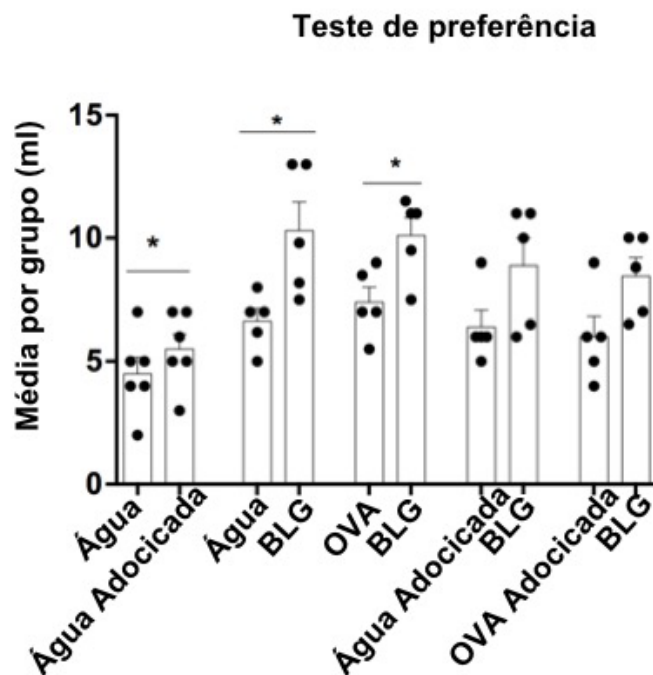


Figura 10 - Teste de preferência por soluções contendo sacarina, OVA ou BLG. (A) Camundongos *naïve* foram separados individualmente em gaiolas e foram fornecidas a eles mamadeiras idênticas contendo mesma quantidade de líquido para que pudessem ter acesso a duas fontes diferente de consumo. Os camundongos foram divididos nos grupos: água x BLG (1mg/ml), OVA x BLG (1mg/ml), Água adocicada (1% sacarina sódica) x BLG (1mg/ml) e OVA adocicada (1% sacarina sódica) x BLG (1mg/ml). O gráfico mostra o consumo líquido durante o teste de preferência de 48 horas. * $p < 0,05$. As barras representam média + e.p.m. Experimento realizado com 5 camundongos por grupo.

5.8 A preferência pelo consumo de BLG foi capaz de subverter o fenômeno da aversão ao alérgeno OVA

Uma vez que os camundongos *naïve* apresentaram preferência pela solução de BLG, ainda na concentração de 1mg/ml, utilizamos um modelo clássico de alergia à OVA em que a aversão é claramente estabelecida (Cara et al, 1994; Saldanha et al, 2004) para verificar se a presença de BLG poderia alterar o comportamento dos animais em testes de preferência alimentar por três dias. Primeiramente, verificamos que os camundongos, como esperado apresentaram níveis elevados de IgE anti-OVA quando imunizados e desafiados com OVA por via oral (Figura 11A). Observamos que os camundongos sensibilizados com OVA e desafiados com OVA na concentração de 1mg/ml perderam peso, enquanto que os animais que receberam o desafio com os dois antígenos misturados (1mg/ml de BLG + 1mg/ml de OVA) não perderam peso, ainda que fossem sensibilizados para a OVA (Figura 11B). No que se refere ao consumo líquido de antígeno, os camundongos sensibilizados para OVA e desafiados com esse antígeno apresentam redução significativa do consumo de OVA (aversão) quando comparados aos seus controles.

Curiosamente, no entanto, quando fornecidas mamadeiras contendo a mistura dos dois antígenos (1mg/ml de BLG + 1mg/ml de OVA), os camundongos ingeriram quantidades maiores da solução quando comparados àqueles que foram expostos a solução contendo OVA apenas. Dessa forma, foi possível concluir que a adição de BLG à solução levou ao aumento do consumo da solução contendo o alérgeno OVA (Figura 11C) sugerindo que a BLG desencadeou, nesse modelo, um efeito semelhante àquele desencadeado pela sacarina (ou pela sacarose).

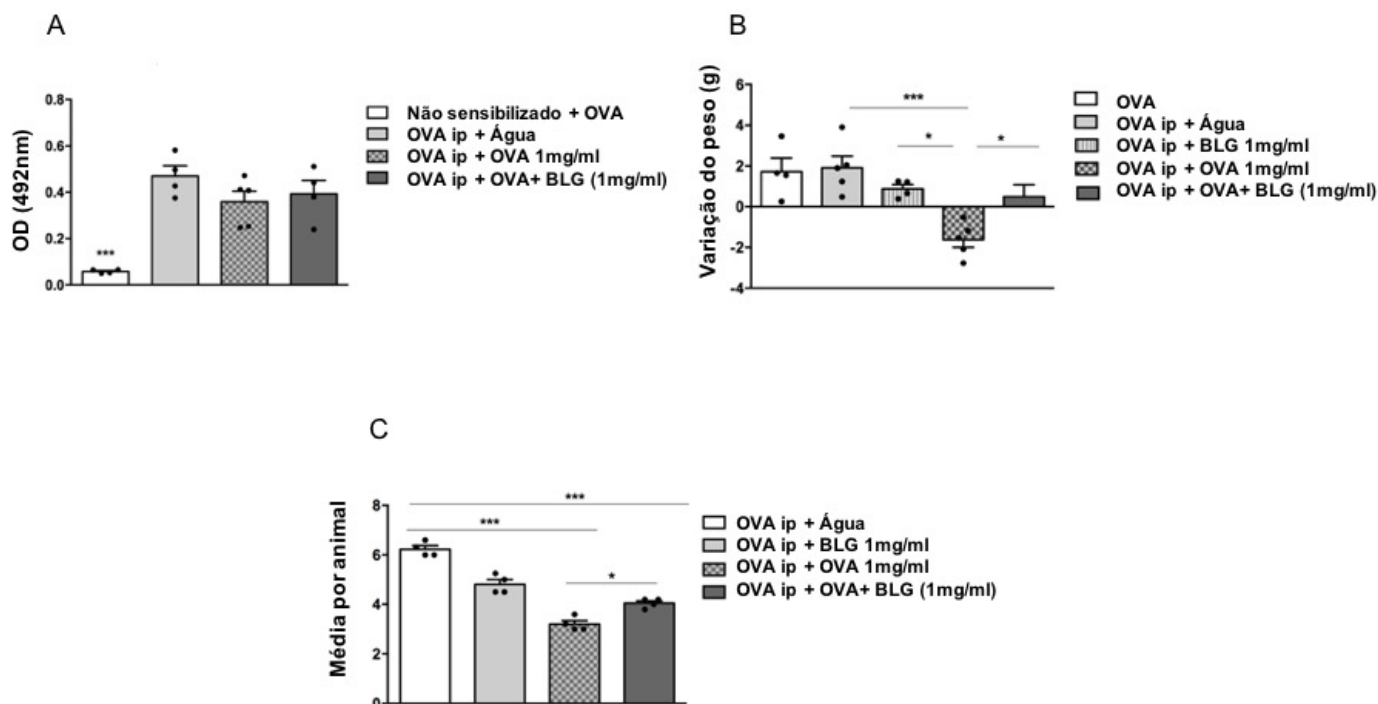


Figura 11 - Parâmetros do modelo de alergia alimentar a OVA em camundongos. Camundongos BALB/c foram sensibilizados i.p para OVA e desafiados com OVA (1mg/ml) por três dias ou solução contendo OVA e BLG misturadas a 1mg/ml. O grupo NS + OVA não foi sensibilizado e recebeu apenas OVA oral, como controle do experimento. (A) Níveis de IgE específica para OVA expressos em absorvância a 492nm. (B) Variação do peso corporal por grupo durante o desafio oral (C) Média do consumo líquido por animal. Os resultados são expressos em média + e.p.m. $p < 0,05$. $N=5$.

5.9 Camundongos sensibilizados para BLG e OVA apresentaram modificações na ativação de áreas do sistema nervoso

O modelo de alergia alimentar à OVA é um modelo clássico no qual foi descrita a aversão ao antígeno em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, ou seja, os animais alérgicos (Cara et al, 1994). Porém, como visto anteriormente, ao se adicionar uma pequena quantidade de BLG (1mg/ml) na solução contendo OVA, os camundongos previamente sensibilizados com OVA passam a ingerir uma quantidade maior da solução. A partir desse resultado, procuramos investigar áreas cerebrais que poderiam estar relacionadas a esse comportamento biológico. Para isso, duas áreas foram avaliadas: o núcleo *accumbens*, responsável por um sistema de recompensa positivo e o núcleo central da amígdala, relacionado a comportamentos de ansiedade.

No núcleo *accumbens* de camundongos não sensibilizados, há menor expressão de neurônios positivamente marcados com cFos em animais que beberam solução de BLG (1mg/ml) quando comparados aos camundongos não sensibilizados que beberam solução de OVA (1mg/ml). Camundongos sensibilizados para OVA, ainda que tenham consumido soluções de OVA misturadas a BLG não tiveram expressão de cFos diferente quando comparados aos seus controles que foram sensibilizados com OVA e desafiados com esse mesmo antígeno. Curiosamente, quando se analisa a ativação de neurônios na região do núcleo central da amígdala (área relacionada a comportamentos aversivos e protetores), pode-se perceber que os camundongos sensibilizados com OVA e desafiados com esse mesmo antígeno apresentaram níveis mais elevados de expressão desse marcador de neurônios ativados quando comparados aos camundongos não sensibilizados que ingeriram OVA (Figura 12).

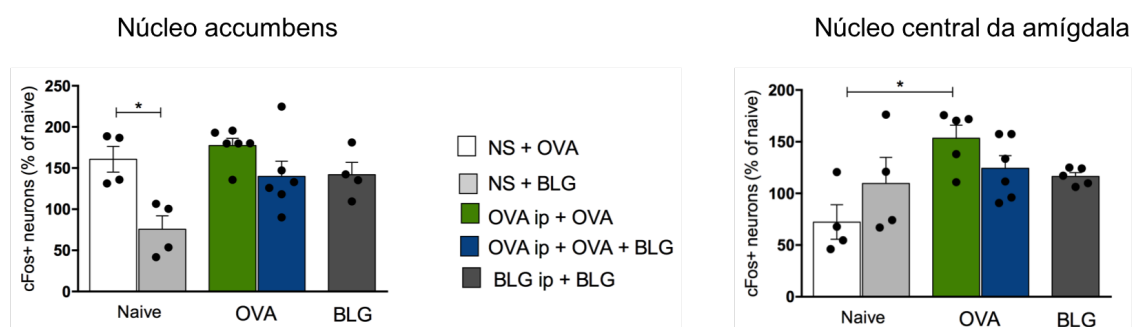


Figura 12 - Avaliação da expressão de cFos em camundongos. Camundongos BALB/c foram divididos entre camundongos *naïve* (não sensibilizados) que ingeriram OVA (NS + OVA); camundongos não sensibilizados que ingeriram BLG (NS+ BLG); camundongos que foram sensibilizados i.p. com OVA e desafiados oralmente com OVA (OVA ip + OVA), camundongos que foram sensibilizados i.p com OVA, porém desafiados com uma solução misturada de OVA + BLG por via oral (OVA ip + OVA + BLG) e, finalmente, camundongos que foram sensibilizados i.p para BLG e desafiados com BLG (BLG i.p + BLG). 24 horas depois do desafio oral, os camundongos foram anestesiados e submetidos à perfusão cardíaca. O cérebro foi removido e armazenado em pfa 4% por 24h e depois em sacarose 30% até serem fatiados no micrótomo criostato (40um). As fatias cortadas foram armazenadas em solução crioprotetora à -20°C e submetidas ao protocolo de imunohistoquímica. As barras azuis simbolizam a média + e.p.m. *p<0,05. N=4-6.

6 Discussão

A alergia alimentar é uma reação exacerbada do sistema imune frente a antígenos ingeridos na dieta (Sicherer & Sampson, 2010). O leite de vaca é introduzido precocemente na vida das crianças contribuindo para que a alergia ao leite de vaca seja a principal e mais frequente (Gomes-Santos et al., 2015). Entre os alérgenos do leite, a proteína β -lactoglobulina (BLG) é considerada a mais imunogênica (Lindholm Bøgh et al., 2013). O leite humano é bastante rico, contendo proteínas de soro de leite, frações de caseína, IgA e outras, porém, não possui BLG naturalmente em sua composição (Fields & Demerath, 2012). A transferência de proteínas como a BLG por meio da amamentação é controversa: alguns autores encontraram proteínas bovinas no leite humano, enquanto outros acreditam em uma reatividade cruzada entre as proteínas do leite humano e do leite bovino (Denis, Loras-Duclaux, & Lachaux, 2012) não contribuindo para o estabelecimento da tolerância oral à BLG.

Dentre as muitas alterações clínicas típicas da alergia alimentar, mudanças comportamentais também têm sido descritas em indivíduos alérgicos, dentre elas, as reações de ansiedade (F A Costa-Pinto & Basso, 2012). No presente trabalho, utilizamos um modelo de alergia alimentar para investigar os mecanismos neuro-imunológicos envolvidos na aversão e na preferência ao antígeno na alergia alimentar à β -lactoglobulina (BLG).

Inicialmente, demonstramos que camundongos da linhagem BALB/c sensibilizados com BLG e desafiados posteriormente com uma solução de 20% de *whey protein* (contendo BLG) desenvolveram alergia apresentando vários dos sinais característicos de alergia alimentar: perda de peso, inflamação na mucosa intestinal com aumento de eosinófilos, células caliciformes e linfócitos intraepiteliais no intestino delgado. Além disso, camundongos alérgicos tiveram níveis de IgA secretória maior no desafio prolongado com solução contendo BLG. Quanto ao perfil de citocinas, a IL-4 e IL-5 estavam aumentadas em camundongos alérgicos e houve diminuição da IL-10 nos mesmos. Mais que todos esses sinais, os animais apresentavam níveis séricos elevados de IgE específica para BLG quando ingeriram a solução contendo *whey protein* por 7 ou 14 dias. Observamos que a exposição prolongada da solução contendo o alérgeno (BLG) por 14 dias elevou ainda mais os níveis de IgE quando comparados com 7 dias de ingestão (Lemos, 2015). Esse resultado nos chamou bastante a atenção, pois ele é diferente do que foi já descrito por Batista e colaboradores (2014) em camundongos BALB/c sensibilizados para OVA e desafiados com dieta contendo o mesmo antígeno por tempo prolongado. Esses autores sensibilizaram camundongos BALB/c com OVA adsorvida em hidróxido de alumínio por via subcutânea (s.c.) administrando também um reforço s.c. com OVA diluída em salina e desafiaram, posteriormente, os animais pela oferta exclusiva de ração contendo OVA por um período de 7 ou 14 dias. De forma semelhante ao que ocorria no modelo

de alergia descrito anteriormente pelo mesmo grupo utilizando uma solução líquida contendo OVA como desafio oral, os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA na dieta tiveram níveis elevados de IgE específica anti-OVA quando comparados aos seus controles não sensibilizados, o mesmo correndo com a IgG1 anti-OVA. A ingestão de OVA nos camundongos sensibilizados foi associada também ao aumento das citocinas IL-6 e TNF- α no tecido adiposo e à perda de peso entre o primeiro dia de desafio oral até o sétimo dia. Curiosamente, no entanto, quando os camundongos consumiam a ração contendo OVA (desafio oral) por um tempo maior, 14 dias, os níveis dessas citocinas diminuíaam no tecido adiposo, e os níveis séricos de IgE anti OVA ficaram reduzidos a níveis comparáveis aqueles detectados antes do desafio oral e não sofreram anafilaxia quando provocados sistemicamente com o antígeno (Batista et al., 2014). Esse fenômeno de aparente dessensibilização ao alérgeno OVA apresentado pelos camundongos quando desafiados de forma continuada (14 dias) com a dieta contendo OVA sugere: 1) que diferentes antígenos geram consequências imunológicas distintas no organismo ou 2) que a forma de apresentação do desafio oral (solução líquida versus dieta) seja relevante para a resposta imune inflamatória na alergia alimentar.

Por outro lado, diferentemente do que havia sido descrito para o modelo de alergia alimentar à OVA, os camundongos alérgicos à BLG apresentaram inicialmente aversão ao consumo da solução contendo BLG, mas, a partir do dia 7 do desafio oral, esses animais aumentaram o consumo da solução contendo o alérgeno. Durante os primeiros 7 dias de desafio oral, a redução do consumo nos camundongos sensibilizados e desafiados com *whey protein* foi de 30%. Porém, entre o tempo de 7 a 14 dias, a redução no consumo da solução foi de 10%. Isto ocorreu apesar da BLG induzir níveis progressivamente altos de IgE específica no soro, comparáveis àqueles induzidos na alergia alimentar à OVA. Já havia sido descrito por Basso e colaboradores, que o fenômeno da aversão depende da produção de IgE e a depleção de IgE por anticorpos anti-IgE anteriormente ao desafio oral impede o desenvolvimento do comportamento aversivo (Basso et al., 2003). O modelo de alergia alimentar à BLG introduziu, assim, uma nova questão à discussão sobre as relações entre a alergia e seus correlatos comportamentais e neurais. O objetivo desse trabalho foi desvendar os mecanismos neurológicos envolvidos na alergia alimentar à BLG capazes de modificar o fenômeno da aversão ao consumo do alérgeno.

Nossa hipótese de trabalho foi que a solução de *whey protein* (contendo BLG) apresentaria sabor associado a um comportamento de preferência alimentar nos animais. Cara e colaboradores demonstraram que camundongos da linhagem B6D2F1 apresentam uma preferência natural por soluções adocicadas artificialmente quando comparadas com água (Cara

et al, 1994). Porém, em camundongos sensibilizados para OVA e que recebiam a solução adocicada contendo o antígeno, esse comportamento era alterado e os animais mudavam sua preferência para uma solução que não continha OVA de forma a evitar o contato com o alérgeno, ainda que a solução estivesse adocicada, demonstrando um conflito entre a preferência natural (sabor adocicado) e a aversão ao antígeno. Esse comportamento foi associado aos níveis elevados de anticorpos IgE específicos. Por outro lado, Mirotti e colaboradores mostraram que a adição de 4% de sacarose na solução contendo o alérgeno para o qual camundongos da linhagem C57BL/6 haviam sido sensibilizados era capaz de abolir o comportamento de aversão ao consumo da solução (Luciana Mirotti et al., 2010). Em camundongos da linhagem BALB/c, no entanto, a adição de 4% ou 8% de sacarose não apresentava o mesmo efeito sugerindo que os níveis de IgE, mais altos nos camundongos BALB/c, interferiam nesse efeito da sacarose sobre a aversão ou, alternativamente, que outros fatores ligados às duas linhagens de camundongos estavam envolvidos nessa diferença.

Nos experimentos utilizando o modelo de alergia alimentar à BLG, ainda que os camundongos alérgicos consumissem grandes quantidades da solução de *whey protein* a 20% (contendo BLG), os animais recebiam oferta exclusiva da solução. Para verificar se os camundongos apresentavam de fato preferência pela BLG semelhantemente ao que já havia sido relatado com relação à solução adocicada, realizamos um teste denominado “*Two bottle test*” (Luciana Mirotti et al., 2010). Camundongos sensibilizados e não sensibilizados para BLG foram individualizados em gaiolas e, para esse teste, utilizamos mamadeiras idênticas: uma delas contendo solução com o antígeno e a outra contendo água. O teste foi realizado nas primeiras 24h do período do desafio oral. A cada quatro horas, foi mensurado o consumo líquido das mamadeiras e suas posições trocadas, de forma a evitar preferência por localização. Constatamos, com esse teste, que, apesar da presença de níveis séricos altos de IgE nos camundongos sensibilizados, esses animais optaram por ingerir soluções contendo o alérgeno, rompendo o padrão de aversão clássica demonstrada nos modelos com OVA (Cara et al, 1994; Cara et al, 2004; Mirotti et al., 2010). Esse resultado também nos permite inferir que a preferência alimentar por BLG é estabelecida precocemente, pois nas primeiras 4h já houve uma diferença no consumo entre os grupos sensibilizados e não sensibilizados para BLG, ainda que os níveis de IgE já estivessem elevados. Esse experimento nos levou a pensar que diferentes antígenos provocam diferentes reações com relação a preferência e que esta está relacionada a componentes possivelmente emocionais e não apenas fisiológicos.

O desencadeamento de comportamentos de aversão e preferência alimentar estão relacionadas à ativação de áreas emocionais do cérebro. Camundongos expostos pela primeira

vez a um labirinto, como o *Zero Maze* composto de braços abertos e fechados, não se aventuram a percorrer as áreas de forma livre. O medo e a aversão são componentes que guiam o comportamento dos animais de evitar explorar áreas abertas em que estão vulneráveis a fatores do ambiente (Ennaceur, Michalikova, van Rensburg, & Chazot, 2008). Para verificar o comportamento de camundongos alérgicos e não alérgicos para BLG, submetemos os animais a um teste no labirinto *Zero Maze*. Curiosamente, os camundongos não sensibilizados que apenas ingeriram exclusivamente a solução de *whey protein* por 7 dias permaneceram mais tempo nas regiões de braços abertos do labirinto quando comparados aos demais grupos. Os braços abertos do labirinto são considerados áreas desafiadoras, onde o animal fica exposto ao ambiente externo; portanto, o comportamento padrão é evitar permanecer nessa região como forma de proteção (Carobrez & Bertoglio, 2005). Esse comportamento exploratório sugere que os camundongos, ao ingerirem a solução de *whey protein*, permaneceram mais tempo nos braços abertos por estarem mais receptivos a esse desafio do labirinto. De forma semelhante, o número de entradas nos braços abertos também foi maior, indicando que o consumo de *whey protein* tinha uma ação ansiolítica nos animais.

A digestão enzimática de proteínas naturais, incluindo as derivadas de leite, gera uma gama de peptídeos bioativos que já foram isolados (Yamada et al., 2014). Sabe-se que, em média, as proteínas do soro de leite (*whey protein*) possuem 50% de BLG (Bahna, 2002). Alguns peptídeos bioativos podem interagir com o sistema nervoso e apresentar atividade ansiolítica. A β -lactotensina (His-Ile-Arg-Leu, HIRL) é um peptídeo que foi isolado da digestão por quimiotripsina da BLG (Yamauchi et al., 2003) com efeito ansiolítico em camundongos frente a testes comportamentais em labirinto em cruz elevado (Hou et al., 2011) e efeito anti-stress (Yamauchi et al., 2003). É possível que os componentes da *whey protein*, em especial, a BLG, influenciem a mudança de comportamento dos camundongos não sensibilizados por ação de peptídeos desse tipo. É interessante o fato de que alguns peptídeos bioativos derivados de alimentos, como as proteínas do soro de leite (*whey*), tenham atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ACE) que atua regulando a pressão sanguínea e que a inibição dessa enzima está relacionada à atividade ansiolítica em ratos submetidos a testes comportamentais (Welderufael, Gibson, & Jauregi, 2012). Existe a possibilidade de que a BLG atue de forma ansiolítica, mas, se isto realmente ocorre, o mecanismo permanece desconhecido.

Na alergia alimentar, os eventos de ansiedade estão presentes. Basso (1999), em seu trabalho de tese, testou os efeitos de um fármaco da classe dos benzodiazepínicos, o diazepam, na aversão que acompanha a alergia alimentar à OVA. Esse fármaco apresenta efeito ansiolítico associado a intensificação da transmissão gabaérgica pós-sináptica nos receptores GABA_A.

Seria esperado que o efeito do ansiolítico inibisse a aversão, porém o tratamento com o diazepam não foi capaz de fazer com que os camundongos sensibilizados ingerissem quantidades maiores da solução de clara. Curiosamente, o diazepam foi capaz de alterar a preferência natural dos camundongos por soluções. Os camundongos sensibilizados preferiram ingerir água, enquanto os camundongos não sensibilizados e tratados com diazepam apresentaram rejeição ao consumo de soluções de clara de ovo adocicada. Esses resultados demonstram que o tratamento com ansiolítico não alterou a aversão à OVA durante a alergia, demonstrando que, para esse antígeno, a aversão é bastante robusta.

Para verificar se esse comportamento revelado no labirinto *Zero Maze* era acompanhado por mudanças neuronais, medimos a ativação de neurônios através da avaliação da expressão de c-Fos na região do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), uma região cerebral associada a emoções, responsável por modular comportamentos afetivos e participar de respostas ao stress, promovendo a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Costa-Pinto et al., 2006). Em nosso trabalho, os camundongos não sensibilizados que ingeriram solução de *whey protein* tiveram níveis menores de c-Fos nessa região quando comparados aos camundongos não sensibilizados que ingeriram apenas água ou os camundongos que foram sensibilizados com BLG, mas não foram desafiados com o alérgeno. De forma bastante interessante, os camundongos alérgicos apresentaram níveis intermediários de ativação. É provável que a solução de *whey protein* apresente um efeito ansiolítico capaz de se sobrepor ao efeito comportamental gerado no processo de sensibilização ao antígeno que precisa ser melhor investigado. Ficou claro que o consumo da solução de *whey protein* levou a uma mudança de comportamento dos camundongos, que exploraram os braços abertos do labirinto quando não estavam sensibilizados. Porém, podemos inferir que o grupo de animais alérgicos passou, indiretamente, por um conflito: a sensibilização eleva os níveis de IgE, que podem estar relacionados à ansiedade, porém, os componentes da *whey protein* podem ser capazes de promover maior conforto nos camundongos, diminuindo a ativação dos neurônios do PVN. Esses resultados precisam ser reproduzidos e analisados, uma vez que o teste do labirinto foi inicialmente realizado após uma semana de desafio oral, sendo assim, ao avaliarmos a ativação neuronal por meio do C-fos, analisamos a consequência da passagem pelo teste do labirinto sob efeito ou não da solução contendo BLG (crônica, por 7 dias) e não o efeito propriamente dito da BLG. Em um futuro teste, o desafio oral deverá ser realizado de forma aguda e não crônica, por exemplo, através da administração intragástrica de solução contendo BLG e análise de C-fos precocemente.

Em nossos experimentos, então, ficou evidente que o consumo da solução de *whey protein* estava associado a mudanças comportamentais em camundongos. Porém, essa solução apresenta, em sua composição, outros componentes que poderiam interferir nas análises comportamentais. Para evitar esse viés, realizamos os mesmos experimentos utilizando BLG (1mg/ml/dia) purificada no desafio oral. Observamos que esse protocolo gerou efeitos semelhantes àqueles detectados quando a solução contendo *whey protein* foi utilizada: elevação dos níveis de IgE em camundongos sensibilizados e desafiados com BLG purificada e leve diminuição (12%) do consumo da solução contendo BLG quando comparado aos seus controles. É importante salientar que essa diferença no consumo é menor quando comparada ao desafio com *whey protein* e que provavelmente isto tem relação direta com a quantidade de BLG ofertada, pois na solução de *whey protein* (contendo BLG) a quantidade deste alérgeno é 3 vezes maior do que o desafio com a BLG purificada.

No trabalho de Cara e colaboradores, um experimento importante mostrou que quando eram oferecidos, para camundongos, pares de mamadeiras contendo água ou água adoçada, leite, clara de ovo ou solução de gamaglobulinas bovinas, a preferência dos camundongos era pela ingestão da solução adoçada. Entretanto, uma vez imunizados para OVA, os camundongos apresentavam aversão à ingestão desse antígeno ainda que ele estivesse diluído em soluções adoçadas (Cara et al., 1997). Naturalmente havia uma preferência pelo sabor adoçado, que era perdida mediante ao processo de sensibilização. Em nosso trabalho, mostramos que o consumo de soluções contendo BLG era alto, ainda que os camundongos estivessem sensibilizados para esse antígeno. Para verificar se havia preferência natural por BLG, realizamos o *Two Bottle test* em camundongos não sensibilizados. Camundongos individualizados em gaiola receberam opção de ingerir água versus água adoçada com sacarina (1%); água versus BLG; OVA versus BLG; água adoçada com sacarina (1%) versus BLG; OVA adoçada com sacarina (1%) versus BLG. A mensuração do consumo líquido nos mostrou que, assim como descrito por Cara e colaboradores, havia uma preferência natural pelo consumo da solução adoçada, como esperado. Mas, ao compararmos a preferência dos animais pela ingestão de água versus solução com BLG ou de solução com OVA versus solução com BLG, os camundongos optaram por ingerir soluções contendo BLG. Mais que isto, a comparação da preferência de ingestão de solução adoçada versus solução contendo BLG mostrou que os animais consomem igualmente as duas soluções. Esse resultado foi interessante e nos motivou a novas investigações.

Nossa pergunta, a partir desse resultado, foi: em um contexto clássico de aversão na alergia alimentar, a BLG teria algum efeito capaz de interferir no consumo líquido dos

camundongos alérgicos? Para isso, utilizamos o modelo de alergia à OVA (Saldanha et al., 2004) e, durante o desafio oral, criamos um grupo que foi desafiado com solução misturada de OVA e BLG purificadas (1mg/ml). Curiosamente, os camundongos que ingeriram essa solução tiveram menor perda de peso, fato que requer maior investigação e cujo mecanismo ainda não foi ainda elucidado. Surpreendentemente, a solução contendo OVA misturada com BLG promoveu diferença no consumo líquido: camundongos alérgicos ingeriram maior quantidade da solução mistura de BLG e OVA (1mg/ml) quando comparados aos camundongos alérgicos a OVA que ingeriram apenas OVA durante o desafio oral. A adição de BLG na solução de OVA foi suficiente para alterar o consumo e a aversão à OVA.

Diante dos achados anteriores, nosso próximo passo foi verificar se haveria algum correlato cerebral associado à ingestão dos alérgenos OVA e BLG durante os eventos inflamatórios de alergia.

Basso e colaboradores mostraram que camundongos sensibilizados para OVA e desafiados com solução de clara de ovo apresentavam níveis mais elevados de neurônios ativados na região central da amígdala quando comparados aos camundongos não sensibilizados (Basso et al., 2003). O núcleo central da amígdala (CeA) está relacionado a predição de estímulos aversivos e desempenha um papel importante nos sistemas cerebrais relacionados a medo e ansiedade. O CeA envia informações relacionadas ao estímulo aversivo esperado para a substância cinza periaquedutal (PAG) que, por sua vez, recebe aporte sensorial aferente sobre o potencial estímulo aversivo. Acredita-se que esse sinal seja realimentado em vários subnúcleos, incluindo amígdala lateral, local onde também há modulação de respostas aversivas dos neurônios ali encontrados (Fadok, Markovic, Tovote, & Lu, 2018). Os relatos de que a região do CeA está relacionada a comportamentos defensivos existem há muitas décadas (Representation, Affective, In, & Amygdala, 1958). Já foi demonstrado, por alguns grupos, que a manipulação do CeA altera respostas defensivas não condicionadas, por exemplo o *freezing*, comportamento inato diante de um estímulo aversivo (Ciocchi et al., 2010; Fadok et al., 2017; H. Li et al., 2013). A estimulação por meio de optogenética dessa área é capaz de regular comportamentos clássicos de ansiedade frente ao teste de campo aberto ou LCE (Botta et al., 2015). Por outro lado, lesões na amígdala produzem déficits em animais submetidos a testes de comportamento condicionado ao medo (Iwata, LeDoux, Meeley, Arneric, & Reis, 1986).

Os sinais emitidos a partir do CeA também podem originar respostas comportamentais diferentes, dependendo dos estados funcionais de outras áreas cerebrais e de acordo com o contexto interno e externo, como fome, sede e ansiedade. Ainda é difícil especular o mecanismo exato que o CeA teria na aversão e ansiedade, uma vez que ele é conectado a sistemas

dopaminérgico, colinérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, e essas viam podem regular processos de alerta ou de atenção aos estímulos externos associados a variados estados no organismo, dependendo do contexto inserido (H. J. Lee, Gallagher, & Holland, 2010; McCall et al., 2015).

Outra região cerebral associada a comportamentos emocionais é o Núcleo *Accumbens* (NAc). Sabe-se que o NAc atua como uma interface límbico-motora, onde as associações aprendidas que possuem significância motivacional são convertidas em comportamento direcionado por objetivos a serem conquistados (Mogenson, Jones, & Yim, 1980). Estudos neurofisiológicos e neuroanatômicos revelaram potenciais mecanismos neurais pelos quais o NAc e sua inervação dopaminérgica podem selecionar e integrar os estímulos límbicos e corticais que atuam sobre o comportamento (French & Totterdell, 2002; Goto & Grace, 2005; Gruber, Hussain, & O'Donnell, 2009; Pennartz, Groenewegen, & Lopes da Silva, 1994). O NAc é composto de pelo menos duas regiões anatômica e funcionalmente distintas, o núcleo e a concha, com padrões diferentes, porém sobrepostos, de conectividade límbica (French & Totterdell, 2002). Assim, enquanto a concha de NAc recebe estímulos límbicos convergentes da amígdala basolateral (BLA) e do subículo ventral, a principal região de saída hipocampal, o núcleo NAc recebe informações das regiões da BLA e para-hipocampo (French & Totterdell, 2002; Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins, & Pennartz, 2004). Além disso, há evidências que implicam a concha do NAc no controle do comportamento de busca por recompensa ou por drogas recreativas geradoras de sensação de recompensa (Ito, Robbins, Pennartz, & Everitt, 2008).

Camundongos e outros animais apresentam o comportamento inato de buscar situações prazerosas, evitando sensações que possam causar desconforto. Entretanto, conflitos motivacionais podem ocorrer face a esse objetivo. Os animais, em algumas ocasiões, precisam suportar estímulos desagradáveis para que possam obter prazer como recompensa ou, alternativamente, precisam abandonar o prazer para evitar situações consideradas desagradáveis. Esse foi o conflito observado no nosso modelo experimental de alergia quando camundongos sensibilizados para OVA foram desafiados com o alérgeno (estímulo aversivo) associado a algo prazeroso ou ansiolítico (a BLG). Sabemos que, a despeito do estímulo atrativo da sacarose, pequenas doses desse açúcar não foram suficientes para que camundongos alérgicos a OVA optassem por beber a solução contendo o antígeno (Mirotti et al., 2010). Nesse aspecto, embora não tenha havido diferença significativa no teste de preferência entre BLG e sacarose, observamos que a presença da BLG na solução contendo o alérgeno (OVA) foi capaz de abolir a aversão ao consumo dessa solução. Isto mostra que a BLG, seja pelo seu sabor ou

por possíveis efeitos de peptídeos ansiolíticos presentes na sua composição, tem ação mais robusta que a sacarose no comportamento de preferência alimentar dos camundongos BALB/c.

Ao analisarmos a ativação do Nac, percebemos que camundongos não sensibilizados que beberam BLG não possuem níveis elevados de neurônios ativados quando comparados aos camundongos sensibilizados e desafiados. Este fato foi contrário à nossa hipótese inicial de que, provavelmente, durante o contexto da alergia à BLG, áreas emocionais relacionadas ao sistema de recompensa estariam mais ativadas, fazendo com que os camundongos persistissem consumindo a solução contendo o alérgeno, ou seja, a recompensa subverteria a aversão. Quando avaliamos a ativação do núcleo central da amígdala, região relacionada à aversão e ansiedade, percebemos que não há número maior de células ativadas no grupo de camundongos alérgicos para BLG quando comparados aos seus controles não sensibilizados. Os camundongos alérgicos para OVA apresentaram maior ativação do CeA quando comparados aos seus controles não sensibilizados. A solução contendo a mistura de OVA e BLG não provocou mudança em nenhuma das duas regiões. Sugerimos que esses experimentos e análises precisam ser realizados com uma estratégia diferente da que foi feita, pois a quantificação da expressão de C-fos é relativa à exposição crônica ao alérgeno. É possível que a administração intragástrica de BLG e subsequente mensuração das células positivas para C-fos (de forma aguda) altere a ativação do núcleo *accumbens* e do núcleo central da amígdala.

Camundongos que recebem OVA por via intragástrica apresentam ativação cerebral de áreas que se relacionam à emoção desencadeada aumentando os níveis de ansiedade e a expressão de genes relacionados a ela (Basso et al., 2003). Quando existe a opção de escolha entre beber ou não soluções contendo o antígeno em testes de preferência, os animais evitam ingerir as soluções com os alérgenos, preferindo beber água. Esse fenômeno, chamado de aversão, é um exemplo claro das conexões entre eventos imunológicos e neurológicos com consequências diretas no comportamento (Basso et al., 2003; Cara et al., 1997). No entanto, as vias aferentes e os circuitos acionados na mucosa intestinal que desencadeiam mudanças no sistema nervoso central capazes de alterar o comportamento dos animais frente ao alérgeno ainda não são conhecidos.

Recentemente, várias interações entre neurônios e sistema imune têm sido descobertas, principalmente por causa da proximidade entre fibras nervosas e células imunes os tecidos associados à mucosa. Os mastócitos, células essenciais nos processos alérgicos, estão em contato íntimo com nervos na pele, no trato gastrointestinal (Schemann et al., 2005; Van Nassauw, Adriaensen, & Timmermans, 2007) e no trato respiratório (Le et al., 2017). Alguns mastócitos são capazes de estabelecer contato direto com nervos através de moléculas de adesão

celular do tipo 1 (CADM1) (Furuno et al., 2012; Hagiya et al., 2011). Os eosinófilos, células inatas efetoras importantes nas reações alérgicas, também são encontradas próximas a nervos colinérgicos em animais que são desafiados com antígeno na alergia respiratória (Sawatzky et al., 2002). A interação entre o sistema imune e nervoso é ilustrada facilmente no contexto alérgico, no qual células do sistema imune atuam em neurônios sensoriais para promover respostas originadas pelo sistema nervoso, como coceira e broncoconstrição. Os neurônios sensoriais possuem receptores para citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios que são secretados por células participantes do processo alérgico. Por outro lado, neurônios secretam mediadores como neuropeptídeos e neurotransmissores que atuam em receptores cognatos nas células imunes que participam da alergia. Provavelmente essa interação neuroimunológica bidirecional ocorre de forma precoce, tendo grande impacto na inflamação alérgica (Voisin, Bouvier, & Chiu, 2017).

Os mastócitos, além de possuírem um papel fundamental na alergia, também atuam diretamente em neurônios do sistema nervoso entérico (Voisin et al., 2017). Um estudo demonstrou que uma combinação de mediadores provenientes de mastócitos humanos estimulados foi capaz de ativar neurônios da submucosa de humanos e de cobaias (Schemann et al., 2005). Da mesma forma, leucotrienos LTC₄, PGE₂ e histamina são capazes de sinalizar para neurônios. Em neurônios da submucosa de cobaias sensibilizadas para proteínas de leite, a estimulação com a β -lactoglobulina induziu despolarização dos neurônios similar àquela induzida pela degranulação dos mastócitos, sugerindo que neurônios sensoriais e mastócitos possuem similaridades em suas funções, detectando estímulos e transferindo informações para os circuitos neurais, a diferença é que os mastócitos utilizam funções imunológicas para detectar antígenos (Frieling, Cooke, & Wood, 1994; Liu et al., 2003).

Em modelo de alergia alimentar à OVA, foi demonstrado que a expressão do RNAm para o neuropeptídeo CGRP estava aumentada no cólon de camundongos enquanto que a distribuição das fibras nervosas não sofreu alteração, sugerindo que a liberação de CGRP pode ser aumentada durante as alergias (J. Lee, Yamamoto, Hayashi, Kuramoto, & Kadowaki, 2013). O CGRP é um marcador para neurônios primários aferentes intrínsecos e extrínsecos no intestino de camundongos (Qu et al., 2008). Outro trabalho mostrou que a densidade de fibras nervosas imunorreativas para CGRP aumentou na mucosa do cólon de camundongos com alergia alimentar induzida e essas fibras se localizavam próximas aos mastócitos (J. Lee et al., 2013). Esses trabalhos demonstram que neurônios podem diretamente se comunicar com células imunes por meio de neurotransmissores como Ach ou neuropeptídeos como CGRP ou SP para contribuir com respostas do tipo Th2 (Voisin et al., 2017).

No trabalho aqui apresentado, percebemos que o fenômeno da aversão observado na alergia alimentar à OVA não se aplica a todos os antígenos. No modelo de alergia alimentar à BLG, demonstramos que, embora apresentando níveis séricos altos de IgE e vários sinais de inflamação da mucosa intestinal, camundongos alérgicos continuaram ingerindo soluções contendo o alérgeno, mesmo quando lhes é oferecida opção por outros líquidos. Nossos dados sugerem, então, que a BLG apresenta características especiais, sejam relacionadas ao sabor, sejam relacionadas a peptídeos neurologicamente ativos presentes na sua estrutura, que conseguem subverter o comportamento evolutivamente preservado de rejeição a substâncias potencialmente tóxicas desencadeado pelas reações alérgicas dependentes de IgE. Ainda não conseguimos desvendar os mecanismos responsáveis por essa alteração de comportamento e, embora nossos resultados nas áreas cerebrais relacionadas à emoção não tenham sido conclusivos com relação a este, é provável que haja um conflito entre a aversão e a recompensa e é razoável supor que esta última tenha prevalecido.

7 Conclusão

Em nosso trabalho, camundongos sensibilizados para BLG e desafiados com *whey protein* ou BLG purificada se tornaram alérgicos e, durante o período de desafio oral, os níveis de IgE aumentaram durante 7 ou 14 dias de consumo da solução contendo o alérgeno. Demonstramos que a preferência por BLG é natural e também ocorre durante a alergia e que a solução de *whey protein* (contendo BLG) tem efeito ansiolítico quando os camundongos sensibilizados e desafiados com *whey protein* passam pelo labirinto em cruz elevado. O efeito da BLG é robusto, uma vez que essa proteína, quando misturada à OVA durante o desafio oral, foi capaz de reduzir a aversão e aumentar o consumo de OVA em animais sensibilizados para esse alérgeno.

Nossos dados sugerem que os fenômenos aversivos não são absolutos e dependem do alérgeno. É possível que a BLG tenha características especiais que interferem no comportamento no que se refere a dois fenômenos distintos: a aversão e a preferência. Mais estudos são necessários para descrever os possíveis mecanismos pelos quais a BLG (se for o caso) intervém nesses conflitos.

8 Referências

- Acker, W. W., Plasek, J. M., Blumenthal, K. G., Lai, K. H., Topaz, M., Seger, D. L., ... Zhou, L. (2017). Prevalence of food allergies and intolerances documented in electronic health records. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *140*(6), 1587–1591.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.006>
- Ader, R., & Cohen, N. (1975). The hypothesis that immunosuppression might be behaviorally conditioned was invoked to explain certain incidental observations made in a study of illness-induced taste aversion (1). In the illness-induced taste aversion paradigm (2-4) an animal is. *Psychosomatic Medicine*, *37*(4), 333–340.
- Akdis, C. A., & Blaser, K. (2003). Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *112*(1), 15–22. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1585>
- Aldemir, H., Bars, R., & Herouet-Guicheney, C. (2009). Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *54*(3 SUPPL.), S52–S57. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.11.004>
- Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, *11*(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/nri2992>
- Andersson, U., & Tracey, K. J. (2012). Reflex Principles of Immunological Homeostasis. *Annual Review of Immunology*, *30*(1), 313–335. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075015>
- Andrade, M. C., Menezes, J. S., Cassali, G. D., Martins-Filho, O. A., Cara, D. C., & Faria, A. M. C. (2006). Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clinical and Experimental Immunology*, *146*(2), 312–322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03207.x>
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J., & Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, *7*(12), 975–987. <https://doi.org/10.1038/nri2199>
- Atchley, D. P. D., Weaver, K. L., & Eckel, L. A. (2005). Taste responses to dilute sucrose solutions are modulated by stage of the estrous cycle and fenfluramine treatment in female rats. *Physiology and Behavior*, *86*(3), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.001>
- Augustyniak, D., Nowak, J., & Lundy, F. T. (2012). Direct and indirect antimicrobial activities of neuropeptides and their therapeutic potential. *Current Protein & Peptide Science*, *13*(8), 723–38. <https://doi.org/10.2174/138920312804871139>
- Bacharier, L. B., & Geha, R. S. (2000). Molecular mechanisms of IgE regulation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *105*(2 Pt 2), S547-58. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(00\)90059-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(00)90059-9)
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Ninomiya, Y., Inoue, M., Tordoff, M. G., Price, R. A., & Beauchamp, G. K. (1997). Sucrose consumption in mice: Major influence of two genetic loci affecting peripheral sensory responses. *Mammalian Genome*, *8*(8), 545–548. <https://doi.org/10.1007/s003359900500>

- Bahna, S. L. (2002). Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89(6 SUPPL. 1), 56–60. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62124-2](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62124-2)
- Bailón, E., Cueto-Sola, M., Utrilla, P., Rodríguez-Ruiz, J., Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., ... Comalada, M. (2012). A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice. *Journal of Immunological Methods*, 381(1–2), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.04.007>
- Basso, A. S., Costa Pinto, F. A., Russo, M., Giorgetti Britto, L. R., De Sá-Rocha, L. C., & Palermo Neto, J. (2003). Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *Journal of Neuroimmunology*, 140(1–2), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00166-8)
- Batista, N. V., Pereira, R. V. S., Noviello, M. L. M., Dourado, L. P. A., Perez, D. A., Foureaux, G., ... Cara, D. C. (2014). Prolonged ingestion of ovalbumin diet by sensitized mice improves the metabolic consequences induced by experimental food allergy. *Clinical and Experimental Immunology*, 178(3), 416–427. <https://doi.org/10.1111/cei.12435>
- Bergmann, R. L., Edenharter, G., Bergmann, K. E., Guggenmoos-Holzmann, I., Forster, J., Bauer, C. P., ... Wahn, U. (1997). Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clinical & Experimental Allergy*, 27(7), 752–760. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1997.310899.x>
- Besedovsky, H., & Sorkin, E. (1977). Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clinical and Experimental Immunology*, 27(1), 1–12.
- Bhat, R., & Steinman, L. (2009). Innate and Adaptive Autoimmunity Directed to the Central Nervous System. *Neuron*, 64(1), 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.015>
- Bingham, C. O., & Austen, K. F. (2000). Mast-cell responses in the development of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(2), S527–S534. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(00\)90056-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(00)90056-3)
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., ... Samad, T. A. (2008). Nociceptors Are Interleukin-1 Sensors. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14062–14073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008>
- Bischoff, S., & Crowe, S. E. (2005). Gastrointestinal food allergy: New insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology*, 128(4), 1089–1113. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.015>
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2003). The Mouse Defense Test Battery: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 97–116. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01276-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01276-7)
- Bock, S. A., Muoz-Furlong, A., & Sampson, H. A. (2001). Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(1), 191–193. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.112031>
- Botta, P., Demmou, L., Kasugai, Y., Markovic, M., Xu, C., Fadok, J. P., ... Lüthi, A. (2015). Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1493–1500. <https://doi.org/10.1038/nn.4102>

- Boughter, J. D., & Bachmanov, A. A. (2007). Behavioral genetics and taste. *BMC Neuroscience*, 8(SUPPL. 3), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-S3-S3>
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 21(6), 567–574. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00526.x>
- Cara, D.C., Conde, a.a & Vaz, N. M. (1994). Immunological induction of flavor aversion in mice. *Brazilian J Med Biol Res*, 27 (1), 1331-1341.
- Cara, D. C., Conde, a a, & Vaz, N. M. (1997). Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scandinavian Journal of Immunology*, 45(1), 16–20. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-363.x>
- Carobrez, A. P., & Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193–1205. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>
- Cehade, M., & Mayer, L. (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.11.008>
- Chiu, I. M., Heesters, B. A., Ghasemlou, N., Von Hehn, C. A., Zhao, F., Tran, J., ... Woolf, C. J. (2013). Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature*, 501(7465), 52–57. <https://doi.org/10.1038/nature12479>
- Chiu, I. M., Von Hehn, C. A., & Woolf, C. J. (2012). Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1063–1067. <https://doi.org/10.1038/nn.3144>
- Chovatiya, R., & Medzhitov, R. (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular Cell*, 54(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.030>
- Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S. B. E., Letzkus, J. J., Vlachos, I., ... Lüthi, A. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, 468(7321), 277–282. <https://doi.org/10.1038/nature09559>
- Costa-Pinto, F. A., & Basso, A. S. (2012). Neural and behavioral correlates of food allergy. *Chem Immunol Allergy*, 98, 222–239. <https://doi.org/10.1159/000336525>
- Costa-Pinto, F. A., Basso, A. S., Britto, L. R. G., Malucelli, B. E., & Russo, M. (2005). Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. *Brain, Behavior, and Immunity*, 19(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.02.005>
- Costa-Pinto, F. A., Basso, A. S., De Sá-Rocha, L. C., Britto, L. R. G., Russo, M., & Palermo-Neto, J. (2006). Neural correlates of IgE-mediated allergy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1088, 116–131. <https://doi.org/10.1196/annals.1366.028>
- Cruz, A. P. M., Frei, F., & Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49(1), 171–176. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90472-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90472-3)

- Curtis, K. S., Stratford, J. M., & Contreras, R. J. (2005). Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiology and Behavior*, *86*(3), 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.002>
- Dantzer, R. (2018). Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiological Reviews*, *98*(1), 477–504. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2016>
- de Wit, J. N. (1998). Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, *81*(3), 597–608. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75613-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75613-9)
- Denis, M., Loras-Duclaux, I., & Lachaux, A. (2012). Sensibilisation et allergie aux protéines du lait de vache chez l'enfant allaité. *Archives de Pédiatrie*, *19*(3), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2011.12.002>
- Dourado, L. P. A., Noviello, M. de L. M., Alvarenga, D. M., Menezes, Z., Perez, D. A., Batista, N. V., ... Cara, D. C. (2011). Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. *Cellular Immunology*, *270*(2), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.05.008>
- Dourado, L. P. A., Saldanha, J. C. D. S., Gargiulo, D. L., Noviello, M. D. L. M., Brant, C. C., Reis, M. L. C., ... Cara, D. C. (2010). Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. *Cellular Immunology*, *262*(1), 62–8. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.12.010>
- Ennaceur, A., Michalikova, S., van Rensburg, R., & Chazot, P. L. (2008). Are benzodiazepines really anxiolytic?. Evidence from a 3D maze spatial navigation task. *Behavioural Brain Research*, *188*(1), 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.026>
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A. P. G., Urban, J. F., Curotto de Lafaille, M. A., & Lafaille, J. J. (2007). Unique Maturation Program of the IgE Response In Vivo. *Immunity*, *26*(2), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.12.006>
- Erickson, R. H., & Kim, Y. S. (1990). Digestion and absorption of dietary protein. *Annual Reviews of Medicine*, *41*, 133–139.
- Fadok, J. P., Krabbe, S., Markovic, M., Courtin, J., Xu, C., Massi, L., ... Lüthi, A. (2017). A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. *Nature*, *542*(7639), 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature21047>
- Fadok, J. P., Markovic, M., Tovote, P., & Lu, A. (2018). ScienceDirect New perspectives on central amygdala function, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.009>
- Fanselow, M. S., & LeDoux, J. E. (1999). Why we think plasticity underlying pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, *23*(2), 229–232. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80775-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80775-8)
- Fields, D. A., & Demerath, E. W. (2012). Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and. *Pediatric Obesity*, *7*(4), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>. Human
- Fiocchi, A., Schünemann, H. J., Brozek, J., Restani, P., Beyer, K., Troncone, R., ... Lockey, R. F. (2010). Diagnosis and rationale for action against Cow's milk allergy (DRACMA): A

- summary report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(6). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.011>
- Flower, D. R., North, A. C. T., & Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: Structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), 9–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00148-5)
- Foster, P. S., Hogan, S. P., Yang, M., Mattes, J., Young, I. G., Matthaei, K. I., ... Webb, D. C. (2002). Interleukin-5 and eosinophils as therapeutic targets for asthma. *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), 162–167. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02302-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02302-X)
- Franco, R., Pacheco, R., Lluís, C., Ahern, G. P., & O'Connell, P. J. (2007). The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends in Immunology*, 28(9), 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.005>
- French, S. J., & Totterdell, S. (2002). Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. *Journal of Comparative Neurology*, 446(2), 151–165. <https://doi.org/10.1002/cne.10191>
- Frieling, T., Cooke, H. J., & Wood, J. D. (1994). Neuroimmune Communication in the Submucous Plexus of Guinea-Pig Colon After Sensitization To Milk Antigen. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 267(6), G1087–G1093.
- Frossard, C. P., Steidler, L., & Eigenmann, P. A. (2007). Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4), 952–959. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.615>
- Furuno, T., Hagiyaama, M., Sekimura, M., Okamoto, K., Suzuki, R., Ito, A., ... Nakanishi, M. (2012). Cell adhesion molecule 1 (CADM1) on mast cells promotes interaction with dorsal root ganglion neurites by heterophilic binding to nectin-3. *Journal of Neuroimmunology*, 250(1–2), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.05.016>
- Gaillard, D., & Stratford, J. M. (2016). Measurement of Behavioral Taste Responses in Mice: Two-Bottle Preference, Lickometer, and Conditioned Taste-Aversion Tests. *Current Protocols in Mouse Biology*, 6(4), 380–407. <https://doi.org/10.1002/cpmo.18>
- Gautron, L., Rutkowski, J. M., Burton, M. D., Wei, W., Wan, Y., & Elmquist, J. K. (2013). Neuronal and nonneuronal cholinergic structures in the mouse gastrointestinal tract and spleen. *Journal of Comparative Neurology*, 521(16), 3741–3767. <https://doi.org/10.1002/cne.23376>
- Gomes-Santos, A. C., Fonseca, R. C., Lemos, L., Reis, D. S., Moreira, T. G., Souza, A. L., ... Faria, A. M. C. (2015). Hydrolyzed whey protein prevents the development of food allergy to ??-lactoglobulin in sensitized mice. *Cellular Immunology*, 298(1–2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.09.001>
- Gonipeta, B., Parvataneni, S., Paruchuri, P., & Gangur, V. (2010). Long-term characteristics of hazelnut allergy in an adjuvant-free mouse model. *International Archives of Allergy and Immunology*, 152(3), 219–225. <https://doi.org/10.1159/000283028>
- Goto, Y., & Grace, A. A. (2005). Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of

- nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nature Neuroscience*, 8(6), 805–812. <https://doi.org/10.1038/nn1471>
- Gruber, A. J., Hussain, R. J., & O'Donnell, P. (2009). The nucleus accumbens: A switchboard for goal-directed behaviors. *PLoS ONE*, 4(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005062>
- Grunau, B. E., Wiens, M. O., Rowe, B. H., McKay, R., Li, J., Yi, T. W., ... Scheuermeyer, F. X. (2015). Emergency Department Corticosteroid Use for Allergy or Anaphylaxis Is Not Associated with Decreased Relapses. *Annals of Emergency Medicine*, 66(4), 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2015.03.003>
- Guo, L., Huang, Y., Chen, X., Hu-Li, J., Urban, J. F., & Paul, W. E. (2015). Innate immunological function of T H 2 cells in vivo. *Nature Immunology*, 16(10), 1051–1059. <https://doi.org/10.1038/ni.3244>
- Hagiyama, M., Furuno, T., Hosokawa, Y., Iino, T., Ito, T., Inoue, T., ... Ito, A. (2011). Enhanced Nerve-Mast Cell Interaction by a Neuronal Short Isoform of Cell Adhesion Molecule-1. *The Journal of Immunology*, 186(10), 5983–5992. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002244>
- Handley, S. L., & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00504983>
- Hansen, L., Halken, S., Host, A., Moller, K., & Oster-Balle, O. (1993). Prediction of allergy from family history and cord IgE levels IV. *Allergy Immunol*, 4(1), 34–40.
- Harris, N., & Gause, W. (2011). B cell function in the immune response to helminths. *Trends in Immunology*, 32(2), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.11.005.B>
- Hart, B. L. (1991). The behavior of sick animals. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 21(2), 225–237. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50028-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50028-0)
- Hart, B. L. (2011). Behavioural defences in animals against pathogens and parasites: Parallels with the pillars of medicine in humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1583), 3406–3417. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0092>
- Heine, R. G. (2018). Food Allergy Prevention and Treatment by Targeted Nutrition. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 72(suppl 3), 33–45. <https://doi.org/10.1159/000487380>
- Helm, R. M., Furuta, G. T., Stanley, J. S., Ye, J., Cockrell, G., Connaughton, C., ... Burks, A. W. (2002). A neonatal swine model for peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(1), 136–142. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.120551>
- Hepburn, L., Prajsnar, T. K., Klapholz, C., Moreno, P., Loynes, C. A., Ogryzko, N. V., ... Floto, R. A. (2014). A Spaetzle-like role for nerve growth factor β in vertebrate immunity to *Staphylococcus aureus*. *Science*, 346(6209), 641–646. <https://doi.org/10.1126/science.1258705>
- Higginbotham, R. D., & Karnella, S. (2012). The Significance of the Mast Cell Response to Bee Venom Information about subscribing to The Journal of.

- Hou, I. C., Suzuki, C., Kanegawa, N., Oda, A., Yamada, A., Yoshikawa, M., ... Ohinata, K. (2011). β -Lactotensin derived from bovine β -lactoglobulin exhibits anxiolytic-like activity as an agonist for neurotensin NTS2receptor via activation of dopamine D1receptor in mice. *Journal of Neurochemistry*, *119*(4), 785–790. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07472.x>
- Hu, H. (2016). Reward and Aversion. *Annual Review of Neuroscience*, *39*(1), 297–324. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070815-014106>
- Husby, S., Foged, N., Host, A., & Svehag, S. E. (1987). Passage of dietary antigens into the blood of children with coeliac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Gut*, *28*(9), 1062–1072. <https://doi.org/10.1136/gut.28.9.1062>
- Ito, R., Robbins, T. W., Pennartz, C. M., & Everitt, B. J. (2008). Functional Interaction between the Hippocampus and Nucleus Accumbens Shell Is Necessary for the Acquisition of Appetitive Spatial Context Conditioning. *Journal of Neuroscience*, *28*(27), 6950–6959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1615-08.2008>
- Iwata, J., LeDoux, J. E., Meeley, M. P., Arneric, S., & Reis, D. J. (1986). Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Research*, *383*(1–2), 195–214. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90020-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90020-X)
- Jeffrey, J., Kim, S., & Chen, Z.-F. (2011). Itch Signaling in the Nervous System. *Physiology*, *26*(4), 286–292. <https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2011>
- Johansson, M. E. V, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G. C., ... Vos, W. M. de. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Pnas*, *105*(39), 15064–15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Kalish, R. S., & Askenase, P. W. (1999). Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: Implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *103*(2), 192–199. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70489-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70489-6)
- Kinsella, J. E., & Whitehead, D. M. (1989). Proteins in Whey: Chemical, Physical, and Functional Properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, *33*(C), 343–438. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60130-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60130-8)
- Kondo, H., Ichikawa, Y., & Imokawa, G. (1998). Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *European Journal of Immunology*, *28*(3), 769–779. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199803\)28:03<769::AID-IMMU769>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<769::AID-IMMU769>3.0.CO;2-H)
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, *87*(4), 785–796. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1)
- Lanser, B. J., Wright, B. L., Orgel, K. A., Vickery, B. P., & Fleischer, D. M. (2015). Current Options for the Treatment of Food Allergy. *Pediatric Clinics of North America*, *62*(6), 1531–1549. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.07.015>

- Le, D. D., Schmit, D., Heck, S., Omlor, A. J., Sester, M., Herr, C., ... Dinh, Q. T. (2017). Increase of Mast Cell-Nerve Association and Neuropeptide Receptor Expression on Mast Cells in Perennial Allergic Rhinitis. *NeuroImmunoModulation*, 23(5–6), 261–270. <https://doi.org/10.1159/000453068>
- Lee, H. J., Gallagher, M., & Holland, P. C. (2010). The central amygdala projection to the substantia nigra reflects prediction error information in appetitive conditioning. *Learning and Memory*, 17(10), 531–538. <https://doi.org/10.1101/lm.1889510>
- Lee, J., Yamamoto, T., Hayashi, S., Kuramoto, H., & Kadowaki, M. (2013). Enhancement of CGRP sensory afferent innervation in the gut during the development of food allergy in an experimental murine model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(3), 895–900. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.058>
- Leung, D. Y. M. (1998). Molecular Basis of Allergic Diseases. *Molecular Genetics and Metabolism*, 63, 157–167.
- Li, H., Penzo, M. A., Taniguchi, H., Kopec, C. D., Huang, Z. J., & Li, B. (2013). Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nature Neuroscience*, 16(3), 332–339. <https://doi.org/10.1038/nn.3322>
- Li, X. M., Serebrisky, D., Lee, S. Y., Huang, C. K., Bardina, L., Schofield, B. H., ... Sampson, H. A. (2000). A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1), 150–158. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.107395>
- Lindholm Bøgh, K., Barkholt, V., & Bernhard Madsen, C. (2013). The sensitising capacity of intact β -lactoglobulin is reduced by Co-administration with digested β -lactoglobulin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 161(1), 21–36. <https://doi.org/10.1159/000343042>
- Lister, R. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92(2), 0–5. <https://doi.org/10.1007/BF00177912>
- Liu, S., Hu, H.-Z., Gao, N., Gao, C., Wang, G., Wang, X., ... Wood, J. D. (2003). Neuroimmune interactions in guinea pig stomach and small intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284(1), G154–64. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00241.2002>
- Lukacs, N. W. (2001). Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 108–116. <https://doi.org/10.1038/35100503>
- Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F.-E., & Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*, 1(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.6>
- Man, A. L., Bertelli, E., Regoli, M., Chambers, S. J., & Nicoletti, C. (2004). Antigen-specific T cell-mediated apoptosis of dendritic cells is impaired in a mouse model of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 965–972. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.02.038>
- McCall, J. G., Al-Hasani, R., Siuda, E. R., Hong, D. Y., Norris, A. J., Ford, C. P., & Bruchas,

- M. R. (2015). CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron*, 87(3), 606–621. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.002>
- McClain, S., & Bannon, G. A. (2006). Animal models of food allergy: Opportunities and barriers. *Current Allergy and Asthma Reports*, 6(2), 141–144. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L43560088>
- McKerrow, J. H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., & Sajid, M. (2006). Proteases in Parasitic Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), 497–536. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100151>
- McMahon, S. B., La Russa, F., & Bennett, D. L. H. (2015). Crosstalk between the nociceptive and immune systems in host defence and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(7), 389–402. <https://doi.org/10.1038/nrn3946>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mestecky, J., Husby, S., Moldoveanu, Z., Waldo, F. B., van den Wall Bake, a W., & Elson, C. O. (1996). Induction of tolerance in humans: effectiveness of oral and nasal immunization routes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 778, 194–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8610973>
- Metz, M., Piliponsky, A. M., Chan, C. C., Lammel, V., Åbrink, M., Pejler, G., ... Galli, S. J. (2006). Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, 313(5786), 526–530. <https://doi.org/10.1126/science.1128877>
- Middleton, E. (1970). Lymphocyte Blast Transformation, 583–595.
- Mirotti, L., Castro, J., Costa-Pinto, F. a, & Russo, M. (2010). Neural pathways in allergic inflammation. *Journal of Allergy*, 2010, 491928. <https://doi.org/10.1155/2010/491928>
- Mirotti, L., Mucida, D., de Sá-Rocha, L. C., Costa-Pinto, F. A., & Russo, M. (2010). Food aversion: A critical balance between allergen-specific IgE levels and taste preference. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(3), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.12.006>
- Mogenson, G. J., Jones, D. L., & Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, 14(2–3), 69–97. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(80\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0301-0082(80)90018-0)
- Monaci L, Tregoat V, van Hengel AJ, A. E. (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food. *Eur Food Res Technol*, 223, 149–179.
- Monaci, L., Tregoat, V., Van Hengel, A. J., & Anklam, E. (2006). *Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. European Food Research and Technology* (Vol. 223). <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0178-8>
- Morafo, V., Srivastava, K., Huang, C. K., Kleiner, G., Lee, S. Y., Sampson, H. A., & Li, X. M. (2003). Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(5),

1122–1128. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1463>

- Mössner, R., & Lesch, K. P. (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain, Behavior, and Immunity*, *12*(4), 249–271. <https://doi.org/10.1006/brbi.1998.0532>
- Murakami-Satsutani, N., Ito, T., Nakanishi, T., Inagaki, N., Tanaka, A., Vien, P. T. X., ... Nomura, S. (2014). IL-33 Promotes the Induction and Maintenance of Th2 Immune Responses by Enhancing the Function of OX40 Ligand. *Allergology International*, *63*(3), 443–455. <https://doi.org/10.2332/allergolint.13-OA-0672>
- Nesse, R. (1999). Proximate and evolutionary studies of anxiety, stress and depression: Synergy at the interface. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*(7), 895–903. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00023-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00023-8)
- Noble, A., & Zhao, J. (2016). Follicular helper T cells are responsible for IgE responses to Der p 1 following house dust mite sensitization in mice. *Clinical and Experimental Allergy*, *46*(8), 1075–1082. <https://doi.org/10.1111/cea.12750>
- Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Roberts, G., Muraro, A., & Sheikh, A. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: A systematic review and meta-analysis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *69*(8), 992–1007. <https://doi.org/10.1111/all.12423>
- Palm, N. W., Rosenstein, R. K., & Medzhitov, R. (2012). Allergic host defences. *Nature*, *484*(7395), 465–472. <https://doi.org/10.1038/nature11047>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Pennartz, C. M. A., Groenewegen, H. J., & Lopes da Silva, F. H. (1994). The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: An integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Progress in Neurobiology*, *42*(6), 719–761. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90025-6)
- Pert, C. B., Weber, R. J., Herkenham, M., & Herkenham, M. (2018). Neuropeptides and their receptors : a psychosomatic network Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at: NEUROPEPTIDES AND THEIR RECEPTORS: A PSYCHOSOMATIC NETWORK.
- Profet, M. (1991). The Function of Allergy: Immunological Defense Against Toxins. *The Quarterly Review of Biology*, *66*(1), 23–62. <https://doi.org/10.1086/417049>
- Qu, Z. D., Thacker, M., Castelucci, P., Bagyánszki, M., Epstein, M. L., & Furness, J. B. (2008). Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell and Tissue Research*, *334*(2), 147–161. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0684-7>
- Ramos, A., & Mormède, P. (1997). Stress and emotionality: A multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *22*(1), 33–57. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00001-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00001-8)

- Rauscher, F. J., Voulalas, P. J., Franza, B. R., & Curran, T. (1988). Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. *Genes & Development*, 2(12 B), 1687–1699. <https://doi.org/10.1101/gad.2.12b.1687>
- Representation, C., Affective, O. F., In, R., & Amygdala, O. F. (1958). Readily Develop. *Methods*, (1954), 251–266.
- Restani, P., Ballabio, C., Tripodi, S., & Fiocchi, A. (2009). Meat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(3), 265–269. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32832aef3d>
- Rodgers, R. J., & Johnson, N. J. T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 52(2), 297–303. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00138-M](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-M)
- Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The Eosinophil. *Annual Review of Immunology*, 24(1), 147–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720>
- Round, J. L., O'Connell, R. M., & Mazmanian, S. K. (2010). Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *Journal of Autoimmunity*, 34(3). <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.007>
- Saarinen, K. M., Pelkonen, A. S., Mäkelä, M. J., & Savilahti, E. (2005). Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(4), 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.06.018>
- Saldanha, J. C. S., Gargiulo, D. L., Silva, S. S., Carmo-Pinto, F. H., Andrade, M. C., Alvarez-Leite, J. I., ... Cara, D. C. (2004). A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(6), 809–816. <https://doi.org/S0100-879X2004000600005>
- Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., ... Woolf, C. J. (2001). Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410(6827), 471–475. <https://doi.org/10.1038/35068566>
- Samad, T. A., Sapirstein, A., & Woolf, C. J. (2002). Prostanoids and pain: Unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends in Molecular Medicine*, 8(8), 390–396. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02383-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02383-3)
- Sampath, V., Sindher, S. B., Zhang, W., & Nadeau, K. C. (2018). New treatment directions in food allergy. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 120(3), 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.01.004>
- Saurer, L., & Mueller, C. (2009). T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 64(4), 505–519. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.01965.x>
- Sawatzky, D. A., Kingham, P. J., Court, E., Kumaravel, B., Fryer, A. D., Jacoby, D. B., ... Costello, R. W. (2002). Eosinophil adhesion to cholinergic nerves via ICAM-1 and VCAM-1 and associated eosinophil degranulation. *American Journal of Physiology* -

- Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(6), L1279–L1288.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00279.2001>
- Schemann, M., Michel, K., Ceregrzyn, M., Zeller, F., Seidl, S., & Bischoff, S. C. (2005). Human mast cell mediator cocktail excites neurons in human and guinea-pig enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility*, 17(2), 281–289.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2004.00591.x>
- Schultz, W. (2010). **【Re-40】** Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behavioral and Brain Functions : BBF*, 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-24>
- Scott, T. R. (2001). The role of taste in feeding. *Appetite*, 37(2), 111–113.
<https://doi.org/10.1006/appe.2001.0413>
- Seibold, F. (2005). Food-induced immune responses as origin of bowel disease? *Digestion*, 71(4), 251–260. <https://doi.org/10.1159/000087051>
- Shepherd, A. J., Downing, J. E. G., & Miyan, J. A. (2005). Without nerves, immunology remains incomplete - In vivo veritas. *Immunology*, 116(2), 145–163.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02223.x>
- Shigemura, N., Ohta, R., Kusakabe, Y., Miura, H., Hino, A., Koyano, K., ... Ninomiya, Y. (2004). Leptin Modulates Behavioral Responses to Sweet Substances by Influencing Peripheral Taste Structures. *Endocrinology*, 145(2), 839–847.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-0602>
- Shim, W.-S., Tak, M.-H., Lee, M.-H., Kim, M., Kim, M., Koo, J.-Y., ... Oh, U. (2007). TRPV1 Mediates Histamine-Induced Itching via the Activation of Phospholipase A2 and 12-Lipoxygenase. *Journal of Neuroscience*, 27(9), 2331–2337.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4643-06.2007>
- Sibilano, R., Frossi, B., & Pucillo, C. E. (2014). Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways. *European Journal of Immunology*, 44(9), 2558–2566. <https://doi.org/10.1002/eji.201444546>
- Sicherer, S. H. (2003). Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics*, 111(6 Pt 3), 1609–1616. <https://doi.org/10.1542/peds.111.6.S2.1609>
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S116–S125. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>
- Siegel, S., & Kreutzer, R. (1997). Pavlovian conditioning and multiple chemical sensitivity. *Environmental Health Perspectives*, 105 Suppl(March), 521–526.
<https://doi.org/10.1289/ehp.97105s2521>
- Simon, S. a, Liu, L., & Erickson, R. P. (2003). Neuropeptides modulate rat chorda tympani responses. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(6), R1494-505. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00544.2002>
- Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R., & Strobel, S. (2005). Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clinical and*

- Experimental Allergy*, 35(6), 757–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2005.02260.x>
- Strid, J., Thomson, M., Hourihane, J., Kimber, I., & Strobel, S. (2004). A novel model of sensitization and oral tolerance to peanut protein. *Immunology*, 113(3), 293–303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01989.x>
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G. S., Grant, E. P., ... Flavell, R. A. (2006). Critical role for NALP3/CIAS1/cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 24(3), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.004>
- Talbot, S., Foster, S. L., & Woolf, C. J. (2016). Neuroimmunity: Physiology and Pathology. *Annual Review of Immunology*, 34(1), 421–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055340>
- Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R., & Deenick, E. K. (2013). The good, the bad and the ugly—T FH cells in human health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 412–426. <https://doi.org/10.1038/nri3447>
- Thang, C. L., Baurhoo, B., Boye, J. I., Simpson, B. K., & Zhao, X. (2011). Effects of Lactobacillus rhamnosus GG supplementation on cow's milk allergy in a mouse model. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-20>
- Thijs, C., Müller, A., Rist, L., Kummeling, I., Snijders, B. E. P., Huber, M., ... Van Den Brandt, P. A. (2011). Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66(1), 58–67. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02445.x>
- Thomas, W. R., Hales, B. J., & Smith, W. A. (2005). Structural biology of allergens. *Current Allergy and Asthma Reports*, 5(5), 388–393. <https://doi.org/10.1007/s11882-005-0012-1>
- Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 44(2), 463–469. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90492-C](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90492-C)
- van der Kleij, H., Charles, N., Karimi, K., Mao, Y.-K., Foster, J., Janssen, L., ... Bienenstock, J. (2010). Evidence for neuronal expression of functional Fc (epsilon and gamma) receptors. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(3), 757–760. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.054>
- van der Staay, F. J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, 52(1), 131–159. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.01.006>
- Van Nassauw, L., Adriaensen, D., & Timmermans, J. P. (2007). The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 133(1), 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.10.003>
- Vaz, N. M., Maia, L. C. S., Hanson, D. G., & Lynch, J. M. (1977). Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *The*

- Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60(2), 110–115.
[https://doi.org/10.1016/0091-6749\(77\)90035-5](https://doi.org/10.1016/0091-6749(77)90035-5)
- Voisin, T., Bouvier, A., & Chiu, I. M. (2017). Neuro-immune interactions in allergic diseases: Novel targets for therapeutics. *International Immunology*, 29(6), 247–261.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxx040>
- von Hehn, C. A., Baron, R., & Woolf, C. J. (2012). Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. *Neuron*, 73(4), 638–652.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.008>
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>
- Wahn, U., & Von Mutius, E. (2001). Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(4), 567–574.
<https://doi.org/10.1067/mai.2001.112943>
- Wal, J. M. (2002). Cow's milk proteins/allergens. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 89(6 SUPPL. 1), 3–10. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62115-1](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62115-1)
- Wal, J. M. (2004). Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 93(5 SUPPL.), S2–S11. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61726-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61726-7)
- Walzem, R. L., Dillard, C. J., & German, J. B. (2002). Whey components: Millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(4), 353–375.
<https://doi.org/10.1080/10408690290825574>
- Welderufael, F. T., Gibson, T., & Jauregi, P. (2012). Production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from β -lactoglobulin- and casein-derived peptides: An integrative approach. *Biotechnology Progress*, 28(3), 746–755.
<https://doi.org/10.1002/btpr.1541>
- Wood, R. (2003). The natural history of food allergy. *Pediatrics*, 111(1631–1637).
- Xu, J., Postma, D. S., Howard, T. D., Koppelman, G. H., Zheng, S. L., Stine, O. C., ... Meyers, D. a. (2000). Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. *American Journal of Human Genetics*, 67(5), 1163–73.
<https://doi.org/10.1086/321190>
- Yamada, A., Mizushige, T., Kanamoto, R., & Ohinata, K. (2014). Identification of novel β -lactoglobulin-derived peptides, wheylin-1 and -2, having anxiolytic-like activity in mice. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(2), 353–358.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201300237>
- Yamauchi, R., Usui, H., Yunden, J., Takenaka, Y., Tani, F., & Yoshikawa, M. (2003). Characterization of beta-lactotensin, a bioactive peptide derived from bovine beta-lactoglobulin, as a neurotensin agonist. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(4), 940–943. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.940>

Zeiger, R. S. (2003). Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics*, *111*(6 Pt 3), 1662–1671. <https://doi.org/10.1542/peds.111.6.S2.1662>

Zimmermann, M., & Herdegen, T. (1994). Control of Gene Transcription by Jun and Fos Proteins in the Nervous System. *APS Journal*, *3*(1), 33–48.

ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 13 / 2015, relativo ao projeto intitulado "ESTUDO DAS DISFUNÇÕES METABÓLICAS E HEPÁTICAS EM CAMUNDONGOS COM ALERGIA ALIMENTAR: ÊNFASE NO PAPEL DOS NUTRIENTES E CITOCINAS", que tem como responsável Denise Carmona Cara Machado, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 31/03/2015. Este certificado espira-se em 31/03/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 13 / 2015, related to the Project entitled "STUDY OF METABOLIC AND LIVER DYSFUNCTIONS IN MICE WITH FOOD ALLERGY : FOCUS ON THE ROLE OF NUTRIENTS AND CYTOKINES", under the supervision of Denise Carmona Cara Machado, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 31/03/2015. This certificate expires in 31/03/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 31/03/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br