

Luana Pereira Antunes Dourado

**Avaliação dos mecanismos envolvidos na perda de
peso corpóreo em camundongos com alergia alimentar
experimental à ovalbumina**

**Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte / 2010**

Luana Pereira Antunes Dourado

**Avaliação dos mecanismos envolvidos na perda de
peso corpóreo em camundongos com alergia alimentar
experimental à ovalbumina**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof^a Denise Carmona Cara Machado

Departamento de Morfologia

Co-orientadora: Prof^a Danielle da Glória de Souza

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte / 2010

Agradecimentos

A Deus pelo seu amor infinito. Senti Sua presença em cada momento, me guiando, me amparando e me iluminando.

À minha orientadora Denise, a quem eu devo minha formação profissional. Tenho um carinho muito grande por você, que me conduziu, me apoiou e me incentivou durante os 7 anos de orientação.

À minha co-orientadora Dani, por também ter uma contribuição decisiva na minha formação científica. Agradeço muito pela integração ao grupo de pesquisa, pela amizade e pelo apoio.

À Adaliene, pela colaboração fundamental para que esse trabalho fosse realizado. Agradeço muito pela atenção e por sempre me receber com muito carinho.

À professora Leida, por ter cedido o laboratório e materiais para alguns experimentos.

Ao Gustavo, pelos experimentos de microscopia intravital.

À Mary, co-autora desse trabalho, por participar da minha vida e do meu crescimento. Obrigada pelo amor e paciência que me ajudaram a vencer cada etapa.

Às amigas Maria Letícia, Marta, Sandra e Cláudia pelo apoio técnico-científico e por compartilhar os mais diversos momentos. Vocês sempre serão importantes na minha vida.

À Débora Alvarenga, que não mediu esforços para me ajudar no desenvolvimento desse trabalho, sempre com muita disponibilidade, competência e carinho.

À Nathália, Sylvinha e Denise Perez, pela presença amiga e pela ajuda sempre que necessário.

Aos colegas e professores do Laboratório da Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração. Agradeço muito pelo agradável convívio.

Aos colegas do Laboratório de Interação Microorganismo Hospedeiro, por me receberem muito bem e pela disponibilidade. De modo especial, agradeço à Zélia e ao Dani pelo valioso auxílio em alguns experimentos.

Aos colegas do LIB pela abertura e simpatia. Agradeço de forma especial à professora Ana por me permitir fazer parte desse grupo. Também agradeço de forma especial à Ana Cris pela ajuda sempre que necessário.

À Sibebe, pela disponibilidade em ajudar sempre com carinho e dedicação.

Ao Bruno, que compartilhou cada momento desse doutorado com muita compreensão e amor. Amo você.

Aos meus pais, Maria e Zilmo, por me ensinarem a construir minha vida com dignidade. Obrigada pelo apoio incondicional, pela confiança e pelo amor.

Aos meus irmãos, que de formas diferentes me acompanham e me incentivam. Agradeço especialmente ao Vinícius que está sempre por perto e com quem eu sempre posso contar.

À Malu e Bruninho, pela alegria e por serem um incentivo a mais para que eu nunca desanime.

À Eunice, Dilson, Gláucio, Débora, Gabriel e Tiago por também serem minha família. Obrigada pelo apoio e incentivo.

A todos os meus familiares, em especial à Vó Maria pelas orações.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por todos esses anos de aprendizado e alegrias.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro do CNPq e da FAPEMIG.

RESUMO

A alergia alimentar afeta 5% das crianças e aproximadamente 3% da população adulta no mundo ocidental. Essa patologia consiste na manifestação de uma resposta imune anormal a antígenos introduzidos no organismo por via oral, sendo frequentemente mediada por IgE. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo em camundongos para o estudo da alergia alimentar induzida à ovalbumina. Uma das alterações mais marcantes da alergia observada nesses animais é um acentuado emagrecimento. Entretanto, os distúrbios que desencadeiam essa perda de peso corpóreo não estão elucidados. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos no emagrecimento de camundongos com alergia alimentar induzida à ovalbumina. Com esse objetivo, camundongos BALB/c foram sensibilizados com ovalbumina em hidróxido de alumínio por via subcutânea e desafiados com ração contendo o antígeno por 7 dias. Os camundongos alérgicos apresentaram emagrecimento expressivo com perda de tecido adiposo epididimal, mesmo não sendo observada diminuição da ingestão alimentar. Foi observada inflamação do tecido adiposo caracterizada por aumento do recrutamento de leucócitos e do infiltrado de mastócitos, macrófagos e células T reguladoras no estroma. Além disso, foram demonstradas concentrações elevadas das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e da quimiocina MCP-1/CCL-2 nesse tecido. As alterações metabólicas no tecido adiposo dos animais alérgicos foram representadas por aumento da captação da glicose e da lipólise nos adipócitos, o que resultou em hipotrofia destas células. Também foram observadas alterações no metabolismo sistêmico

caracterizadas pela diminuição das concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos livres nos camundongos alérgicos. Com base nos nossos resultados, podemos concluir que a alergia alimentar induz a inflamação do tecido adiposo com a produção de mediadores que levam à hipotrofia deste tecido. A diminuição da massa de tecido adiposo tem conseqüências sistêmicas e resulta na perda de peso corpóreo.

ABSTRACT

Food allergy affects approximately 5% of children and 3% of the adult population in the western world. This disease is the manifestation of an abnormal immune response to antigens introduced into the organism orally and it is often mediated by IgE. Our group developed a mouse model for the study of food allergy induced to ovalbumin. One of the most remarkable alteration observed in the allergic mice is a loss of weight. However, the disturbances that trigger this loss of body weight are not clear. Thus, the purpose of this study was to investigate the mechanisms involved in weight loss of mice with ovalbumin-induced food allergy. With this purpose, BALB/c mice were subcutaneously sensitized with ovalbumin in aluminum hydroxide and challenged with the antigen containing diet for 7 days. The allergic mice showed significant weight loss with loss of epididymal adipose tissue, although it was not observed a reduction in food intake. These mice demonstrated adipose tissue inflammation characterized by increased leukocyte recruitment and infiltration of mast cells, macrophages and regulatory T cells in the stroma. Moreover, we demonstrated high concentrations of TNF- α , IL-6, IL-10 and the chemokine MCP-1/CCL-2 in this tissue. The metabolic changes in adipose tissue of allergic animals were represented by increased glucose uptake and lipolysis in adipocytes, resulting in atrophy of these cells. Changes were also seen in systemic metabolism characterized by decreased serum concentrations of glucose, triglycerides, total cholesterol and free fatty acids in allergic mice. Based on our results, we conclude that food allergy induce adipose tissue

inflammation by producing mediators that lead to atrophy of this tissue. The decrease in adipose tissue mass has systemic consequences and results in loss of body weight.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo de indução da alergia alimentar.....	40
Figura 2 - Avaliação do peso corpóreo, ingestão alimentar e parâmetros nutricionais.....	57
Figura 3 - Avaliação do peso do músculo gastrocnêmio e do tecido adiposo epididimal.....	58
Figura 4 - Avaliação histológica do tecido adiposo.....	59
Figura 5 - Avaliação dos mastócitos no tecido adiposo.....	61
Figura 6 - Análise fenotípica dos leucócitos do tecido adiposo.....	62
Figura 7 - Microscopia intravital do tecido adiposo.....	64
Figura 8 - Avaliação da produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1/CCL2 no tecido adiposo.....	65
Figura 9 - Avaliação das alterações metabólicas no tecido adiposo epididimal.....	67
Figura 10 - Avaliação da glicemia, sensibilidade insulínica e tolerância à glicose.....	68
Figura 11 - Dosagens séricas de triglicerídeos, colesterol total e ácidos	

graxos livres.....	70
Figura 12 – Quantificação do conteúdo de lipídios totais no fígado.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ração padrão para roedores baseada na AIN-93G.....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN – Instituto americano de nutrição

AMPC – adenosina monofosfato cíclico

ATGL – lipase de triacilgliceróis do tecido adiposo

Ig – imunoglobulina

Th – células T auxiliares

CART – transcrito regulado pela anfetamina e cocaína

CEBIO – Centro de bioterismo

CFS – fator estimulador de colônia

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK – quinase regulada por sinal extracelular

FcεRI – receptor de alta afinidade para IgE

GLUT – transportador de glicose

H.E – hematoxilina - eosina

HSL – lipase hormônio sensível

IFN - interferon

IL – interleucina

IR – receptor de insulina

IRS – substrato do receptor de insulina

LPL – lipase lipoprotéica

LPS – lipopolissacarídeo

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

NPY – neuropeptídeo Y

OVA - ovalbumina

PAF – fator ativador de plaquetas

POMC – pró-opiomelanocortina

TCR – receptor de células T

TNF – fator de necrose tumoral

TLR – *toll like receptor*

PBS – salina tamponada fosfato

PKA – proteína quinase A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Alergia alimentar.....	19
1.2 Regulação do peso corpóreo.....	24
1.3 Metabolismo do tecido adiposo.....	27
1.4 Regulação metabólica pelas adipocinas.....	30
1.5 Inflamação e mobilização de reservas energéticas.....	34
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. METODOLOGIA	39
3.1 Animais.....	39
3.2 Sensibilização e desafio antigênico.....	39
3.3 Ração balanceada.....	41
3.4 Avaliação do peso corpóreo e da ingestão alimentar.....	41
3.5 Obtenção do sangue e do soro.....	43
3.6 Dosagens bioquímicas no soro.....	43
3.7 Medida do hematócrito.....	44
3.8 Avaliação do peso do tecido adiposo epididimal e do músculo gastrocnêmio.....	44
3.9 Histologia do tecido adiposo epididimal.....	44

3.10 Isolamento dos adipócitos.....	45
3.11 Citometria de fluxo do tecido adiposo epididimal.....	46
3.12 Microscopia intravital do tecido adiposo epididimal.....	48
3.13 Dosagem de citocinas e quimiocinas no soro e tecido adiposo epididimal.....	48
3.14 Medida do índice lipolítico dos adipócitos.....	50
3.15 Captação de glicose pelos adipócitos.....	50
3.16 Teste de tolerância à glicose e de sensibilidade insulínica.....	51
3.17 Determinação do conteúdo de lipídios totais no fígado.....	52
3.18 Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS.....	55
4.1 O emagrecimento dos camundongos alérgicos está associado à perda de tecido adiposo.....	55
4.2 Camundongos alérgicos apresentam hipotrofia dos adipócitos e infiltrado inflamatório no tecido adiposo.....	58
4.3 O tecido adiposo dos animais alérgicos apresenta hiperplasia de mastócitos.....	60
4.4 O tecido adiposo dos animais alérgicos apresenta alta frequência de macrófagos e células T reguladoras.....	60
4.5 A alergia alimentar induz aumento do recrutamento de leucócitos no tecido adiposo.....	62
4.6 A inflamação do tecido adiposo nos animais alérgicos está associada a altas concentrações locais de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-	

1/CCL2.....	63
4.7 A inflamação induz alterações metabólicas no tecido adiposo dos camundongos alérgicos.....	66
4.8 Camundongos alérgicos apresentam hipoglicemia.....	67
4.9 A alergia alimentar induz alterações sistêmicas nos camundongos.....	69
4.10 Camundongos alérgicos apresentam conteúdo de lipídios totais hepáticos comparáveis aos controles.....	69
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
9. ANEXOS.....	98
9.1 Anexo I.....	99
9.2 Anexo II.....	108

1. *Introdução*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alergia alimentar

A alergia alimentar é a manifestação de uma resposta imune anormal a antígenos introduzidos no organismo através da alimentação. Em indivíduos com sensibilidade a esses antígenos, um grupo de distúrbios é desencadeado após a ingestão de determinados alimentos (SICHERER & SAMPSON, 2010). Nesses indivíduos, a alergia está relacionada com a presença no soro de anticorpos específicos para antígenos alimentares, sendo com frequência associada a altas concentrações séricas de IgE (imunoglobulina E) (THIJS *et al.*, 2010).

Relativamente, poucos alimentos são responsáveis pela grande maioria das reações alérgicas (RADAUER & BREITENEDER, 2007). Esses alimentos incluem leite, ovo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar. Alergias a ovos e leite de vaca são observadas com maior frequência em crianças, enquanto frutos do mar e amendoim são as causas mais comuns de alergia em adultos (WANG & SAMPSON, 2009).

A maioria dos indivíduos em contato com antígenos desses alimentos, entretanto, não produz IgE específica nem desenvolve reações potencialmente lesivas. Tal observação se deve ao fato de que a mucosa intestinal apresenta

uma resposta imunológica caracterizada pela tolerância aos antígenos da dieta. Vários componentes imunológicos, como a IgA e as células T reguladoras, e não imunológicos, como as enzimas digestivas e o muco, contribuem para evitar a sensibilização do indivíduo aos antígenos alimentares (STROBEL & MOWAT, 2006). No entanto, as reações alérgicas podem se desenvolver em pessoas geneticamente susceptíveis quando a seletividade da mucosa intestinal aos antígenos é alterada. Entre os fatores capazes de induzir esse desequilíbrio, podemos citar a imaturidade da mucosa intestinal em crianças (EIGENMANN, 2009), o uso prolongado de antiácidos (UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2003; UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2008), a ingestão de álcool (KESHAVARZIAN *et al.*, 2009) e o stress (VICARIO *et al.*, 2010).

Nesses casos em que há diminuição da regulação imunológica e não imunológica da mucosa digestiva, pode ocorrer uma absorção exacerbada de moléculas da dieta que interagem com células apresentadoras de antígeno. Uma vez processadas por essas células, ocorre apresentação dos antígenos provenientes dessas moléculas para linfócitos T helper (Th). Essa fase inicial leva à proliferação dos linfócitos T e à síntese de citocinas que, por sua vez, promovem uma resposta característica de linfócitos Th2 (EIGENMANN, 2009). Sob a influência do ligante CD40 e das citocinas, principalmente IL-4, produzidas pelos linfócitos Th2, os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos secretores de IgE (BISCHOFF & CROWE, 2005). A IgE específica para o alérgeno produzida pelos plasmócitos entra na circulação e se liga aos receptores Fc nos mastócitos dos tecidos, de modo que essas células ficam

sensibilizadas e prontas para desgranular durante uma nova exposição ao alérgeno (NAUTA *et al.*, 2008).

As reações alérgicas ocorrem quando o antígeno é novamente ingerido e forma ligações com várias moléculas de IgE (*crosslinking*) ligadas a mastócitos. Essa ativação resultará na liberação de histamina, prostaglandina D₂, fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores que irão gerar muitas modificações locais responsáveis pelos sintomas imediatos da alergia alimentar. As principais alterações que ocorrem na fase aguda são a vasodilatação com extravasamento de plasma para os tecidos, constrição da musculatura lisa intestinal e infiltrado de neutrófilos no sítio inflamatório (STONE *et al.*, 2010). Tanto no trato respiratório como no digestivo, ocorre a produção de muco, sendo esse evento mediado principalmente pelas citocinas IL-4 e IL-13 (BLANCHARD *et al.*, 2004). No trato gastrointestinal, há um desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando a um estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (STONE *et al.*, 2010).

A reação alérgica aguda é seguida por uma resposta de fase tardia que é causada pela liberação de leucotrienos, citocinas e quimiocinas pelos mastócitos ativados. Entre as citocinas liberadas pelos mastócitos na inflamação alérgica estão o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Esses mediadores recrutam outros leucócitos, incluindo eosinófilos e linfócitos Th2 para o local de inflamação (MINAI-FLEMINGER & LEVI-SCHAFFER, 2009). O TNF- α , em especial, ativa a expressão endotelial das moléculas de adesão responsáveis pelos infiltrados de células mononucleares e polimorfonucleares (KNEILLING *et al.*, 2009).

A ocorrência de diferentes sintomas após a reação alérgica alimentar é determinada por diferenças na quantidade de mediadores inflamatórios liberados no intestino, na taxa de absorção dos antígenos ingeridos e na distribuição de mastócitos ligados à IgE específica ao antígeno. Além disso, esses sintomas refletem as quantidades de anticorpos IgA e IgG capazes de neutralizar o antígeno antes que este possa se ligar nas moléculas de IgE na superfície dos mastócitos (FINKELMAN *et al*, 2005).

As reações alérgicas alimentares dependentes de IgE podem afetar um ou mais órgãos: a pele (dermatite atópica e urticária), o trato respiratório (rinite e asma), o trato gastrointestinal (dor e diarreia) e o sistema cardiovascular (choque anafilático). Essas reações podem ser desencadeadas por exposição direta do órgão envolvido ou por distribuição sistêmica das proteínas após ingestão. Exemplos de reações por exposição direta às proteínas alergênicas são as reações gastrointestinais isoladas após alimentação, asma e rinite que ocorrem devido à inalação e urticária por contato local com estas proteínas. Já a reação sistêmica mediada por IgE é denominada anafilaxia e é constituída por reações alérgicas severas e potencialmente fatais. Nessa forma sistêmica mais extrema das reações alérgicas, os mediadores derivados dos mastócitos podem desencadear a obstrução das vias aéreas até o ponto de asfixia e produzir um colapso cardiovascular que pode resultar em morte (SICHERER & SAMPSON, 2010; TRIGGIANI *et al.*, 2008).

A alergia alimentar tem se tornado um problema de saúde pública devido à alta prevalência principalmente nas crianças. A alergia alimentar afeta 5% das crianças e aproximadamente 3-4% da população adulta no mundo ocidental (SICHERER & SAMPSON, 2010). Nas crianças, as alergias

alimentares estão relacionadas a deficiências nutricionais que podem interferir no crescimento, desenvolvimento neurológico e cardiovascular (NOIMARK & COX, 2008; ALDAMIZ-ECHEVARRIA *et al.*, 2008). Outro fator preocupante do ponto de vista nutricional é a frequente utilização de restrição alimentar como medida preventiva das reações alérgicas (SICHERER & SAMPSON, 2010). Portanto, o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na inflamação alérgica é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essa doença.

A utilização de modelos animais é uma importante alternativa para o estudo dos mecanismos envolvidos na reação alérgica, bem como para o desenvolvimento de estratégias clínicas que possam minimizar as reações adversas causadas por esta condição patológica. Com o objetivo de reproduzir experimentalmente as alterações induzidas pela alergia alimentar, nosso grupo desenvolveu um modelo murino de alergia à ovalbumina. Demonstramos que na ausência de outra opção líquida, a ingestão de clara de ovo por camundongos BALB/c sensibilizados é capaz de aumentar a produção de IgE e IgG1 anti-ovalbumina, gerar edema intestinal nas primeiras vinte e quatro horas e infiltrado de eosinófilos de quarenta e oito horas a quatorze dias na mucosa intestinal. Uma das alterações sistêmicas mais marcantes da alergia observada nos camundongos BALB/c, neste modelo, é um acentuado emagrecimento. Entretanto, os mecanismos associados a essa perda de peso não estão elucidados (SALDANHA, 2004).

Podemos sugerir algumas hipóteses para a indução do emagrecimento observado neste modelo de alergia alimentar. Uma possibilidade seria a ocorrência de diminuição da ingestão alimentar pelos animais alérgicos após o

desafio antigênico. Essa sugestão é baseada na observação de que a sensibilização alérgica pode levar à aversão alimentar em camundongos. Em estudos prévios, demonstramos que frente à opção de ingerir água ou solução de clara de ovo adocicada, camundongos sensibilizados com ovalbumina apresentam aversão à ingestão da solução contendo o antígeno (CARA *et al.*, 1994). Esse comportamento seletivo se mostrou associado a componentes imunológicos, uma vez que pôde ser transferido para animais receptores de células do baço e soro provenientes de doadores sensibilizados (CARA *et al.*, 1997). Posteriormente, foi comprovado que a aversão à ingestão do antígeno está correlacionada com a produção de IgE (BASSO *et al.*, 2003) e da citocina IL-4 (DOURADO *et al.*, 2010).

Como hipótese para a indução do emagrecimento nos animais alérgicos, também podemos sugerir que a alergia alimentar estaria desencadeando alterações no metabolismo energético destes animais. De alguma forma, a inflamação alérgica desencadearia uma maior mobilização de reservas nutricionais que levaria à diminuição do peso corpóreo.

1.2 Regulação do peso corpóreo

A massa corpórea é determinada pelo balanço entre a ingestão alimentar e o gasto energético. Em condições fisiológicas, o peso corpóreo é mantido relativamente constante por um sistema regulador formado por múltiplas interações entre o trato gastrointestinal, o tecido adiposo e o sistema nervoso central. Frente ao emagrecimento, adaptações fisiológicas

compensatórias induzem aumento do apetite e diminuição do gasto energético, enquanto respostas opostas são desencadeadas quando ocorre aumento de peso corpóreo (BOGUSZEWSKI *et al.*, 2010). Entretanto, em condições patológicas crônicas como a artrite reumatóide e câncer, essa regulação pode ser alterada levando ao emagrecimento expressivo. A perda de peso, nesses casos, é o resultado de alterações que ocorrem durante a progressão da doença, dentre elas a redução da ingestão alimentar, o aumento do gasto energético e a degradação de tecidos do organismo (FOULADIUN *et al.*, 2005).

Dentre os distúrbios desencadeantes do emagrecimento, a anorexia pode ser atribuída a alterações na saciedade e no apetite induzidas pela integração de sinais neurais e periféricos no hipotálamo. A sinalização através do neuropeptídeo Y (NPY), por exemplo, estimula a ingestão alimentar, enquanto as vias que envolvem a pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) inibem o apetite (BING & TRAYHURN, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

A leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos (ZHANG, *et al.*, 1994), inibe os neurônios produtores de NPY e estimula os produtores de POMC no hipotálamo favorecendo, dessa forma, a diminuição da ingestão alimentar (WANG *et al.*, 2008). Algumas citocinas, como a IL-1 β , TNF- α e a IL-7 também têm sido relacionadas à diminuição da ingestão alimentar através da ligação aos receptores em áreas do hipotálamo relacionadas à regulação da ingestão alimentar (STOFKOVA *et al.*, 2009; MACIA *et al.*, 2010; ARRUDA *et al.*, 2010).

As citocinas podem, ainda, modular atividades do trato gastrointestinal como a motilidade e o esvaziamento gástrico atuando, dessa forma, na inibição

do apetite. A citocina TNF- α , por exemplo, foi associada ao atraso do esvaziamento gástrico e do trânsito gastrointestinal em camundongos infectados por LPS (INADA *et al.*, 2006). Além disso, as citocinas podem também induzir a liberação de hormônios que atuam na saciedade alimentar, dentre eles o glucagon, a insulina e a leptina (BUCHANAN & JOHNSON, 2007).

Apesar da redução do apetite ser observada em pacientes com doenças crônicas como o com câncer, a anorexia por si só não justifica as alterações metabólicas da caquexia. Essa inferência é confirmada pelo fato de que o emagrecimento geralmente precede o início da anorexia e a suplementação nutricional é com frequência ineficiente na reversão dos quadros de caquexia (BING & TRAYHURN, 2008). Além disso, a massa de tecido adiposo se mantém diminuída em camundongos com colite experimental mesmo com ingestão alimentar em níveis comparáveis aos controles saudáveis (MELGAR *et al.*, 2007).

Os principais tecidos afetados durante o desenvolvimento da caquexia no câncer são o músculo esquelético e o tecido adiposo unilocular (FOULADIUN *et al.*, 2005). As investigações sobre a perda muscular demonstraram que esta alteração pode ser resultado tanto da redução da síntese protéica como do aumento da proteólise. A atrofia muscular observada em ratos com sepse está relacionada à diminuição da síntese protéica no músculo gastrocnêmio (KAZI *et al.*, 2010). Entretanto, camundongos com carcinoma experimental de cólon apresentam atrofia de diferentes músculos da pata devido à degradação protéica nestes locais (AULINO *et al.*, 2010).

Estudos experimentais e humanos demonstram também que no emagrecimento observado no câncer e na colite, a perda de tecido adiposo pode ser muito significativa (BING *et al.*, 2006; GAMBERO *et al.*, 2007; FOULADIUN *et al.*, 2005). Além disso, a diminuição do tecido adiposo ocorre mais rapidamente do que a perda de massa muscular em pacientes com câncer, o que pode ser extremamente deletério para o organismo (FOULADIUN *et al.*, 2005).

1.3 Metabolismo do tecido adiposo

O tecido adiposo constitui o principal reservatório energético do organismo armazenando ácidos graxos na forma de triacilgliceróis (TISDALE, 2009). O conteúdo de gordura corporal é determinado pelo balanço entre a deposição e a mobilização de lipídios do tecido adiposo. A deposição lipídica, na forma de triacilglicerol, é dependente da velocidade de síntese *de novo* de ácidos graxos (lipogênese) no tecido adiposo e da disponibilidade e captação de ácidos graxos não esterificados liberados dos triacilgliceróis transportados por lipoproteínas plasmáticas. Já a liberação de ácidos graxos não esterificados para a circulação é dependente, principalmente, da velocidade de hidrólise dos triacilgliceróis armazenados no próprio tecido (AHMADIAN *et al.*, 2007).

A síntese *de novo* de ácidos graxos é um processo que ocorre tanto no tecido adiposo quanto no fígado de mamíferos, tendo a enzima ácido graxo sintetase papel central nessa via. O principal substrato utilizado na síntese de ácidos graxos é a glicose (WAKIL & ABU-ELHEIGA, 2009); embora tanto o

piruvato quanto o lactato possam ser utilizados como precursores lipogênicos e gliceroneogênicos (BOTION *et al.*, 1995; KATZ & WALS, 1974). Após a síntese no tecido adiposo, os ácidos graxos são esterificados e o armazenamento como triacilglicerol constitui o principal substrato energético para utilização em períodos de baixa ingestão alimentar (TISDALE, 2009).

A captação da glicose pelos adipócitos auxilia na manutenção fisiológica da glicemia, sendo crucial para o controle do metabolismo sistêmico de carboidratos. O transporte desse substrato é dependente da atividade dos transportadores de glicose (GLUTs) localizados na superfície celular. O GLUT-1 é constitutivamente expresso na membrana celular, sendo responsável pela captação basal de glicose (DUCLUZEAU *et al.*, 2002). Em contrapartida, o GLUT-4 realiza o transporte de glicose dependente de insulina. Esse hormônio, ao se ligar ao seu receptor na superfície celular, induz uma cascata de sinalização que resulta na translocação do transportador de glicose GLUT-4 de sítios intracelulares para a membrana celular (ANTONESCU *et al.*, 2009).

Além da lipogênese, outra fonte de ácido graxo não esterificado para armazenamento no tecido adiposo são os triacilgliceróis plasmáticos, que constituem duas classes: os quilomicra derivados dos lipídios dietéticos e as lipoproteínas de muito baixa densidade secretadas pelo fígado. Como já mencionado, a captação e deposição dos triacilgliceróis plasmáticos no tecido adiposo requerem sua conversão inicial para ácido graxo não esterificado e glicerol e esta reação é catalisada pela lipase lipoproteica (LPL) (HOLLENBERG, 1966; WANG & ECKEL, 2009).

A LPL é uma enzima localizada no endotélio vascular de alguns tecidos, dentre eles o tecido adiposo, o tecido muscular cardíaco e esquelético, sendo

responsável pelo “clearance” das lipoproteínas circulantes (WANG & ECKEL, 2009). A LPL é um importante marcador da diferenciação dos adipócitos, uma vez que sua expressão aumenta à medida que os pré-adipócitos se diferenciam e passam a acumular triacilglicerol em seu citoplasma (SEMENKOVICH *et al.*, 1989). A atividade da LPL no tecido adiposo pode ser alterada em resposta ao estado nutricional em ratos e humanos, sendo aumentada no estado alimentado e diminuída no jejum (WANG & ECKEL, 2009).

Em contrapartida à deposição de triacilglicerol, a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo é realizada a partir da lipólise que consiste na hidrólise dos triacilgliceróis armazenados. A hidrólise sequencial dos triacilgliceróis é regulada por enzimas específicas e resulta na liberação de uma molécula de ácido graxo a cada passo com a geração de diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol. Durante muitos anos, acreditou-se que a enzima responsável pelo passo limitante desse processo era a lipase hormônio sensível (HSL) (WATT, 2009). Entretanto, em 2004, foi identificada a lipase de triacilgliceróis de tecido adiposo (ATGL), o que resultou numa nova visão da via lipolítica. Atualmente, acredita-se que a ATGL e a HSL trabalham hierarquicamente na regulação da hidrólise dos triacilgliceróis. A ATGL inicia a lipólise removendo o primeiro ácido graxo do triacilglicerol para produzir diacilglicerol, o qual é então hidrolisado pela HSL para gerar um ácido graxo adicional e monoacilglicerol (JENKINS *et al.*, 2004; VILLENA *et al.*, 2004; ZIMMERMANN *et al.*, 2004). Os monoacilgliceróis, por sua vez, são convertidos em ácido graxo e glicerol pela lipase de monoglicerídeos no passo final da lipólise (FREDRIKSON *et al.*, 1986). Os ácidos graxos liberados do

tecido adiposo se ligam à albumina e são transportados no sangue para utilização principalmente pelo músculo e fígado ou para reesterificação em triacilglicerol no tecido adiposo (LARGE *et al.*, 2004). Assim, os ácidos graxos não esterificados provenientes do tecido adiposo constituem uma fonte energética alternativa à glicose, poupando esse substrato para os requerimentos do cérebro (DIENEL & HERTZ, 2001).

As catecolaminas são potentes agentes lipolíticos que ativam a HSL através de fosforilação de resíduos de serina, num processo dependente do aumento intracelular de AMPc e posterior ativação da proteína quinase A (PKA) (MORIMOTO *et al.*, 2001). A insulina é um inibidor potente da lipólise e sua ação se dá por inibição da atividade da HSL, primariamente através da redução dos níveis intracelulares de AMPc resultantes da ativação da fosfodiesterase 3B específica do tecido adiposo (LARGE & ARNER, 1998). Ao contrário da HSL, a atividade da ATGL parece não ser diretamente regulada pela fosforilação por PKA, apesar de evidências de que a ATGL seja fosforilada por outra kinase desconhecida (ZIMMERMANN *et al.*, 2004).

1.4 Regulação metabólica pelas adipocinas

Além da clássica função de reservatório lipídico, o tecido adiposo também participa ativamente da regulação metabólica e interfere no sistema imune. O tecido adiposo unilocular, a forma predominante nos adultos, é formado por adipócitos, pré-adipócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos. Essa grande variedade celular secreta várias substâncias sinalizadoras chamadas, em conjunto, de adipocinas. Entre as

adipocinas estão a leptina, a adiponectina, a resistina, o TNF- α , a IL-6 e proteína quimioatratante de monócitos-1 (MCP-1/CCL2) que atuam de maneira endócrina, parácrina ou autócrina (WOZNIAK *et al.*, 2009).

A leptina foi a primeira adipocina identificada em 1994 como um fator de saciedade secretado pelo tecido adiposo e desde então, tem assumido um papel decisivo no controle da homeostase energética (ZHANG *et al.*, 1994). Como já mencionado anteriormente, a leptina é um hormônio responsável por enviar sinais para o hipotálamo sobre a quantidade de reservas energéticas na forma de tecido adiposo no organismo. Se há um balanço energético positivo com aumento da massa adiposa, o hipotálamo atua inibindo o apetite e aumentando o gasto energético através da indução de uma maior taxa de oxidação lipídica. No passado, considerava-se que a leptina atuava principalmente através do seu receptor no hipotálamo. Entretanto, estudos mais recentes demonstram que o receptor de leptina também está presente em muitos tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo (YINGZHONG *et al.*, 2006).

Além de exercer um papel metabólico importante, a leptina também interfere no sistema imune. Várias células envolvidas com as respostas imunológicas, dentre elas os neutrófilos, monócitos e linfócitos apresentam receptores para esse hormônio. Os efeitos imunológicos da leptina são pró-inflamatórios, promovendo respostas específicas de células Th1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , a IL-2 e a IL-6. Em contrapartida, a leptina é regulada por estes sinais pró-inflamatórios (FERNÁNDEZ-RIEJOS *et al.*, 2010).

A partir da descoberta da leptina, outras adipocinas foram sendo descritas, dentre elas algumas citocinas como o TNF- α . A produção dessa citocina pelo tecido adiposo ocorre em resposta a fatores nutricionais sendo a ingestão de uma dieta rica em gordura e a secreção de insulina indutores da secreção de TNF- α pelo tecido adiposo (HSIEH *et al.*, 2010; COPPACK, 2001). Além desses fatores, a administração de lipopolissacarídeo (LPS) também é capaz de induzir a secreção de TNF- α pelo tecido adiposo obtido de biópsias humanas (HOCH *et al.*, 2008). Os macrófagos são os principais responsáveis pela secreção de TNF- α no tecido adiposo.

Nos adipócitos, o TNF- α pode induzir a depleção de lipídios, tanto através da inibição da LPL, suprimindo a transcrição dessa enzima (PRICE *et al.*, 1986), quanto através do estímulo lipolítico (SUGANAMI *et al.*, 2005; LAURENCIKIENE *et al.*, 2007). Além disso, existem evidências de que o TNF- α reduz a captação de glicose pelos adipócitos pela inibição da expressão do GLUT-4 nestas células (LUMENG *et al.*, 2007). O TNF- α também induz a expressão de várias citocinas inflamatórias nos adipócitos, incluindo IL-6, MCP-1 e o próprio TNF- α (WANG & TRAYHURN, 2006).

A IL-6 também é citada entre as adipocinas, sendo a concentração dessa citocina no tecido adiposo cem vezes maior que no plasma. Essa observação sugere uma importante regulação autócrina e parácrina da IL-6 no metabolismo do tecido adiposo (SOPASAKIS *et al.*, 2004). Apesar de os adipócitos serem capazes de secretar IL-6, a maior parte desta citocina no tecido adiposo é proveniente das células do estroma vascular (FAIN *et al.*, 2004).

Os estudos demonstram que a IL-6 apresenta efeito lipolítico no tecido adiposo, uma vez que adipócitos tratados com esta citocina *in vitro* apresentam aumento significativo da lipólise (PETERSEN *et al.*, 2005). Além disso, altas concentrações plasmáticas de IL-6 foram correlacionadas à diminuição da ingestão alimentar e emagrecimento em um modelo experimental de colite e ao aumento da lipólise no tecido adiposo abdominal em mulheres (MELGAR *et al.*, 2007; MORISSET *et al.*, 2008). Com ação semelhante à do TNF- α , a IL-6 reduz a captação de glicose pelos adipócitos através da inibição da transcrição gênica do GLUT-4 e do substrato do receptor de insulina -1 (IRS-1) nos adipócitos (ROTTER *et al.*, 2003).

A quimiocina MCP-1/CCL-2 também é secretada no tecido adiposo, sendo sua produção aumentada pela leptina (WOZNIAK *et al.*, 2009). Essa quimiocina desempenha um papel importante no recrutamento de monócitos para o tecido adiposo, onde eles se diferenciam em macrófagos que passam a representar uma fonte importante de mediadores inflamatórios neste tecido (KANDA *et al.*, 2006; SUGANAMI *et al.*, 2005). Camundongos transgênicos com expressão elevada de MCP-1/CCL-2 nos adipócitos desenvolvem inflamação no tecido adiposo acompanhada de resistência insulínica (KANDA *et al.*, 2006; KAMEI *et al.*, 2006). Um estudo recente demonstrou que o aumento da concentração plasmática de MCP-1/CCL-2 em camundongos induz resistência insulínica no tecido adiposo, mesmo na ausência de infiltração de macrófagos. Entretanto, a elevação persistente dos níveis de MCP-1/CCL-2 induz o acúmulo de macrófagos e a exacerbação da resistência insulínica no tecido adiposo (TATEYA *et al.*, 2010).

Além da secreção de citocinas pró-inflamatórias, tem sido demonstrado que o tecido adiposo também produz citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Recentemente, foi demonstrado que o tecido adiposo abdominal de camundongos apresenta uma grande quantidade de células reguladoras CD4⁺Foxp3⁺ responsáveis pela secreção local de IL-10 em altas concentrações (FEUERER *et al.*, 2009). A expressão da IL-10 também se mostrou muito elevada em macrófagos do tecido adiposo de camundongos, apresentando um efeito protetor à resistência insulínica induzida por TNF- α nos adipócitos (LUMENG *et al.*, 2007).

1.5 Inflamação e mobilização de reservas energéticas

A ativação do sistema imune que ocorre nas doenças inflamatórias é bastante dispendiosa, uma vez que utiliza a energia equivalente a aproximadamente 25% da taxa de metabolismo basal (KUHNKE *et al.*, 2003; STRAUB *et al.*, 2010). Portanto, a resposta inflamatória necessita de suporte metabólico e de redistribuição de energia, e particularmente a mobilização dos estoques de carboidratos e lipídios ocorre no desenvolvimento da inflamação (CARRÉ & SINGER, 2008).

A glicose circulante é utilizada durante a inflamação como substrato para as células imunes. A captação de glicose é um fator limitante, por exemplo, para ativação dos linfócitos T. Nessas células, a glicose é transportada através do GLUT-1, sendo a expressão e translocação deste receptor para a membrana celular dependente da ativação via TCR (receptor de linfócitos T) e de estímulo pela citocina IL-7 (JACOBS *et al.*, 2008; WOFFORD *et al.*, 2008).

A lipólise dos depósitos de tecido adiposo ocorre nas doenças inflamatórias levando à liberação de ácidos graxos que também podem ser utilizados como substratos energéticos para as células imunológicas. Nesses casos, as alterações no metabolismo lipídico são reguladas, em grande parte, pelas citocinas pró-inflamatórias (STRAUB *et al.*, 2010). Um indicativo de conexão entre o tecido adiposo e as respostas inflamatórias é o fato de que a maioria dos linfonodos é envolvida por tecido adiposo. Após a ativação dos linfonodos por estímulo pró-inflamatório, ocorre um aumento da lipólise nos depósitos lipídicos que circundam esses órgãos. Portanto, sugere-se que o tecido adiposo associado aos linfonodos representa uma importante fonte energética para as células do sistema imune (GAMBERO *et al.*, 2007).

De fato, a indução da colite experimental em camundongos é acompanhada de aumento da lipólise basal no tecido adiposo mesentérico associado ao aumento da produção local de TNF- α (GAMBERO *et al.*, 2007). A IL-6 é uma citocina abundante no tecido adiposo com efeito lipolítico demonstrado em experimentos *in vitro*, nos quais o tratamento de adipócitos com esta citocina resultou em aumento significativo da lipólise nestas células (PETERSEN *et al.*, 2005).

Portanto, é possível que no modelo de alergia alimentar utilizado no nosso estudo, a produção de mediadores inflamatórios esteja contribuindo para induzir a mobilização de reservas energéticas dos camundongos que resulte na perda de peso corpóreo após a ingestão do antígeno.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos envolvidos no emagrecimento de camundongos com alergia alimentar induzida à ovalbumina.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 – Avaliar se perda de peso corpóreo nos animais alérgicos está relacionado às seguintes alterações:

- a) anorexia;
- b) desnutrição e/ou desidratação;
- c) alterações metabólicas.

2.2.2 – Investigar a relação da inflamação alérgica com possíveis distúrbios metabólicos que resultem na perda de peso corpóreo dos camundongos.

3. Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, com seis a oito semanas de idade. Os animais foram provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia, em gaiolas de plástico, contendo o máximo de seis animais/gaiola. Quando chegaram ao biotério, os animais foram vermifugados (Ivermectina 1%, JA Produtos Veterinários, Patrocínio Paulista, SP). Os animais receberam água “*ad libitum*” durante todo o experimento e ração comercial para camundongos (Purina, São Paulo, SP) até o desafio antigênico.

3.2 Sensibilização e desafio antigênico

O protocolo de sensibilização está esquematizado na figura 1. Para a indução da alergia alimentar, os camundongos foram injetados com 10µg de OVA (ovalbumina, Grade V, Sigma Chemical Co., USA) adsorvida em 1mg de hidróxido de alumínio (EMS, Hortolândia, SP) e 0,2mL de salina 0,9% por via subcutânea no dorso (dia 0). Os animais receberam um reforço da

sensibilização quatorze dias depois (dia 14) apenas com 10µg do antígeno diluído em salina.

O grupo controle recebeu o adjuvante diluído em salina no dia zero e apenas salina após quatorze dias.

Para o desafio antigênico, a partir do sétimo dia após o reforço da sensibilização (dia 21), os camundongos do grupo controle e alérgico receberam uma ração balanceada contendo 14% de ovalbumina (Tabela 1) como única fonte alimentar.

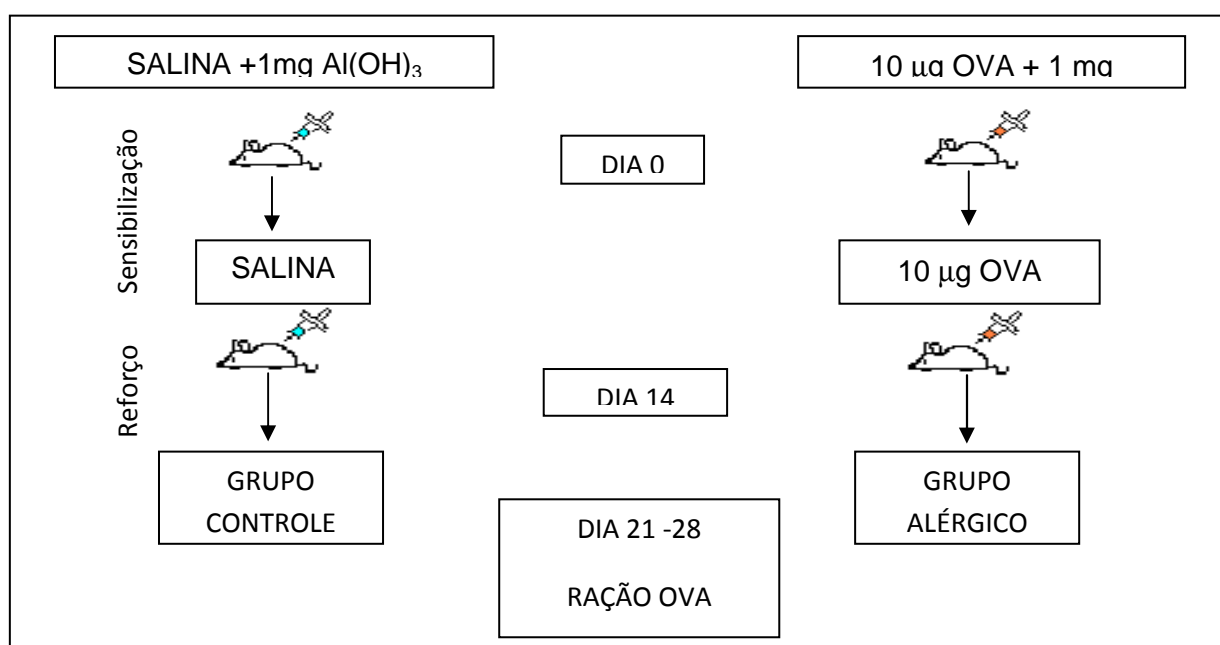


Figura 1. Protocolo de indução da alergia alimentar. Os camundongos do grupo controle receberam injeção subcutânea de salina + 1 mg Al(OH)₃ no dia 0 e apenas salina no dia 14 . O grupo alérgico recebeu injeção subcutânea de 10 µg ovalbumina (OVA) + 1 mg Al(OH)₃ no dia 0 e apenas OVA 14 dias após. Sete dias após o reforço da sensibilização, os animais receberam ração contendo OVA durante 7 dias.

3.3 Ração balanceada

Para o desafio antigênico, foi utilizada ração com composição baseada na AIN (American Institute of Nutrition) -93G descrita por Reeves *et al.* (1993). Essa ração foi preparada utilizando-se clara de ovo liofilizada (Saltos's, Salto, SP) na concentração de 14% (Tabela 1).

Todos os ingredientes foram pesados e misturados. O óleo foi pesado em uma quantidade 2 gramas maior, considerando-se a perda deste no vasilhame. A mistura de vitaminas foi adicionada por último e ao abrigo da luz. Após a adição de todos os ingredientes, a mistura foi peneirada três vezes para homogeneização. Após acréscimo de água, a ração foi moldada e acondicionada no freezer (-20° C).

3.4 Avaliação do peso corpóreo e da ingestão alimentar

O peso corpóreo foi avaliado uma vez por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o final, ou seja, sete dias após o início do desafio antigênico (dia 28).

Para medir a ingestão alimentar de cada grupo de animais durante o período de desafio antigênico (dia 21 a 28), a ração foi pesada antes e depois de ser colocada nas gaiolas.

Tabela 1: Ração padrão para roedores baseada na AIN-93G

INGREDIENTES	Nutriente em gramas	Kcal
Clara de ovo liofilizada	200	800
Cistina (metionina)	3	12
Amido de milho(Maisena®)	397,5	1590
Sacarose	100	400
Maltodextrina	132	528
Celulose	50	0
Óleo de soja	70	630
BHT	0,014	
Mistura de minerais	35	
Mistura de vitaminas	10	
Bitartarato de colina	2,5	

3.5 Obtenção do sangue e do soro

Ao final do desafio antigênico (dia 28), os camundongos foram submetidos a um período de jejum de aproximadamente 12 horas. Este mesmo período de jejum foi utilizado em outros trabalhos com camundongos BALB/c (CLAUS *et al.*, 2005) para investigações bioquímicas. Após esse período, os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg; Dopaser®, Hertape Calier Saúde Animal, Juatuba, MG) e ketamina (200mg/kg; Vetanarcol®, Laboratórios König do Brasil, Santana de Parnaíba, SP) por via intraperitoneal (i.p) e o sangue foi coletado através dos vasos axilares. Para a separação do soro, após coagulação, o sangue foi centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos. O soro foi então retirado, colocado em tubos individuais e congelado (-20°C) para análises posteriores.

3.6 Dosagens bioquímicas no soro

Os ensaios bioquímicos para dosagem de proteína total, albumina, glicose e triglicérides no soro dos animais foram realizados utilizando reagentes já padronizados e foi seguido o protocolo fornecido pelos fabricantes (KATAL, Belo Horizonte, MG).

A concentração sérica de ácidos graxos livres foi quantificada por método enzimático conforme instruções do fabricante dos reagentes (WAKO, Pure Chemical Industries, Japan).

3.7 Medida do hematócrito

Durante a necropsia, parte do sangue dos camundongos foi coletado em tubos contendo heparina (Hepamax-s®, Blausiegel, MG). Esse sangue foi transferido para tubos microcapilares que foram vedados em uma das suas extremidades e centrifugados a 11000rpm por 5 minutos para medida do hematócrito.

3.8 Avaliação do peso do tecido adiposo epididimal e do músculo gastrocnêmio

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical após sete dias de desafio com a ração contendo ovalbumina (dia 28). Durante a necropsia, foram retirados e pesados o tecido adiposo epididimal e o músculo gastrocnêmio. O peso desses tecidos foi correlacionado ao peso corpóreo do animal.

3.9 Histologia do tecido adiposo epididimal

O tecido adiposo epididimal foi coletado durante a necropsia e fixado em formalina 10% durante vinte e quatro horas para a coloração pela técnica de Hematoxilina – Eosina (H.E) (Vetec, Duque de Caxias, RJ). Para a coloração desse tecido por Azul de Toluidina (Vetec, Duque de Caxias, RJ), a fixação foi

realizada em Carnoy (10mL de ácido acético glacial, 30mL de clorofórmio, 60mL de álcool etílico absoluto) durante uma hora. Após a fixação, o tecido foi desidratado em álcool etílico absoluto, clarificado em xilol e embebido em parafina. Foram realizados cortes de 5µm que foram corados pela técnica de H.E ou Azul de Toluidina.

Para a medida da área dos adipócitos, lâminas histológicas do tecido adiposo epididimal coradas por H.E. foram analisadas utilizando-se um microscópio (Olympus Optical Co., Japan) equipado com uma câmera digital (Moticam 2500, China). A medida da área de 50 adipócitos por animal foi realizada através do software Image J.

A contagem de mastócitos foi realizada nas lâminas histológicas de tecido adiposo epididimal coradas por Azul de Toluidina. As células foram contadas em dez campos escolhidos ao acaso, utilizando-se a objetiva de 10X do microscópio (Olympus Optical Co., Japan).

3.10 Isolamento dos adipócitos

Após a necropsia dos animais, o tecido adiposo epididimal foi removido, cortado em pequenos fragmentos e incubado com colagenase (Sigma-Aldrich, USA) por 45 minutos a 37°C, sob agitação contínua, conforme descrito por Rodbell (1964). Ao término do período de incubação, as células foram filtradas através de uma tela de nylon, lavadas três vezes com tampão HEPES (pH 7,4) (Sigma-Aldrich, USA) contendo 1% de albumina bovina livre de ácidos graxos (Millipore, USA) e centrifugadas a 500rpm por 2 minutos. Em decorrência das

propriedades físicas das células do tecido adiposo, foi possível separar os adipócitos (sobrenadante) das células do estroma vascular (infranadante). Os adipócitos isolados foram ressuspensos na proporção de 1g de tecido para 20 mL de tampão. Nos experimentos para medida do índice lipolítico e da captação de glicose, foram utilizados *pool* de adipócitos de animais do mesmo grupo para alcançar a proporção citada anteriormente.

3.11 Citometria de fluxo do tecido adiposo epididimal

As células do estroma vascular do tecido adiposo epididimal foram isoladas como descrito no item 3.10 e submetidas à análise por citometria de fluxo. Foram adicionados a uma placa de 96 poços 25µL de uma suspensão celular em meio HEPES (Sigma-Aldrich, USA) contendo 2×10^5 células por poço. Para a marcação intracitoplasmática do fator de transcrição Foxp3, foi utilizado um pré-tratamento com brefeldina A (1µg/ml) por quatro horas em estufa de CO₂. Ao final das quatro horas, retirou-se a placa da estufa e centrifugou-se por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram suspensas por agitação leve em vórtex. Em seguida, adicionaram-se os anticorpos anti-marcadores de superfície (F4/80-FITC, CD4-FITC, CD25-PeCy5; BD Pharmigen, USA), já diluídos, conforme titulação anteriormente padronizada no nosso laboratório, num volume final de 40µL.

Após adição dos anticorpos, a placa foi incubada a 4°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, procedeu-se a lavagem das células adicionando 150 µL de PBS (*phosphate buffered saline*) gelado em cada poço. A placa foi então, centrifugada durante 10 minutos a 4°C. Ao final

da centrifugação, verteu-se a placa para retirar o sobrenadante e, em seguida, a placa foi agitada a fim de suspender as células. De posse das células já suspensas, adicionaram-se, finalmente, 100µL de PBS e 100µL de solução de formaldeído 4%. O volume final de 200µL de solução contendo as células marcadas com anticorpo anti-F4/80 foi transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo.

As células marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD25 foram mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente e seguiu-se o protocolo de marcação intracelular com anticorpo anti-Foxp3. Após remover a solução de fixação por centrifugação e lavar as células com 150µL de PBS, seguiu-se a permeabilização celular, incubando as células por 10 minutos com solução de saponina 0,5% à temperatura ambiente. Ao final do período de incubação, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e a placa foi agitada. Em seguida, adicionaram-se sobre as células, 40µL da solução de anticorpo anti-Foxp3 marcado com o fluorocromo PE (BD Pharmingen, USA), adequadamente diluído em solução de saponina 0,5%. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados às células 150µL da solução de saponina seguido de centrifugação e decantação. Repetiu-se por duas vezes esta operação sendo que, na última vez, as células foram lavadas com Wash B (PBS; 0,5% BSA; 2mM azida). Após desprezar o sobrenadante e agitar a placa, as células foram diluídas em 100µL de PBS e 100µL de solução de formaldeído 4%. O volume final de 200µL de solução contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson,

USA). A porcentagem de células positivas foi analisada através do software Flow Jo (Tree Star). Foram adquiridos 30.000 eventos para análise.

3.12 Microscopia intravital do tecido adiposo epididimal

Para a realização da microscopia intravital, os camundongos foram anestesiados como descrito no item 3.5. A veia jugular direita foi canulada e os animais receberam injeção intravenosa de rodamina 6G (Sigma Chemical Co., USA) (0,15mg/Kg). O tecido adiposo epididimal foi exposto para a análise das interações entre leucócitos e endotélio na microcirculação.

A microcirculação foi visualizada através de um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse, Japan) conectado a uma câmera (Nikon, Japan) que transmitia a imagem a um monitor de televisão. A imagem foi gravada em DVD para análises posteriores.

Para as análises, foram escolhidas vênulas de calibre entre 40 e 60 μ m. Os leucócitos em rolamento foram avaliados contando-se o número de células que passavam por um determinado ponto da vênula por minuto. O leucócito foi considerado aderido se permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos, sendo a adesão leucocitária total quantificada como o número de células aderidas em 100 μ m de extensão da vênula.

3.13 Dosagem de citocinas e quimiocinas no soro e tecido adiposo epididimal

Durante a necropsia, foram coletados o soro e o tecido adiposo epididimal dos camundongos como descrito anteriormente. Fragmentos do tecido adiposo epididimal foram macerados em um homogeneizador (Omni International, USA) na presença de 1mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89g diluídos em 1litro). A solução resultante foi centrifugada por 10min a 10000 rpm a 4^oC e o infranadante foi recolhido para a dosagem de citocinas ou quimiocinas por ELISA.

O ensaio imunoenzimático foi realizado de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante dos reagentes utilizados (R&D Systems, USA). No soro, foram medidas as concentrações de TNF- α e IL-6, enquanto no tecido adiposo, além dessas citocinas, foram medidas as concentrações de IL-10 e MCP-1/CCL-2. Placas de ELISA foram cobertas com anticorpos policlonais anti- TNF- α , anti-IL-6, anti-IL-10 ou anti- MCP-1/CCL2 (1-2 μ g/ml) e incubadas a 4^oC por 24 horas. As placas foram lavadas três vezes, a reação foi bloqueada com albumina bovina 1% (Sigma Chemical Co., USA) e as placas foram deixadas em agitador horizontal durante 1 hora. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com as amostras do soro não diluído ou infranadantes do tecido adiposo na diluição de 1:3 em PBS/albumina bovina 1% de um dia para

o outro (*overnight*). Os anticorpos policlonais biotinilados foram usados com diluição de 1:1000 ou 1:2000. A detecção foi feita utilizando-se estreptoavidina e OPD como substrato. A leitura foi realizada a 492nm.

3.14 Medida do índice lipolítico dos adipócitos

A liberação de glicerol para o meio de incubação foi utilizada como índice lipolítico conforme descrito por Gasic & Green (1995). Os adipócitos foram separados como descrito no item 3.10 e incubados a 37°C por 1 hora sob agitação. Ao término do período de incubação, uma alíquota do infranadante foi removida e o teor de glicerol quantificado por método enzimático conforme instrução do fabricante dos reagentes (LABTEST, Lagoa Santa, MG).

3.15 Captação de glicose pelos adipócitos

Após isolamento descrito no item 3.10, as células adiposas foram lavadas com tampão HEPES (Sigma-Aldrich, USA) e incubadas por 45 minutos na ausência ou presença de insulina (25ng/mL; Sigma-Aldrich, USA) para a análise do processo de captação de glicose e da sensibilidade insulínica do tecido adiposo conforme descrito por Botion & Green (1999). Para isso, foram adicionados aos tubos 50µL de 2-deoxy-[³H]glicose (Perkin Elmer, USA) e as células foram incubadas por mais 3 minutos. Após esse período de incubação as células foram colocadas em um tubo de microcentrífuga contendo 70-80µL

de silicone. Imediatamente, os tubos foram centrifugados por 60 segundos. Como o silicone tem densidade intermediária entre as células e o meio de incubação, foram formadas três camadas após a centrifugação. O tubo foi cortado na fase intermediária (silicone), a camada de células foi removida e transferida para um frasco contendo líquido de cintilação (tolueno-PPO-POPOP-Triton; Amersham Bioscience, USA) para a contagem da radioatividade da 2-deoxy-[³H]glicose-6-fosfato. O cálculo do índice de captação de glicose *in vitro* foi feito considerando-se a radioatividade da 2-deoxy-[³H]glicose nas células e a concentração deste composto no meio de incubação.

3.16 Teste de tolerância à glicose e de sensibilidade insulínica

Para a realização do teste de tolerância à glicose, os camundongos foram submetidos à aproximadamente 12 horas de jejum. Após esse período, os animais receberam injeção intraperitoneal de glicose (2mg/g de peso corpóreo; Sigma-Aldrich, USA). Amostras sanguíneas foram coletadas da cauda e os níveis de glicose foram monitorados 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção através de um glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostics, USA).

O teste de sensibilidade insulínica foi realizado em camundongos alimentados após a injeção intraperitoneal de insulina (0,75 unidade/kg de peso corpóreo; Sigma-Aldrich, USA). Amostras de sangue da cauda foram coletadas 0, 15, 30 e 60 minutos após a injeção para a medida dos níveis glicêmicos através do mesmo glicosímetro especificado acima.

3.17 Determinação do conteúdo de lipídios totais no fígado

Durante a necropsia, após aproximadamente 12 horas de jejum, o fígado dos animais foi removido, lavado em solução salina 0,9%, pesado e armazenado a -20°C para as análises posteriores. A extração dos lipídios do fígado foi realizada segundo o método descrito por Folch *et al* (1957). Em resumo, 100mg de fígado foram triturados durante 3 minutos em tubos contendo 1900µL de uma solução de clorofórmio e metanol (2:1), usando-se homogeneizador (Omni International,USA). Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000rpm após adição de 400µL de metanol. O sobrenadante foi recolhido em um tubo de peso conhecido e, posteriormente, acrescido de 800µL de clorofórmio e 640µL de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 minutos a 3000rpm, a fase superior foi desprezada. A parede interior de cada tubo foi lavada 3 vezes com 600µL de solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,9%). Após cada lavagem, a fase superior foi descartada. Os extratos lipídicos obtidos foram secos em estufa *overnight* a 37°C e os lipídeos quantificados gravimetricamente.

3.18 Análise estatística

Os dados foram analisados no programa Prisma 4.0 e apresentados como média ± erro padrão da média. Para a análise estatística, os dados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA-Tukey) ou ao teste T de Student, conforme especificado nas legendas das figuras. O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 O emagrecimento dos camundongos alérgicos está associado à perda de tecido adiposo

Camundongos BALB/c foram sensibilizados com OVA e desafiados com ração contendo o antígeno. Após sete dias de ingestão contínua e restrita dessa ração, os camundongos alérgicos apresentaram uma perda de aproximadamente 16% do peso corpóreo (Figura 2A).

Para verificar se o emagrecimento estava associado com uma diminuição da ingestão alimentar, o consumo da ração foi avaliado. Como demonstrado na Figura 2B, tanto animais controle como alérgicos tiveram consumo similar, de 4-5 g/dia, o esperado dentro dos padrões normais observados na literatura (DORN *et al.*, 2010). Esse consumo diário se repetiu em vários experimentos realizados durante esse trabalho. Para se verificar um possível quadro de desnutrição, foram avaliados os níveis séricos de proteína total e de albumina. Como demonstrado nas Figuras 2C e 2D, esses valores foram semelhantes entre os dois grupos e entre os valores de referência para camundongos. De acordo com outros trabalhos, a referência sérica de proteína total para camundongo BALB/c é de 4,85-5,44 g/dL e a de albumina sérica é de 1,14- 1,31 g/dL respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2008). A avaliação do hematócrito revela a porcentagem das hemácias presentes no sangue em relação à sua composição total. Os valores elevados indicam desidratação,

policitemia ou choque e os valores menores indicam anemia, perda sanguínea, hemólise, leucemia, hipertireoidismo, cirrose ou hiperhidratação (KERR, 2003). Como apresentado na Figura 2E, os valores do hematócrito obtidos nos dois grupos, ao final do experimento, são semelhantes entre si e com os valores de referência para camundongos BALB/c (40-46%) (PEREIRA *et al.*, 2003), o que sugere que, no quadro alérgico estudado, a perda de peso não está associada com desidratação e nem com desnutrição.

O peso do tecido adiposo epididimal e do músculo gastrocnêmio são extensivamente utilizados na literatura como parâmetros para a investigação de massa de gordura e muscular, respectivamente, em animais experimentais (ILAN *et al.*, 2010; KAZI *et al.*, 2010). Portanto, avaliamos o peso desses dois tecidos nos camundongos e observamos que os animais alérgicos apresentaram diminuição do peso do tecido adiposo epididimal em relação ao grupo controle (Figura 3A). Entretanto, conforme demonstrado na Figura 3B, não houve alteração no peso do músculo gastrocnêmio. Esses resultados se repetiram em vários experimentos durante a execução desse estudo. Podemos inferir, portanto, que a perda de tecido adiposo contribui de maneira significativa para o emagrecimento dos camundongos alérgicos.

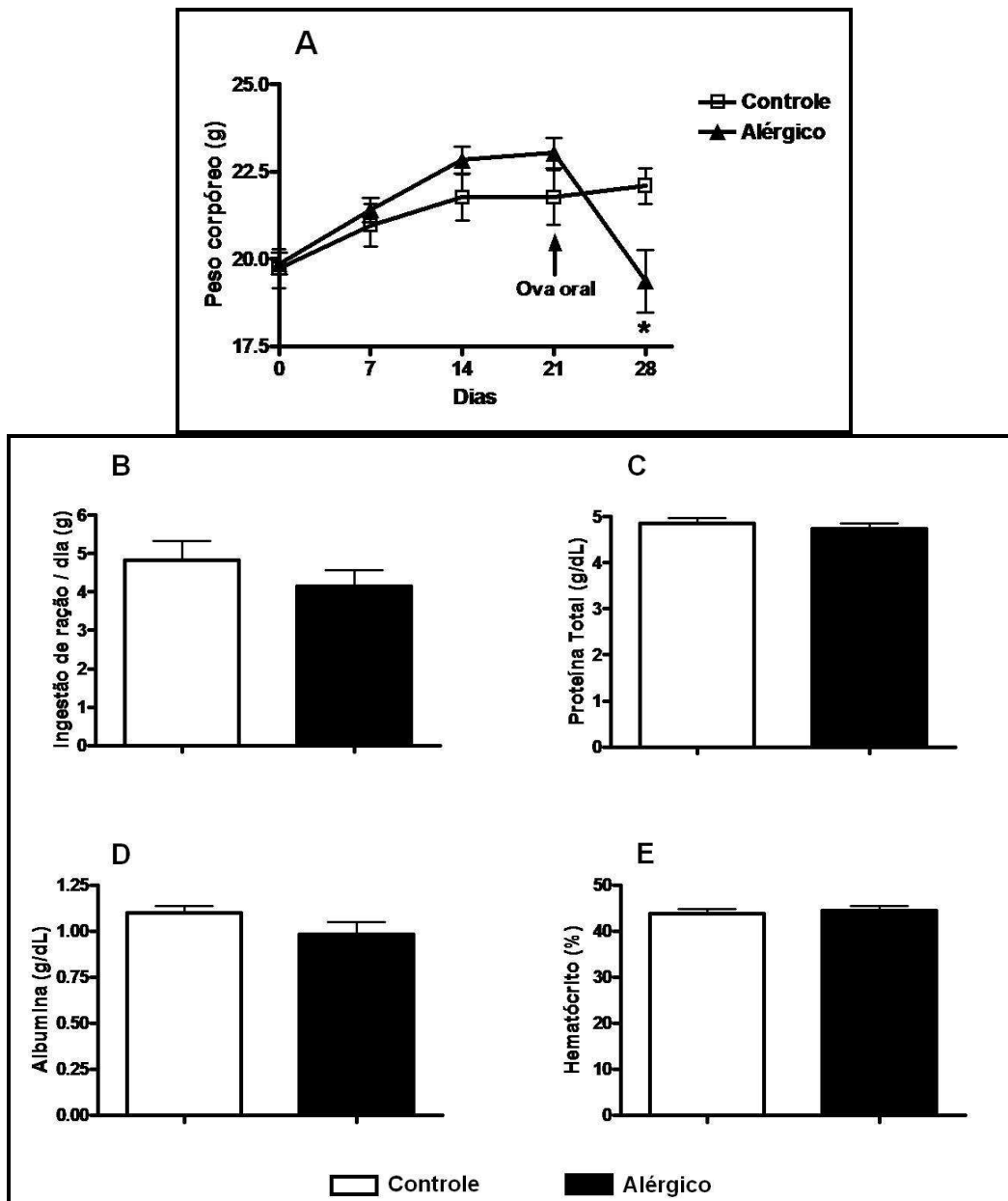


Figura 2. Avaliação do peso corpóreo, ingestão alimentar e parâmetros nutricionais.

Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. O peso corpóreo foi avaliado durante todo o experimento (dia 0 a 28) (A) e o consumo de ração foi medido durante o desafio antigênico (dia 21 a 28) (B). Durante a necropsia (dia 28), o soro foi coletado para medida de proteína total (C) e albumina. O sangue foi coletado para medida do hematócrito (E). Foram utilizados 6 animais por grupo. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

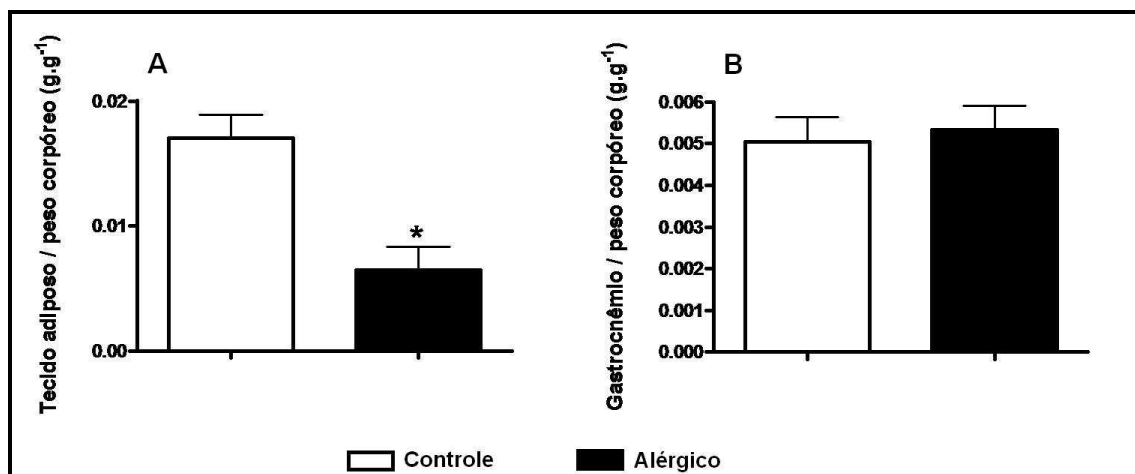


Figura 3. Avaliação do peso do músculo gastrocnêmio e do tecido adiposo epididimal. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Durante a necropsia (dia 28), o tecido adiposo epididimal (A) e o músculo gastrocnêmio (B) foram coletados e pesados. Foram utilizados 6 animais por grupo. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

4.2 Camundongos alérgicos apresentam hipotrofia dos adipócitos e infiltrado inflamatório no tecido adiposo

O tecido adiposo epididimal foi retirado durante a necropsia e analisado histologicamente. A coloração por Hematoxilina – Eosina revelou um infiltrado celular inflamatório entre os adipócitos dos animais alérgicos (Figura 4B), caracterizado por células mononucleares (Figura 4C), o que não foi observado no grupo controle (Figura 4A).

A área dos adipócitos foi medida por morfometria para investigar se a perda de tecido adiposo estaria relacionada à hipotrofia destas células. De fato, foi demonstrado que os adipócitos dos animais alérgicos apresentam área significativamente diminuída em relação aos controles (Figura 4D).

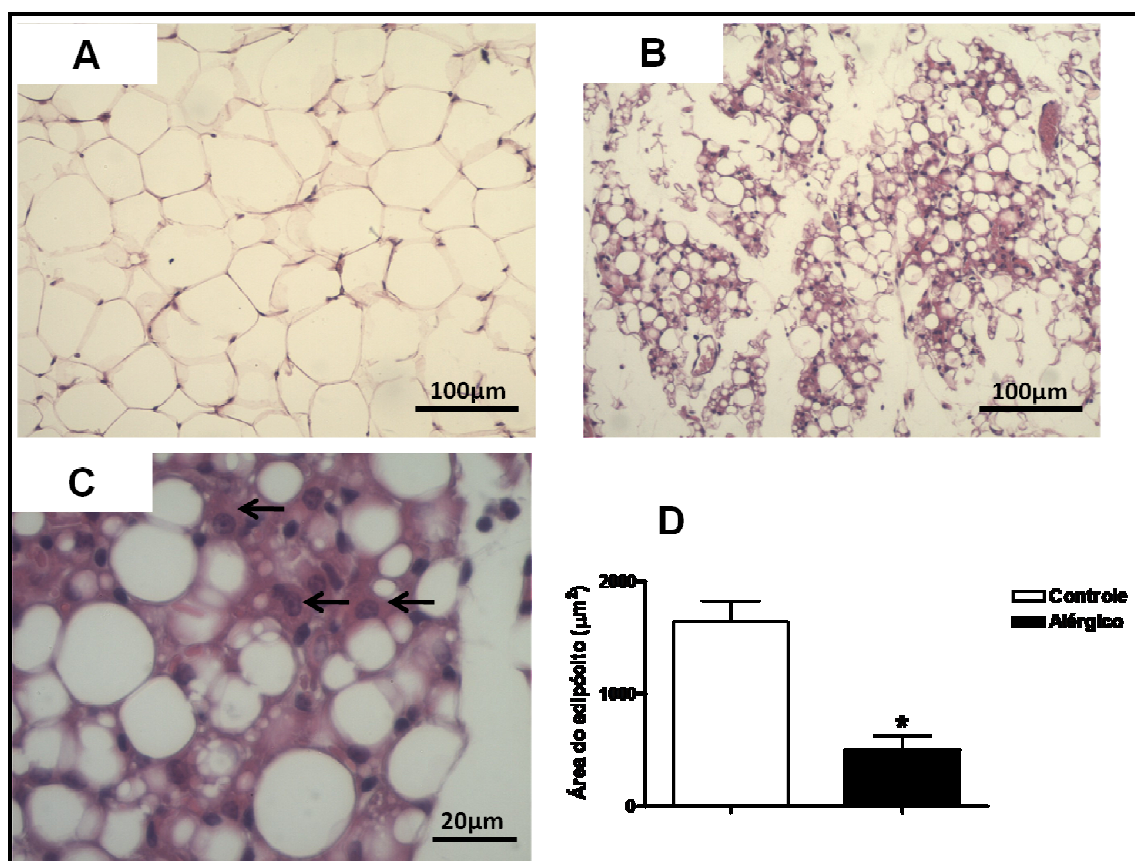


Figura 4. Avaliação histológica do tecido adiposo. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), o tecido adiposo epididimal foi coletado e corado por Hematoxilina-Eosina. A) Imagem representativa do grupo controle. B e C) Imagens representativas do grupo alérgico. Foi medida a área de 50 adipócitos por animal (D). Foram utilizados 5 animais por grupo. As setas em C indicam células mononucleares. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

4.3 O tecido adiposo dos animais alérgicos apresenta hiperplasia de mastócitos

Com o intuito de caracterizar melhor o quadro inflamatório observado no estroma do tecido adiposo epididimal dos camundongos alérgicos, as lâminas histológicas foram coradas com Azul de Toluidina (Figuras 5A e B) Foi demonstrado um aumento no número de mastócitos infiltrados no tecido adiposo dos camundongos alérgicos quando comparados ao grupo controle (Figura 5C).

4.4 O tecido adiposo dos animais alérgicos apresenta alta frequência de macrófagos e células T reguladoras

O tecido adiposo epididimal dos camundongos foi submetido à análise por citometria de fluxo para melhor caracterização fenotípica das células presentes no estroma desse tecido. A partir dessa análise, foi demonstrado aumento da frequência de células F4/80⁺ (Figura 6A) e CD4CD25Foxp3⁺ (Figura 6B) no tecido adiposo dos animais alérgicos em relação aos controles.

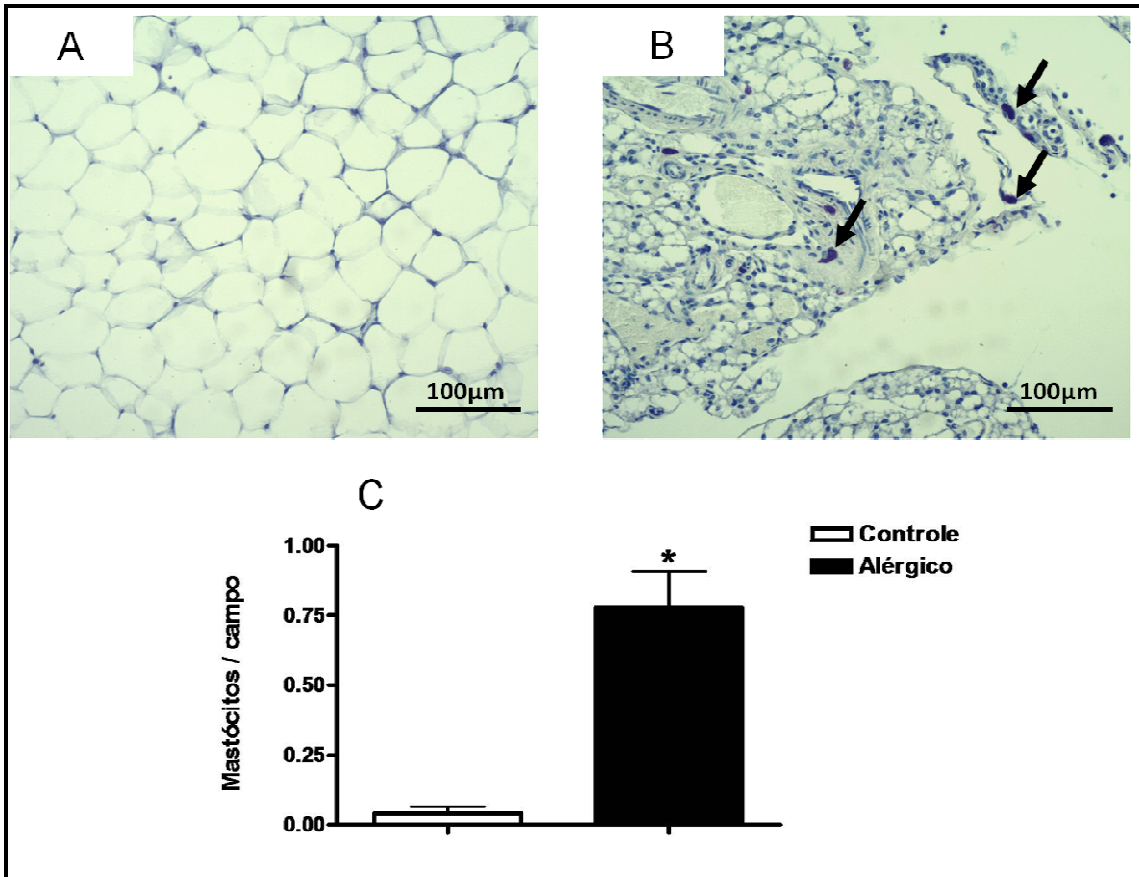


Figura 5. Avaliação dos mastócitos no tecido adiposo. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), o tecido adiposo epididimal foi coletado e corado por Azul de Toluidina. A) Imagem representativa do grupo controle. B) Imagem representativa do grupo alérgico. O número de mastócitos foi contado em 10 campos das lâminas histológicas (C). Foram utilizados 5 animais por grupo. As setas em B indicam mastócitos. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

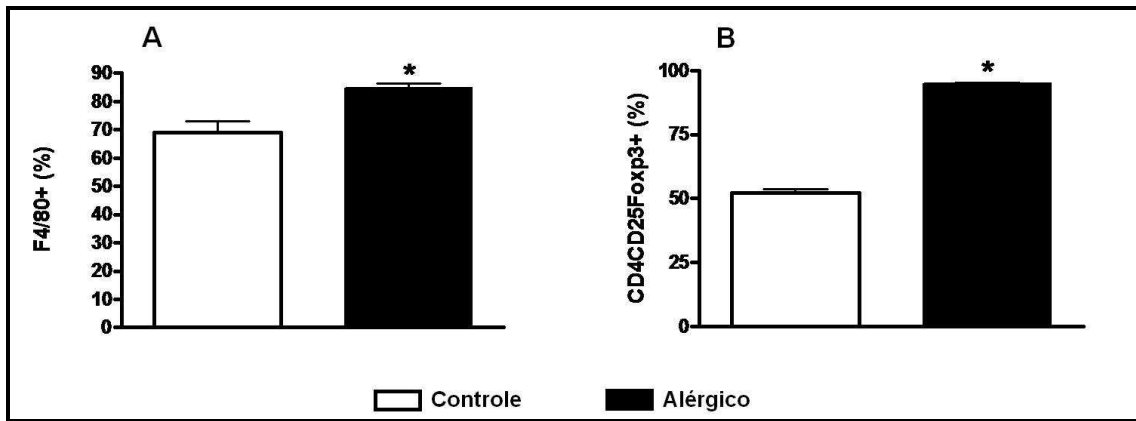


Figura 6. Análise fenotípica dos leucócitos do tecido adiposo. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), as células do estroma do tecido adiposo epididimal foram marcadas com anticorpos específicos para F4/80 (A) ou CD4, CD25 e Foxp3 (B) e analisadas por FACScan. Foram utilizados 10 animais por grupo. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

4.5 A alergia alimentar induz aumento do recrutamento de leucócitos no tecido adiposo

Para saber se o aumento do número de células inflamatórias no tecido adiposo é devido à hiperplasia de células residentes ou recrutamento do sangue, foi realizada a microscopia intravital no tecido adiposo epididimal de camundongos alérgicos e controle. Foi observado aumento de aproximadamente 6 vezes no número de leucócitos em rolamento (Figura 7A) e de 3 vezes no número de leucócitos aderidos (Figura 7B) ao endotélio da

microcirculação do tecido adiposo epididimal dos camundongos alérgicos quando comparados aos controles. As Figuras 7C e D ilustram, respectivamente, a imagem obtida pela técnica de microscopia intravital nos camundongos controle e alérgicos.

4.6 A inflamação do tecido adiposo nos animais alérgicos está associada a altas concentrações locais de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1/CCL2

O aumento sistêmico de citocinas pró-inflamatórias é observado em algumas patologias, sendo associado à perda de peso corpóreo tanto em seres humanos como animais experimentais (MORISSET *et al.*, 2008; MELGAR *et al.*, 2007). Portanto, para investigarmos uma possível contribuição do aumento sistêmico dessas citocinas no emagrecimento dos camundongos alérgicos, as concentrações de TNF- α e IL-6 foram medidas nos soro dos animais. A técnica de ELISA não detectou essas citocinas no soro dos camundongos tanto do grupo controle quanto do grupo alérgico.

Para avaliar se a inflamação no tecido adiposo epididimal dos camundongos alérgicos estaria associada ao aumento da produção local de citocinas e quimiocinas, este tecido foi submetido a análises pela técnica de ELISA. Foi demonstrado que o tecido adiposo dos animais alérgicos apresenta níveis aumentados das citocinas TNF- α (Figura 8A), IL-6 (Figura 8B) e IL-10 (Figura 8C) e da quimiocina MCP-1/CCL2 (Figura 8D) quando comparados aos controles.

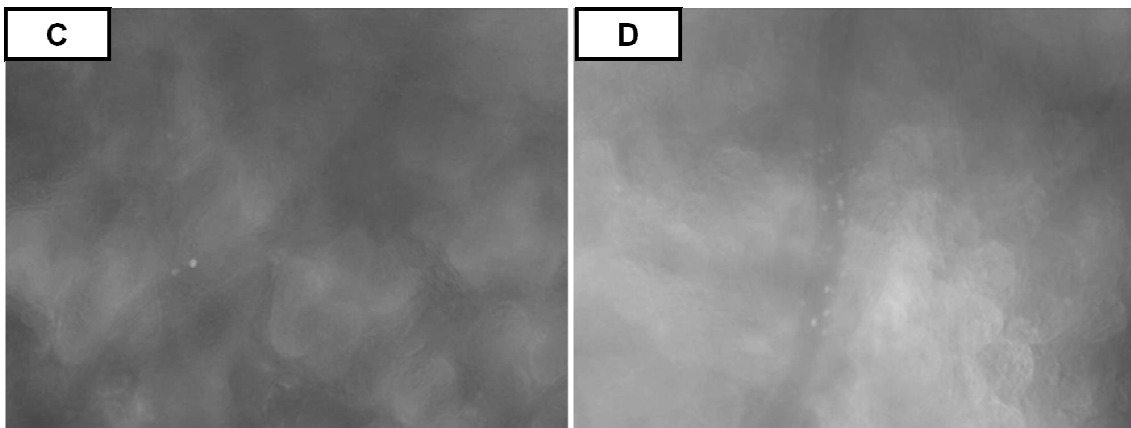
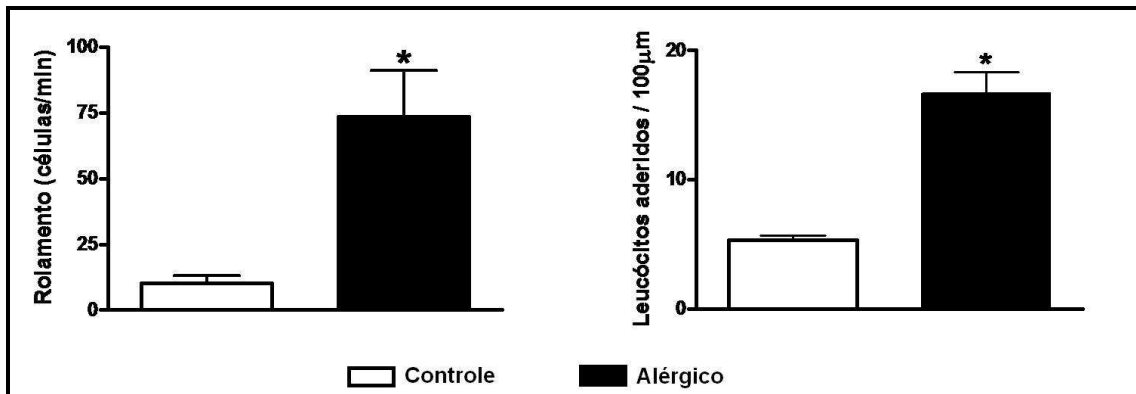


Figura 7. Microscopia intravital do tecido adiposo. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), o tecido adiposo epididimal foi analisado através da microscopia intravital. O rolamento (A) e a adesão (B) dos leucócitos ao endotélio foram analisados ao microscópio de fluorescência após a administração intravenosa de rodamina 6G. Foram utilizados 3 animais por grupo. C) Imagem representativa do grupo controle; D) Imagem representativa do grupo alérgico. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

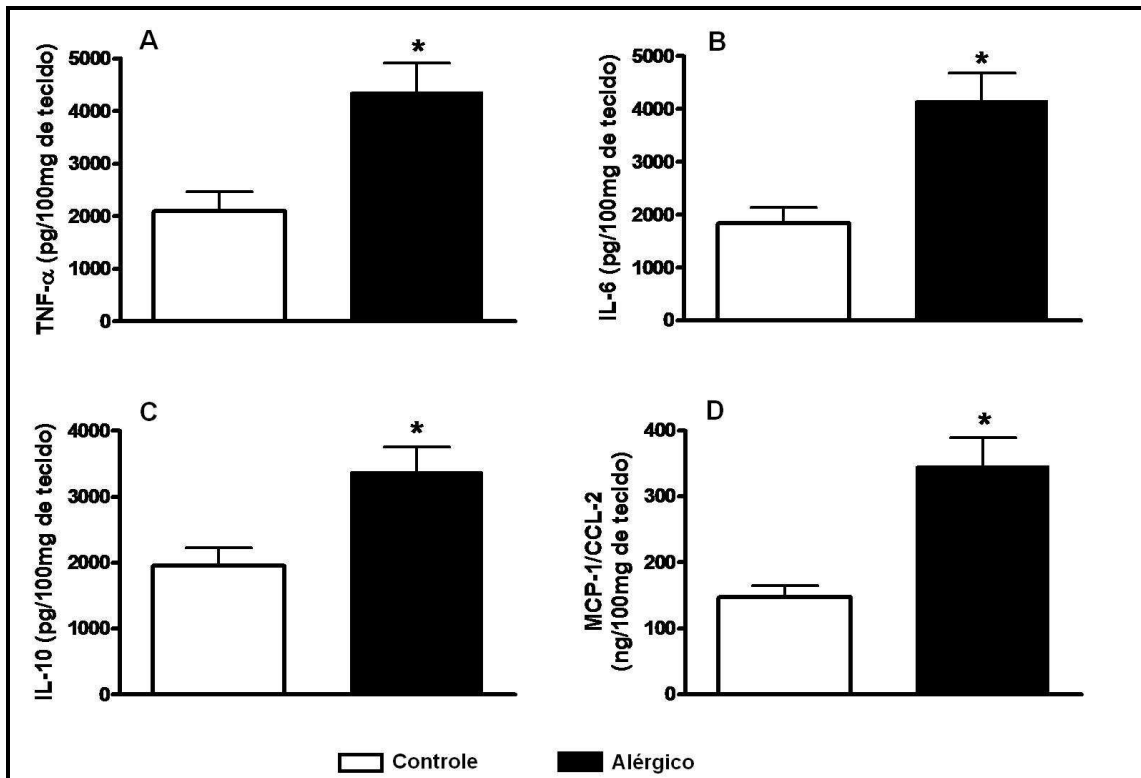


Figura 8. Avaliação da produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1/CCL2 no tecido adiposo. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10 μ g de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 μ g de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), o tecido adiposo epididimal foi coletado e processado para avaliação das concentrações de TNF- α (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e MCP-1/CCL2 (D) através da técnica de ELISA. Foram utilizados 10 animais por grupo. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

4.7 A inflamação induz alterações metabólicas no tecido adiposo dos camundongos alérgicos

Tem sido demonstrado que a inflamação no tecido adiposo, particularmente a presença de altas concentrações locais de TNF- α , induz alterações na lipólise e na captação de glicose nos adipócitos (GAMBERO *et al.*, 2007; LUMENG *et al.*, 2007). Portanto, com o objetivo de investigar se a inflamação induzida no tecido adiposo dos camundongos alérgicos poderia desencadear alterações nessas vias metabólicas, os adipócitos foram isolados e analisados quanto ao índice de lipólise e à captação de glicose. A partir desses ensaios, foi demonstrado que tanto o índice de lipólise basal (Figura 9A) quanto a captação de glicose basal e estimulada pela insulina (Figura 9B) apresentaram-se aumentados nos adipócitos de animais alérgicos em relação aos controles. Os resultados da captação de glicose se repetiram em dois experimentos independentes.

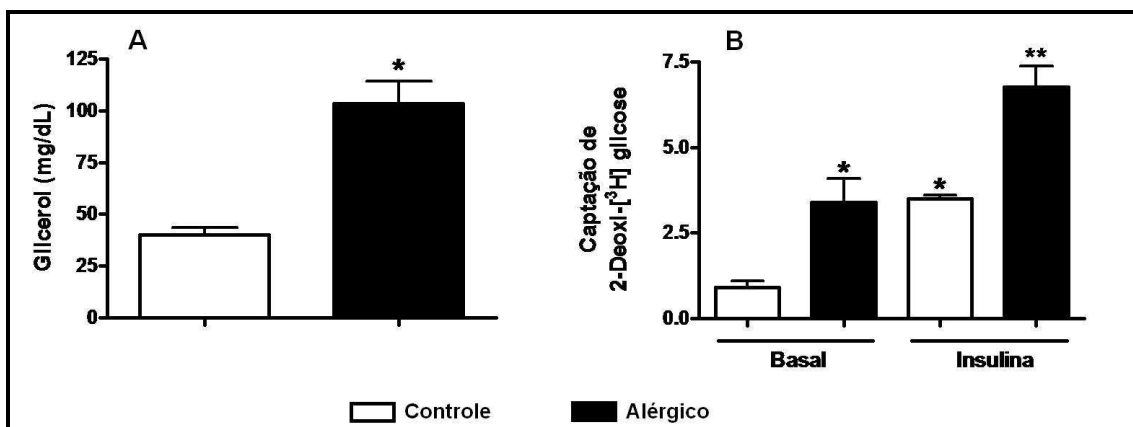


Figura 9. Avaliação das alterações metabólicas no tecido adiposo epididimal.

Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), o tecido adiposo epididimal foi coletado e os adipócitos foram isolados para medida do índice lipolítico (A) e da captação de glicose (B). A: n=3 (controle); n=4 (alérgico); B: n=4 (controle basal); n=7 (alérgico basal); n=5 (controle insulina); n=6 (alérgico insulina). *P<0.05 em relação ao grupo controle (One way ANOVA – Tukey).

4.8 Camundongos alérgicos apresentam hipoglicemia

Tendo sido observado que a alergia alimentar interfere na mobilização e armazenamento de reservas energéticas no tecido adiposo, decidimos avaliar se estas alterações apresentam consequências sistêmicas. Com esse objetivo, realizamos a medida das concentrações séricas de glicose e os testes de sensibilidade insulínica e tolerância à glicose nos animais. Observamos que os camundongos alérgicos apresentam hipoglicemia (Figura 10A) não tendo sido observadas, entretanto, alterações nos testes de sensibilidade insulínica (Figura 10B) e tolerância à glicose (Figura 10C).

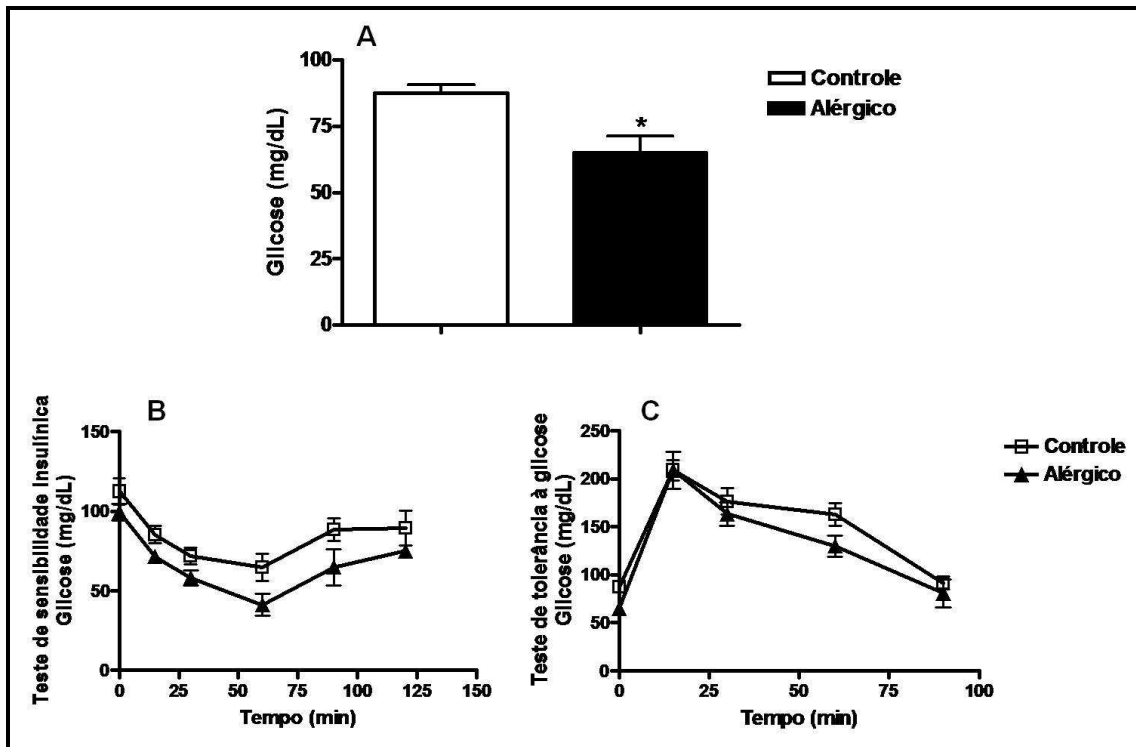


Figura 10. Avaliação da glicemia, sensibilidade insulínica e tolerância à glicose. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10µg de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µg de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), os camundongos foram deixados em jejum durante 12 horas e o soro foi coletado para medida de glicose (A). Os testes de sensibilidade insulínica (B) e de tolerância à glicose (C) foram realizados em animais em jejum (12 horas) e alimentados, respectivamente. Foram utilizados 5 animais por grupo. *P<0.05 em relação ao grupo controle. (A: Teste T de Student). (B e C: Two way ANOVA).

4.9 A alergia alimentar induz alterações sistêmicas nos camundongos

Para investigar alterações sistêmicas adicionais, realizamos a medida das concentrações séricas de triglicerídeos (Figura 11A), colesterol total (Figura 11B) e ácidos graxos livres (Figura 11C) e observamos que todos estes substratos estão significativamente diminuídos no soro dos camundongos alérgicos quando comparados aos controles. As concentrações encontradas para esses substratos nos controles estão de acordo com dados de referência para camundongo BALB/c (Mouse Phenome Database, 2010). Os resultados das dosagens séricas se repetiram em dois experimentos independentes utilizando-se os mesmos reagentes, porém, em análises manuais ou automatizadas.

4.10 Camundongos alérgicos apresentam conteúdo de lipídios totais hepáticos comparáveis aos controles

A partir da observação de hipolipidemia nos camundongos alérgicos e sabendo-se que o fígado é um dos sítios de armazenamento lipídico (LARGE *et al.*, 2004), decidimos avaliar o conteúdo lipídico hepático dos animais. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao conteúdo de lipídios hepáticos totais quando comparados os grupos controle e alérgico (Figura 12). Esse resultado se repetiu em dois experimentos independentes.

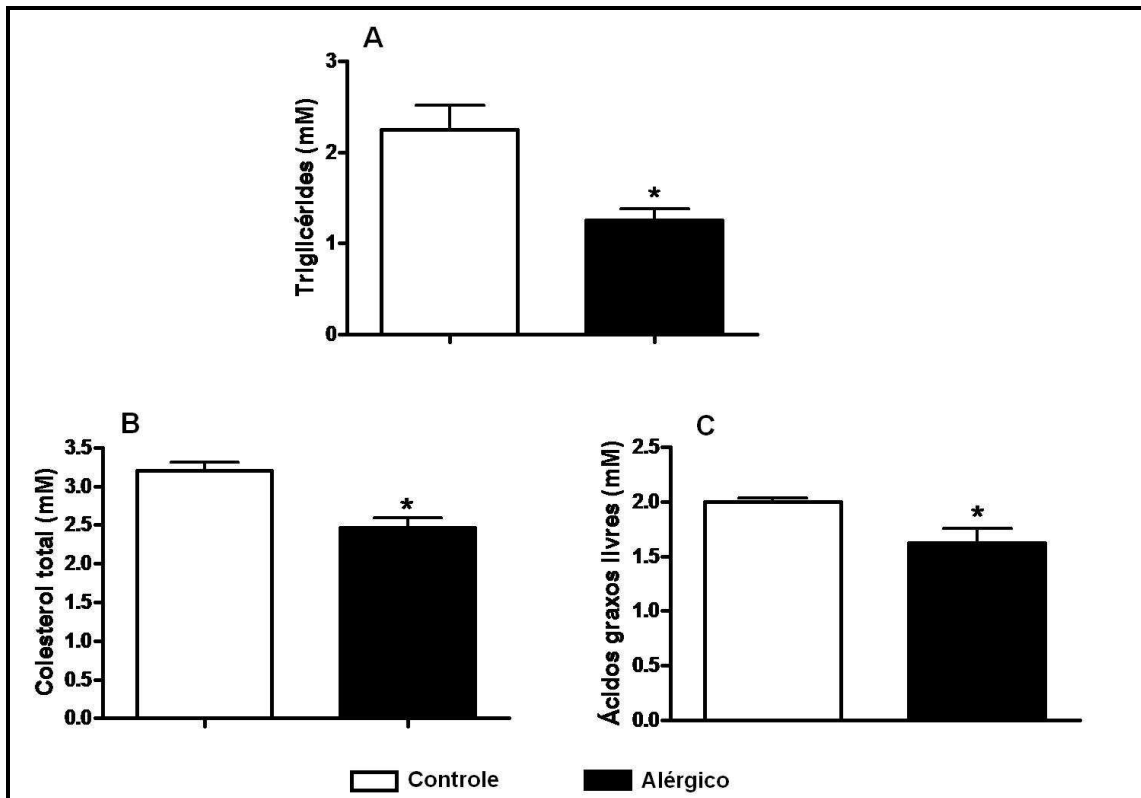


Figura 11. Dosagens séricas de triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos livres.

Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10 μ g de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 μ g de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), os camundongos foram deixados em jejum durante 12 horas e o soro foi coletado para medida de triglicerídeos (A), colesterol total (B) e ácidos graxos livres (C). Foram utilizados 10 animais por grupo. *P<0.05 em relação ao grupo controle (Teste T de Student).

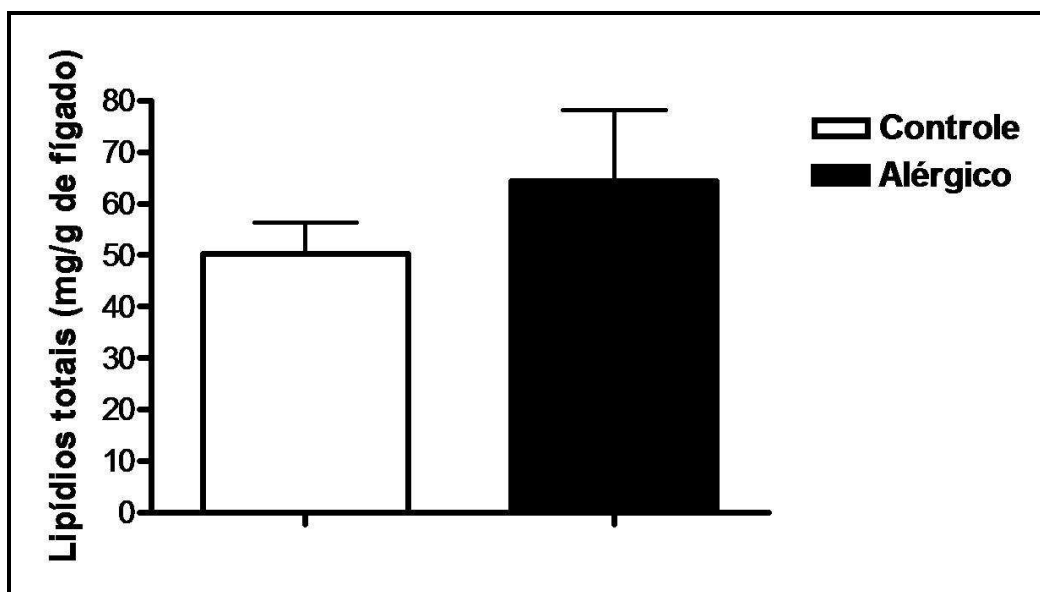


Figura 12. Quantificação do conteúdo de lipídios totais no fígado. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea com 10 μ g de ovalbumina (OVA) + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10 μ g de OVA no dia 14. O grupo controle recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina 0,9% no dia 14. Sete dias após a segunda sensibilização (dia 21), ambos os grupos receberam ração contendo OVA. Após 7 dias de ingestão da ração contendo o antígeno (dia 28), os camundongos foram deixados em jejum durante 12 horas e o fígado foi coletado para medida do conteúdo de lipídios totais pelo método de Folch. Foram utilizados 5 animais por grupo.

5. *Discussão*

5. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos submetidos à indução experimental de alergia alimentar apresentam uma significativa perda de peso corpóreo após a ingestão contínua e restrita do antígeno (SALDANHA *et al.*, 2004). O presente trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos envolvidos nesse emagrecimento. Com esse propósito, após a sensibilização com OVA, os camundongos receberam ração contendo o antígeno como única fonte alimentar durante 7 dias.

Nossos resultados demonstraram que a perda de peso nos camundongos alérgicos não está associada à anorexia, nem à desnutrição ou desidratação. Entretanto, fomos pioneiros em demonstrar que a alergia alimentar experimental induz inflamação do tecido adiposo com aumento tanto de células inflamatórias como de citocinas. Paralelamente à inflamação, observou-se um aumento da frequência de células reguladoras e da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 no tecido adiposo. Em conjunto, essas alterações locais desencadearam distúrbios metabólicos, particularmente o aumento da lipólise e da captação de glicose pelos adipócitos dos animais alérgicos. A mobilização aumentada de reservas resultou na hipotrofia dessas células, levando à diminuição da massa adiposa, o que contribuiu de maneira decisiva para o emagrecimento desses animais. Além disso, os camundongos alérgicos apresentaram alterações metabólicas sistêmicas representadas pela diminuição das concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos não esterificados.

O emagrecimento pode ser o resultado da diminuição da ingestão alimentar ou do aumento do gasto energético, podendo ocorrer participação de ambos os fatores como observado, por exemplo, na caquexia associada ao câncer em humanos e animais experimentais (LELBACH *et al.*, 2007; BING *et al.*, 2006). De maneira semelhante ao nosso modelo, a perda de peso corpóreo em camundongos com alergia alimentar foi demonstrada em outros estudos. Camundongos com alergia alimentar ao amendoim apresentam expressiva perda de peso associada à diminuição da ingestão alimentar após o desafio antigênico (CARDOSO *et al.*, 2009). Um estudo que utilizou camundongos com TCR transgênico para OVA, os quais apresentam altas concentrações séricas de IgE específica a este antígeno, demonstrou que os animais perdem uma quantidade significativa de peso corpóreo após a ingestão prolongada de uma dieta contendo clara de ovo. Entretanto, não foi observada diminuição do volume de dieta consumida por esses animais em comparação aos controles (NAKAJIMA-ADACHI *et al.*, 2006). No nosso trabalho, os camundongos alérgicos também apresentaram ingestão alimentar comparável aos controles e, mesmo assim, perderam aproximadamente 16% do peso corpóreo após 7 dias de desafio antigênico. Demonstramos, no entanto, que mecanismos diversos à anorexia e relacionados ao aumento do catabolismo estão envolvidos no emagrecimento desses animais.

Através da avaliação do peso do tecido adiposo epididimal e do músculo gastrocnêmio, demonstramos que o emagrecimento dos animais alérgicos ocorre principalmente devido à perda de tecido adiposo. A depleção de tecido adiposo também foi demonstrada em patologias como a colite e o câncer tanto em humanos como em modelos animais (MELGAR *et al.*, 2007; BING *et al.*,

2006; FOULADIUN *et al.*, 2005). Apesar de os mecanismos envolvidos na atrofia do tecido adiposo não serem completamente entendidos, as evidências experimentais sugerem que tanto a diminuição da deposição lipídica quanto o aumento da lipólise podem estar envolvidos neste processo (BING & TRAYHURN, 2009). Na colite experimental em ratos, por exemplo, foi demonstrado aumento da lipólise basal no tecido adiposo mesentérico com diminuição do diâmetro dos adipócitos (GAMBERO *et al.*, 2007). Alterações morfológicas no tecido adiposo também foram observadas em camundongos portadores de tumor experimental, os quais apresentam perda da massa de gordura epididimal caracterizada por diminuição da área dos adipócitos e fibrose no espaço intersticial (BING *et al.*, 2006). No nosso trabalho, também demonstramos que a perda de tecido adiposo epididimal nos camundongos é desencadeada por hipotrofia dos adipócitos devido a um aumento da lipólise basal neste tecido. Além disso, a análise histológica revelou a presença de um infiltrado celular entre os adipócitos dos camundongos alérgicos.

Entre as células infiltradas no tecido adiposo epididimal dos camundongos alérgicos, observamos um número elevado de mastócitos. Tradicionalmente conhecidos como participantes das respostas alérgicas, estudos recentes descreveram a presença dessas células no tecido adiposo de seres humanos e camundongos (LOPEZ *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009). No nosso estudo, os mastócitos podem desempenhar um papel fundamental na inflamação do tecido adiposo dos camundongos alérgicos, uma vez que estas células apresentam receptores FcεRI com alta afinidade para IgE (STONE *et al.*, 2010), anticorpo encontrado em grandes concentrações no soro destes animais (SALDANHA *et al.*, 2004). É muito provável que a IgE específica à

OVA se ligue aos seus receptores na superfície dos mastócitos presentes no tecido adiposo dos animais alérgicos, levando à desgranulação destas células após o contato com moléculas de antígeno circulantes. A desgranulação dos mastócitos, por sua vez, resulta na liberação de vários mediadores, dentre eles algumas citocinas como o TNF- α , a IL-6 e a IL-10 (STONE *et al.*, 2010) que se mostraram aumentadas no tecido adiposo dos animais alérgicos no nosso modelo.

Recentemente, foi sugerido que os mastócitos também atuam no recrutamento celular para o tecido adiposo, estando particularmente relacionados à migração de monócitos/macrófagos para este local. Esse papel no recrutamento celular foi sugerido por um estudo que utilizou tanto a depleção quanto a estabilização dos mastócitos em camundongos. Como resultado, esses animais apresentaram número reduzido de macrófagos no tecido adiposo, o que se mostrou relacionado à diminuição das concentrações locais de IL-6, TNF- α , IFN- γ e MCP-1/CCL-2 após a depleção ou impedimento da degranulação dos mastócitos (LIU *et al.*, 2009).

Em compatibilidade com a participação dos mastócitos no recrutamento de monócitos/macrófagos, observamos uma elevada frequência de células expressando o marcador de macrófagos F4/80 no tecido adiposo dos camundongos alérgicos em comparação aos controles. Entretanto, sabe-se que os macrófagos podem se originar localmente no tecido adiposo a partir de pré-adipócitos. Essa possibilidade foi demonstrada em um estudo no qual pré-adipócitos injetados na cavidade peritoneal de camundongos foram rapidamente convertidos a macrófagos com alta capacidade fagocítica e expressão de F4/80 (CHARRIERE *et al.*, 2003).

Com o objetivo de confirmar se o aumento de macrófagos no tecido adiposo dos camundongos alérgicos estaria relacionado à diferenciação de células pré-existentes ou ao recrutamento da circulação sanguínea, realizamos a microscopia intravital deste tecido. Através dessa técnica, demonstramos o aumento de leucócitos tanto em rolamento quando aderidos na microvasculatura do tecido adiposo epididimal dos camundongos alérgicos em relação ao observado nos controles. O aumento da migração celular para o tecido adiposo dos animais alérgicos associado à alta concentração local da quimiocina MCP-1/CCL-2 sugere a ocorrência de recrutamento de monócitos/macrófagos para este tecido. Essa inferência é sustentada por estudos nos quais a hiperexpressão de MCP-1/CCL-2 no tecido adiposo de camundongos resultou em aumento do infiltrado de macrófagos neste local, enquanto camundongos *knockouts* para esta quimiocina apresentaram diminuição de macrófagos neste tecido (KANDA *et al.*, 2006; KAMEI *et al.*, 2006).

Além disso, a ocorrência de recrutamento de monócitos/macrófagos para o tecido adiposo dos animais alérgicos está de acordo com dados da literatura que comprovam que a maior parte dos macrófagos neste tecido é derivada da medula óssea. A confirmação da origem dessas células ocorreu principalmente a partir de um estudo no qual o transplante de medula óssea de camundongos selvagens para animais deficientes em macrófagos foi capaz de induzir o infiltrado destas células no tecido adiposo. Após o recrutamento, a diferenciação e sobrevivência dos monócitos/macrófagos no tecido adiposo são dependentes, em grande parte, da secreção de CFS (fator estimulador de colônia) -1 pelos adipócitos (WEISBERG *et al.*, 2003).

No tecido adiposo, os macrófagos representam uma importante fonte de mediadores inflamatórios. A análise comparativa dessas células e de outras populações celulares do tecido adiposo de camundongos demonstrou que os macrófagos são responsáveis por quase toda a expressão de TNF- α e por significativa expressão de IL-6 neste tecido (WEISBERG *et al.*, 2003). Portanto, no nosso estudo, a elevada frequência de macrófagos associada à produção de altas concentrações locais das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 podem contribuir para a manutenção da inflamação no tecido adiposo dos camundongos alérgicos. Além disso, de forma semelhante ao que foi observado em estudos humanos e experimentais (PERMANA *et al.*, 2009; GAMBERO *et al.*, 2007), a inflamação local pode ser responsável pela indução do aumento da lipólise basal observada no tecido adiposo dos camundongos alérgicos.

Nesse sentido, é bem estabelecido que ocorre a interação entre as citocinas pró-inflamatórias secretadas com seus receptores nos adipócitos, o que culmina na indução da lipólise no tecido adiposo. Através de uma cocultura de adipócitos e macrófagos, foi demonstrada a existência de uma regulação parácrina envolvendo estas células. O TNF- α secretado no tecido adiposo, que como já citado, deriva principalmente dos macrófagos, se liga aos seus receptores nos adipócitos. Essa ligação induz a produção de adipocinas pró-inflamatórias como o MCP-1/CCL-2, a IL-6 e o próprio TNF- α , e a lipólise nestas células. Em contrapartida, os ácidos graxos liberados pelos adipócitos na lipólise se ligam aos receptores *toll like 4* (TLR4) nos macrófagos, induzindo respostas pró-inflamatórias adicionais nestas células, instalando-se, dessa forma, um ciclo que pode ser responsável pela manutenção do estado

inflamatório e catabólico no tecido adiposo (SUGANAMI *et al.*, 2005). O TNF- α também apresenta efeito lipolítico sistêmico demonstrado por um estudo no qual homens saudáveis receberam baixas doses de TNF- α recombinante por via intravenosa. Como resultado, as concentrações plasmáticas dessa citocina aumentaram de maneira significativa ao mesmo tempo em que se observou uma elevação de 40% na lipólise sistêmica (PLOMGAARD *et al.*, 2008).

A IL-6 é outra citocina com efeito lipolítico. Além da atuação endócrina, foi sugerido que a IL-6 desempenha uma regulação parácrina no tecido adiposo, sendo detectada em uma concentração aproximadamente 100 vezes maior neste tecido do que no plasma de seres humanos (SOPASAKIS *et al.*, 2004). Em experimentos *in vitro*, o tratamento de adipócitos com IL-6 resultou em aumento significativo da lipólise nestas células, sugerindo uma ação direta desta citocina nos adipócitos (PETERSEN *et al.*, 2005). Portanto, é provável que a elevada produção local de IL-6 e TNF- α no tecido adiposo dos camundongos alérgicos esteja contribuindo para a indução da lipólise nos adipócitos. A hipótese de ação parácrina ou autócrina das citocinas no tecido adiposo ainda é reforçada pelo fato de que as mesmas não foram detectadas no soro dos animais alérgicos ou controles.

Outra alteração demonstrada nos adipócitos dos animais alérgicos foi o aumento da captação basal de glicose quando comparados aos controles. Sabe-se que a captação basal desse substrato ocorre através do transportador GLUT-1 expresso constitutivamente na membrana de diversas células (DUCLUZEAU *et al.*, 2002). Investigações adicionais são necessárias para a elucidação dos mecanismos que levam ao aumento da captação basal de glicose pelos adipócitos dos animais alérgicos. Entretanto, é possível que a

citocina TNF- α participe deste processo, uma vez que a exposição *in vitro* de adipócitos a esta citocina induz elevação significativa da captação basal de glicose por estas células, reduzindo, entretanto, o aumento do transporte de glicose induzido pela insulina (LUMENG *et al.*, 2007; FUJISHIRO *et al.*, 2003). Essa ação do TNF- α na captação de glicose ocorre por estímulo direto da fosforilação da ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) nos adipócitos, levando à ativação desta enzima. A ativação da ERK nessas células, por sua vez, induziu expressão de GLUT-1 e inibiu a expressão de GLUT-4, que como já mencionado, tem ação dependente da sinalização pela insulina. Além disso, a ativação da ERK diminuiu a expressão do receptor de insulina (IR) e de seus principais substratos, contribuindo para a resistência insulínica do tecido adiposo (FUJISHIRO *et al.*, 2003).

Com base na descrição desses mecanismos *in vitro*, podemos sugerir a hipótese de que a alta concentração de TNF- α no tecido adiposo dos camundongos alérgicos seja responsável por induzir o aumento da captação basal de glicose pelos adipócitos através da indução de expressão do GLUT-1. Desse modo, a análise da expressão desse transportador no tecido adiposo dos camundongos será uma das próximas etapas do nosso estudo.

Apesar de tanto o TNF- α quanto a IL-6 serem capazes de induzir resistência insulínica nos adipócitos (FUJISHIRO *et al.*, 2003; ROTTER *et al.*, 2003), observamos que a incubação com este hormônio resultou num aumento de aproximadamente duas vezes na captação de glicose pelos adipócitos dos camundongos alérgicos. A alta concentração de IL-10 no tecido adiposo dos camundongos alérgicos pode ter contribuído para a manutenção da resposta dos adipócitos à insulina. Foi demonstrado que essa citocina é capaz de

bloquear os efeitos inibitórios do TNF- α na captação de glicose dependente da insulina. Essa ação da IL-10 foi demonstrada em um estudo *in vitro* no qual o tratamento com esta citocina preservou a expressão tanto do GLUT-4 quanto dos substratos do receptor de insulina em adipócitos, mesmo após incubação destas células com TNF- α (LUMENG *et al.*, 2007). Portanto, além da expressão do GLUT-1, também investigaremos a expressão do GLUT-4 no tecido adiposo dos camundongos em experimentos futuros.

Mesmo tendo sido observada a manutenção da sensibilidade insulínica no tecido adiposo dos camundongos alérgicos, a ocorrência de resistência insulínica sistêmica nestes animais não poderia ser descartada. Existem evidências de que os ácidos graxos liberados pela lipólise descontrolada podem se acumular no fígado, músculo e pâncreas levando à resistência insulínica sistêmica (GUTIERREZ *et al.*, 2009). Nestes locais, os ácidos graxos interferem na sinalização da insulina, através da inativação do substrato do receptor de insulina (IRS) – 1 (RAGHEB *et al.*, 2009). Entretanto, nos testes sistêmicos, tanto a sensibilidade insulínica como a tolerância à glicose dos camundongos alérgicos apresentaram-se inalteradas em comparação aos controles. É importante ressaltar que, mesmo com aumento da lipólise basal no tecido adiposo, observamos concentrações diminuídas de ácidos graxos não esterificados no soro dos animais alérgicos em relação aos controles. Podemos sugerir, portanto, que os baixos níveis de ácidos graxos circulantes não foram suficientes para induzir resistência insulínica sistêmica nos camundongos alérgicos.

Estudos recentes relacionam o aumento da frequência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no tecido adiposo com a melhora de alterações

metabólicas, dentre elas a resistência insulínica induzida pela obesidade. Esses estudos demonstraram que a indução dessas células no tecido adiposo de camundongos obesos resulta em diminuição da inflamação local através da produção de IL-10, contribuindo para reversão da resistência insulínica tanto neste tecido quanto nos tecidos periféricos (FEUERER *et al.*, 2009; ILAN *et al.*, 2010). No nosso estudo, demonstramos aumento da frequência de células T reguladoras no tecido adiposo dos camundongos alérgicos em relação aos controles. Podemos sugerir, portanto, que essas células estejam contribuindo para a elevada produção de IL-10 no tecido adiposo dos animais alérgicos que, por sua vez, pode antagonizar os efeitos deletérios da inflamação do tecido adiposo na sensibilidade insulínica local e sistêmica. Além disso, a ausência de citocinas pró-inflamatórias na circulação dos camundongos alérgicos pode ter contribuído para a manutenção da sensibilidade insulínica sistêmica.

No nosso trabalho, demonstramos que a inflamação alérgica também interferiu no metabolismo sistêmico dos camundongos, sendo observadas concentrações séricas reduzidas de glicose, triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos não esterificados nos camundongos alérgicos em relação aos controles. A redução sérica da glicose é condizente com o aumento da captação deste substrato pelos adipócitos dos animais alérgicos. Já a diminuição dos substratos lipídicos circulantes é uma observação inesperada, se levarmos em consideração o aumento da lipólise nos animais alérgicos que resulta na liberação sistêmica de ácidos graxos não esterificados. Os destinos possíveis para os substratos lipídicos seriam o fígado e o músculo. No fígado, os ácidos graxos são preferencialmente direcionados à síntese de triacilglicerol os quais, dependendo das necessidades energéticas do organismo, são

oxidados ou exportados como VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) (LARGE *et al.*, 2004). O armazenamento na forma de triacilglicerol no fígado dos camundongos alérgicos parece pouco provável, uma vez que não observamos aumento do conteúdo lipídico hepático nestes animais e nem aspectos de esteatose hepática pelo quadro histológico (dados não mostrados). Portanto, é provável que esteja ocorrendo aumento da β -oxidação dos ácidos graxos nos músculo esquelético dos camundongos alérgicos, contribuindo para a manutenção da massa muscular observada nestes animais. Análises adicionais, como a investigação da β -oxidação de lipídios no músculo, são necessárias para a elucidação dos mecanismos envolvidos na hipolipidemia dos camundongos alérgicos.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A perda de peso corpóreo nos camundongos alérgicos não está relacionada à anorexia, desnutrição ou desidratação.
- A alergia alimentar induz a inflamação do tecido adiposo dos camundongos com a produção local de mediadores que levam à hipotrofia deste tecido, resultando na diminuição do peso corpóreo.
- A indução experimental da alergia alimentar nos camundongos leva a alterações metabólicas tanto no tecido adiposo quanto sistêmicas.

7. Referências bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadian, M., R. E. Duncan, *et al.* Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. Future Lipidol, v.2, n.2, Apr, p.229-237. 2007.

Aldamiz-Echevarria, L., A. Bilbao, *et al.* Fatty acid deficiency profile in children with food allergy managed with elimination diets. Acta Paediatr, v.97, n.11, Nov, p.1572-6. 2008.

Almeida, A. F., Acg; Teixeira, Dns; Cota, Ua; Chica, Jel. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial, v.44, n.6, 20/12/08, p.4. 2008.

Antonescu, C. N., M. Foti, *et al.* Ready, set, internalize: mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis. Biosci Rep, v.29, n.1, Feb, p.1-11. 2009.

Arruda, A. P., M. Milanski, *et al.* Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. Endocrinology, v.151, n.2, Feb, p.683-94. 2010.

Aulino, P., E. Berardi, *et al.* Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. BMC Cancer, v.10, p.363. 2010.

Basso, A. S., F. A. Pinto, *et al.* Neural correlates of IgE-mediated food allergy. J Neuroimmunol, v.140, n.1-2, Jul, p.69-77. 2003.

Bing, C., S. Russell, *et al.* Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. Br J Cancer, v.95, n.8, Oct 23, p.1028-37. 2006.

Bing, C. e P. Trayhurn. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.11, n.3, May, p.201-7. 2008.

Bischoff, S. e S. E. Crowe. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. Gastroenterology, v.128, n.4, Apr, p.1089-113. 2005.

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

Boguszewski, C. L., G. Paz-Filho, *et al.* Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. Endokrynol Pol, v.61, n.2, Mar-Apr, p.194-206. 2010.

Botion, L. M. e A. Green. Long-term regulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase by insulin and glucose. Diabetes, v.48, n.9, Sep, p.1691-7. 1999.

Botion, L. M., I. C. Kettelhut, *et al.* Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. Horm Metab Res, v.27, n.7, Jul, p.310-3. 1995.

Buchanan, J. B. e R. W. Johnson. Regulation of food intake by inflammatory cytokines in the brain. Neuroendocrinology, v.86, n.3, p.183-90. 2007.

Cara, D. C., A. A. Conde, *et al.* Immunological induction of flavor aversion in mice. Braz J Med Biol Res, v.27, n.6, Jun, p.1331-41. 1994.

_____. Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. Scand J Immunol, v.45, n.1, Jan, p.16-20. 1997.

Cardoso, C. R., P. R. Provinciatto, *et al.* IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.296, n.3, Mar, p.G593-600. 2009.

Carre, J. E. e M. Singer. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. Biochim Biophys Acta, v.1777, n.7-8, Jul-Aug, p.763-71. 2008.

Charriere, G., B. Cousin, *et al.* Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. J Biol Chem, v.278, n.11, Mar 14, p.9850-5. 2003.

Claus, T. H., D. B. Lowe, *et al.* Specific inhibition of hormone-sensitive lipase improves lipid profile while reducing plasma glucose. J Pharmacol Exp Ther, v.315, n.3, Dec, p.1396-402. 2005.

Coppack, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. Proc Nutr Soc, v.60, n.3, Aug, p.349-56. 2001.

Dienel, G. A. e L. Hertz. Glucose and lactate metabolism during brain activation. J Neurosci Res, v.66, n.5, Dec 1, p.824-38. 2001.

Dorn, C., F. Bataille, *et al.* Xanthohumol feeding does not impair organ function and homeostasis in mice. Food Chem Toxicol, v.48, n.7, Jul, p.1890-7.

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

Ducluzeau, P. H., L. M. Fletcher, *et al.* Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. Diabetes Metab, v.28, n.2, Apr, p.85-92. 2002.

Eigenmann, P. A. Mechanisms of food allergy. Pediatr Allergy Immunol, v.20, n.1, Feb, p.5-11. 2009.

Fain, J. N., A. K. Madan, *et al.* Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. Endocrinology, v.145, n.5, May, p.2273-82. 2004.

Fernandez-Riejos, P., S. Najib, *et al.* Role of leptin in the activation of immune cells. Mediators Inflamm, v.2010, p.568343. 2010.

Feuerer, M., L. Herrero, *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat Med, v.15, n.8, Aug, p.930-9. 2009.

Finkelman, F. D., M. E. Rothenberg, *et al.* Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. J Allergy Clin Immunol, v.115, n.3, Mar, p.449-57; quiz 458. 2005.

Fouladiun, M., U. Korner, *et al.* Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. Cancer, v.103, n.10, May 15, p.2189-98. 2005.

Fredrikson, G., H. Tornqvist, *et al.* Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. Biochim Biophys Acta, v.876, n.2, Apr 15, p.288-93. 1986.

Fujishiro, M., Y. Gotoh, *et al.* Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol, v.17, n.3, Mar, p.487-97. 2003.

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

Gasic, S. e A. Green. Gi down-regulation and heterologous desensitization in adipocytes after treatment with the alpha 2-agonist UK 14304. Biochem Pharmacol, v.49, n.6, Mar 15, p.785-90. 1995.

Gutierrez, D. A., M. J. Puglisi, *et al.* Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. Curr Diab Rep, v.9, n.1, Feb, p.26-32. 2009.

Hoch, M., A. N. Eberle, *et al.* LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor-alpha in human adipocytes. Cytokine, v.41, n.1, Jan, p.29-37. 2008.

Hollenberg, C. H. The origin and glyceride distribution of fatty acids in rat adipose tissue. J Clin Invest, v.45, n.2, Feb, p.205-16. 1966.

Hsieh, P. S., K. C. Lu, *et al.* Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. Eur J Clin Invest, v.40, n.2, Feb, p.164-71. 2010.

Ilan, Y., R. Maron, *et al.* Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.107, n.21, May 25, p.9765-70. 2010.

Inada, T., N. Hamano, *et al.* Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in delayed gastric emptying and gastrointestinal transit induced by lipopolysaccharide in mice. Braz J Med Biol Res, v.39, n.11, Nov, p.1425-34. 2006.

Jacobs, S. R., C. E. Herman, *et al.* Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. J Immunol, v.180, n.7, Apr 1, p.4476-86. 2008.

Jenkins, C. M., D. J. Mancuso, *et al.* Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. J Biol Chem, v.279, n.47, Nov 19, p.48968-75. 2004.

Kamei, N., K. Tobe, *et al.* Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. J Biol Chem, v.281, n.36, Sep 8, p.26602-14. 2006.

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

Katz, J. e P. A. Wals. Lipogenesis from lactate in rat adipose tissue. Biochim Biophys Acta, v.348, n.3, Jun 26, p.344-56. 1974.

Kazi, A. A., A. M. Pruznak, *et al.* Sepsis-Induced Alterations in Protein-Protein Interactions within Mtor Complex 1 and the Modulating Effect of Leucine on Muscle Protein Synthesis. Shock, Jun 22. 2010.

Kerr, M. Exames laboratoriais em medicina veterinária. São Paulo: Roca. 2003. 436 p.

Keshavarzian, A., A. Farhadi, *et al.* Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. J Hepatol, v.50, n.3, Mar, p.538-47. 2009.

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

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

Large, V. e P. Arner. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. Diabetes Metab, v.24, n.5, Nov, p.409-18. 1998.

Large, V., O. Peroni, *et al.* Metabolism of lipids in human white adipocyte. Diabetes Metab, v.30, n.4, Sep, p.294-309. 2004.

Laurencikiene, J., V. Van Harmelen, *et al.* NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. J Lipid Res, v.48, n.5, May, p.1069-77. 2007.

Lelbach, A., G. Muzes, *et al.* Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia. Med Sci Monit, v.13, n.9, Sep, p.RA168-173. 2007.

Liu, J., A. Divoux, *et al.* Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. Nat Med, v.15, n.8, Aug, p.940-5. 2009.

Lopez, X., M. Castells, *et al.* Human insulin analog--induced lipoatrophy. Diabetes Care, v.31, n.3, Mar, p.442-4. 2008.

Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, *et al.* Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest, v.117, n.1, Jan, p.175-84. 2007.

Macia, L., O. Viltart, *et al.* Interleukin-7, a new cytokine targeting the mouse hypothalamic arcuate nucleus: role in body weight and food intake regulation. PLoS One, v.5, n.4, p.e9953.

Melgar, S., M. Bjursell, *et al.* Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.292, n.1, Jan, p.G165-72. 2007.

Minai-Fleminger, Y. e F. Levi-Schaffer. Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. Inflamm Res, v.58, n.10, Oct, p.631-8. 2009.

Morimoto, C., K. Kameda, *et al.* Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. J Lipid Res, v.42, n.1, Jan, p.120-7. 2001.

Morisset, A. S., C. Huot, *et al.* Circulating IL-6 concentrations and abdominal adipocyte isoproterenol-stimulated lipolysis in women. Obesity (Silver Spring), v.16, n.7, Jul, p.1487-92. 2008.

Mouse Phenome Database. Disponível em: www.phenome.jax.org. Acesso em: 27 set.2010.

Nakajima-Adachi, H., A. Ebihara, *et al.* Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. J Allergy Clin Immunol, v.117, n.5, May, p.1125-32. 2006.

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

Noimark, L. e H. E. Cox. Nutritional problems related to food allergy in childhood. Pediatr Allergy Immunol, v.19, n.2, Mar, p.188-95. 2008.

Pereira, V. R., V. M. De Lorena, *et al.* [Hematological and histopathological evaluation of BALB/c and C57BL/6 mice exposed to Cytoplasmic Repetitive Antigen and Flagellar Repetitive Antigen recombinant antigens of Trypanosoma cruzi]. Rev Soc Bras Med Trop, v.36, n.6, Nov-Dec, p.739-42. 2003.

Permana, P. A., W. Zhang, *et al.* Pioglitazone reduces inflammatory responses of human adipocytes to factors secreted by monocytes/macrophages. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.296, n.5, May, p.E1076-84. 2009.

Petersen, E. W., A. L. Carey, *et al.* Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, n.1, Jan, p.E155-62. 2005.

_____. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.288, n.1, Jan, p.E155-62. 2005.

Plomgaard, P., C. P. Fischer, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha modulates human in vivo lipolysis. J Clin Endocrinol Metab, v.93, n.2, Feb, p.543-9. 2008.

Price, S. R., T. Olivecrona, *et al.* Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by cachectin. Further proof for identity with tumour necrosis factor. Biochem J, v.240, n.2, Dec 1, p.601-4. 1986.

Radauer, C. e H. Breiteneder. Evolutionary biology of plant food allergens. J Allergy Clin Immunol, v.120, n.3, Sep, p.518-25. 2007.

Ragheb, R., G. M. Shanab, *et al.* Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. Biochem Biophys Res Commun, v.389, n.2, Nov 13, p.211-6. 2009.

Reeves, P. G., K. L. Rossow, *et al.* Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1923-31. 1993.

Rotter, V., I. Nagaev, *et al.* Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. J Biol Chem, v.278, n.46, Nov 14, p.45777-84. 2003.

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

Semenkovich, C. F., M. Wims, *et al.* Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. J Biol Chem, v.264, n.15, May 25, p.9030-8. 1989.

Sicherer, S. H. e H. A. Sampson. Food allergy. J Allergy Clin Immunol, v.125, n.2 Suppl 2, Feb, p.S116-25. 2010.

Silva, L. E., M. Castro, *et al.* Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. Braz J Med Biol Res, v.43, n.8, Aug, p.759-66. 2010.

Sopasakis, V. R., M. Sandqvist, *et al.* High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. Obes Res, v.12, n.3, Mar, p.454-60. 2004.

Stofkova, A., M. Haluzik, *et al.* Enhanced expressions of mRNA for neuropeptide Y and interleukin 1 beta in hypothalamic arcuate nuclei during adjuvant arthritis-induced anorexia in Lewis rats. Neuroimmunomodulation, v.16, n.6, p.377-84. 2009.

Stone, K. D., C. Prussin, *et al.* IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol, v.125, n.2 Suppl 2, Feb, p.S73-80. 2010.

Straub, R. H., M. Cutolo, *et al.* Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. J Intern Med, v.267, n.6, Jun, p.543-60. 2010.

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

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

Tateya, S., Y. Tamori, *et al.* An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. Endocrinology, v.151, n.3, Mar, p.971-9. 2010.

Thijs, C., A. Muller, *et al.* Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. Allergy, Jul 23. 2010.

Tisdale, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. Physiol Rev, v.89, n.2, Apr, p.381-410. 2009.

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

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

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

Vicario, M., M. Guilarte, *et al.* Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. Brain Behav Immun, Jun 25. 2010.

Villena, J. A., S. Roy, *et al.* Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. J Biol Chem, v.279, n.45, Nov 5, p.47066-75. 2004.

Wakil, S. J. e L. A. Abu-Elheiga. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. J Lipid Res, v.50 Suppl, Apr, p.S138-43. 2009.

Wang, B. e P. Trayhurn. Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. Pflugers Arch, v.452, n.4, Jul, p.418-27. 2006.

Wang, H. e R. H. Eckel. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.297, n.2, Aug, p.E271-88. 2009.

Wang, J. e H. A. Sampson. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. Allergy Asthma Immunol Res, v.1, n.1, Oct, p.19-29. 2009.

Wang, J. H., F. Wang, *et al.* Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. Neuroscience, v.156, n.1, Sep 22, p.89-98. 2008.

Watt, M. J. Triglyceride lipases alter fuel metabolism and mitochondrial gene expression. Appl Physiol Nutr Metab, v.34, n.3, Jun, p.340-7. 2009.

Weisberg, S. P., D. Mccann, *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, v.112, n.12, Dec, p.1796-808. 2003.

Wofford, J. A., H. L. Wieman, *et al.* IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. Blood, v.111, n.4, Feb 15, p.2101-11. 2008.

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

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

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

Zimmermann, R., J. G. Strauss, *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science, v.306, n.5700, Nov 19, p.1383-6. 2004.

8. Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No projeto inicial desse trabalho, o objetivo era avaliarmos os aspectos associados à regulação do peso corpóreo tanto em animais BALB/c selvagens quanto deficientes para a citocina IL-4. Essa idéia preliminar surgiu durante o desenvolvimento da dissertação de mestrado, na qual demonstramos que, na ausência de IL-4, os camundongos BALB/c não emagreciam após a indução do nosso modelo de alergia alimentar. Portanto, achamos que seria interessante investigar se essa citocina estaria relacionada à indução do emagrecimento. Entretanto, em experimentos iniciais do doutorado, utilizando transferência passiva de soro, observamos que animais deficientes em IL-4 que receberam soro de animais selvagens alérgicos passaram a ter sinais característicos da alergia alimentar. Dessa forma, demonstramos que a importância dessa citocina no nosso modelo se restringe à indução da produção de IgE. Com base nessa constatação, julgamos desnecessárias investigações relacionadas a um possível papel da IL-4 na regulação do peso corpóreo. Esses resultados foram publicados no artigo científico anexo a essa tese (Anexo 1).

O manuscrito apresentado como Anexo II foi redigido com base em resultados apresentados nesta tese e será encaminhado para publicação.

9. Anexos

9.1 Anexo I



Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice

Luana Pereira Antunes Dourado^a, Janaína Cláudia da Silva Saldanha^a, Daniela Longo Gargiulo^a,
 Maria de Lourdes Meirelles Noviello^b, Cláudia Caldeira Brant^a, Maria Letícia Costa Reis^b,
 Raphaela Mendes Fernandes de Souza^b, Ana Maria Caetano Faria^c, Danielle da Glória de Souza^d,
 Denise Carmona Cara^{a,*}

^a Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^d Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2009

Accepted 23 December 2009

Available online 4 January 2010

Keywords:

IL-4

Aversion

Food allergy

Mice

Ovalbumin

Eosinophil

Mucus secretion

IgE

IgG1

Serum transfer

ABSTRACT

To ascertain the role of IL-4 in aversion to antigen induced by food allergy, wild type and IL-4 deficient BALB/c mice were sensitized with ovalbumin and challenged orally with egg white. Sensitized wild type mice had increased production of IL-4 by spleen and mesenteric lymph node cells in vitro, higher levels of serum anti-ovalbumin IgE and IgG1, aversion to ingestion of the antigen and loss of body weight after continuous oral challenge. Intestinal changes in wild type sensitized mice included eosinophil infiltration and increased mucus production. The IL-4 deficiency impaired the development of food allergy and the aversion to antigen, suggesting the involvement of the antigen specific antibodies. When IL-4 deficient mice received serum from sensitized wild type donors, the aversion was restored. These results indicate that production of IL-4 and specific IgE/IgG1 antibodies correlate with aversion to antigen induced by food allergy in mice.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Physiological penetration of dietary macromolecules into the organism through the gut mucosa has several recognized immunological consequences. Intestinal IgA and mucus secretion create selective filters to the penetration of such macromolecules and may play a decisive role in the operation of the immune system [1].

Food allergy is defined as an adverse immunological response (hypersensitivity) to food proteins [1]. Food allergy with acute onset of symptoms after ingestion is usually mediated by IgE. IgE-mediated response to an allergen results from a series of molecular and cellular interactions. Antigen presenting cells (APCs) present small peptide fragments in conjunction with MHC class II molecules to CD4⁺ T cells. This interaction leads to T cell proliferation and cytokine secretion, which promotes a Th2 type response. In turn, Th2 cells and their products (IL-4 and IL-13) interact with antigen-specific B cells, leading to isotype switching and the gener-

ation of antigen-specific IgE, which then binds to surface receptors on mast cells, resulting in a state termed sensitization. Upon re-exposure, food sensitizing proteins bind to IgE specific molecules and trigger the release of mediators such as histamine from mast cells, which cause allergy symptoms [2].

Epidemiological studies suggest a significant increase in allergic disease prevalence during the past two or three decades [3]. Food allergy is particularly frequent among children and may affect their final height and weight [4].

Mouse models of food allergy allow in vivo studies of the immunological components involved in the different features of the disease. We have developed an experimental food allergy model in which ovalbumin (Ova)-sensitized mice are given egg white solution (EWS) as the only liquid source. Ingestion of this solution by the sensitized mice leads to increased anti-Ova IgE and IgG1 production, intestinal edema and eosinophil infiltration in the jejunum. This model reproduces the clinical and pathological changes associated with chronic food allergy and is useful for mechanistic studies of this common clinical condition [5].

Previous studies from our group have demonstrated that given the option of drinking water or a sweetened egg white solution,

* Corresponding author. Address: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, Bairro: Pampulha, Cep 31.270-901, Belo Horizonte, 6627 Minas Gerais, Brazil. Fax: +55 31 3409 2810.
 E-mail address: deniseccm@cb.ufmg.br (D.C. Cara).

ovalbumin (Ova)-sensitized mice displayed an aversion to ingestion of egg white, in contrast to control animals. Moreover, the aversive behavior can be acquired by control non-sensitized mice after transfer of spleen cells from sensitized animals. These results led us to conclude that immunological components can influence diet selection [6,7]. Aversion was later shown to be directly related to IgE production [8].

Many cytokines are involved in the development of allergy. Increased IL-4 production has already been demonstrated in atopic diseases. In a murine model of food allergy induced to shrimp tropomyosin, IL-4 and IL-13 production were induced in the spleen and in the jejunum of sensitized mice [9]. Allergen-specific T cells can be isolated from blood, skin, and mucosal sites in patients with food allergy and, characteristically, they express a Th2 cell phenotype releasing IL-4, IL-5, and IL-13. As mentioned above, IL-4 induces IgE production by B cells. This cytokine is also involved in other allergy-associated events such as development of Th2 cells and eosinophil infiltration of the gut mucosa [2].

The aim of this present study was to evaluate whether the production of IL-4 and its correlation with the secretion of specific antibodies can contribute to aversion to antigen ingestion and to the development of chronic ovalbumin-induced food allergy in mice.

2. Methods

2.1. Mice

Female (6 weeks old) wild type and IL-4 deficient (IL-4^{-/-}) BALB/c mice were used. Wild type mice were obtained from our animal facility at ICB/UFMG. Deficient mice were bred at the Laboratory of Gnotobiology and Immunology, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. All mice received standard (Purina) mouse chow throughout the experiment. The investigations were consistent with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of our Institution (CETEA/UFMG).

2.2. Mice sensitization

On day 0, the mice received a subcutaneous (sc) injection of 0.2 ml saline containing 10 µg Ova (five times crystallized hen's egg albumin; Sigma, St. Louis, MO, USA) plus 1 mg Al(OH)₃ as adjuvant. A second sc injection of 10 µg soluble Ova was given 14 days later (day 14). Seven days after the secondary sensitization (day 21), the bottle containing tap water was replaced with 20% EWS (egg white solution) for a period of 1 or 2 weeks (from day 21 to day 28 or 35). This solution contained about 10 mg Ova/ml. The non-sensitized group received only the adjuvant diluted in saline on day 0 and saline on day 14. Donors of serum were wild type BALB/c mice sensitized with a subcutaneous injection of 0.2 ml saline containing 20 µg Ova (five times crystallized hen's egg albumin; Sigma, St. Louis, MO, USA) plus 4.5 mg Al(OH)₃ as adjuvant on day 0. A second sc injection of 20 µg Ova was given on day 14.

2.3. Serum antibody evaluation

Serum samples for measuring anti-Ova IgG1 and IgE were obtained from groups culled after 14 days of oral antigen exposure. ELISA for IgG1 was carried out using plates coated with Ova and 100 µl of 1:8000 diluted mouse sera, with goat anti-mouse IgG1 (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) and rabbit anti-goat labeled with peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA). The plates were developed with *o*-phenylenediamine and H₂O₂ and were read at 492 nm on an automated ELISA reader (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

Anti-Ova IgE was measured by capture-ELISA using plates coated with rat anti-mouse IgE, 50 µl total serum and biotinylated Ova, as previously described [10]. The results for both antibodies are reported in arbitrary units using a positive reference serum (1000 U).

2.4. Culture assay and cytokine measurement

After 7 days of oral challenge, the wild type BALB/c mice were sacrificed by cervical dislocation. Mesenteric lymph nodes and spleen cells were harvested in a RPMI 1640 (SIGMA, USA) medium containing 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 2 mM L-glutamine, 50 mM 2-mercaptoethanol, 10,000 U of penicillin, 10 mg streptomycin (Gibco, USA) per ml. Red blood cells were removed by lysis in a 0.144 M NH₄Cl buffer. The cells (1 × 10⁶ cells/well) were then incubated in 24-well plates for 72 h either with 5 mg/ml of ovalbumin (OVA) (five times crystallized hen's egg albumin; Sigma, St. Louis, MO, USA) or 0.5 µg/ml of concanavalin A (con-A) (Sigma, St. Louis, MO, USA) in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. After 72 h, the supernatant was removed and stored at -20 °C until further analysis. The concentrations of IL-4 was measured by ELISA in supernatants using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.5. Body weight evaluation

Body weight was determined each week throughout the experiment. The final body weight of each group was obtained from the means of the individual values and expressed in grams (g).

2.6. Histological analysis

After 14 days of oral challenge, the mice were sacrificed by cervical dislocation. The proximal jejunum was taken for histological analysis. It was fixed in 10% formalin in PBS, embedded in paraffin and cut into 5 µm thick sections. The sections were stained with periodic acid Schiff (PAS) for mucus analysis or with hematoxylin-eosin to evaluate eosinophil infiltration. Ten fields from hematoxylin-eosin stained sections were randomly chosen at 40× (53.333 µm²/field) in order to count the number of eosinophils and the data are reported as number of eosinophils/field. For mucus analysis, three sections of the jejunum stained with periodic acid Schiff was submitted to morphometric analysis using an image analysis program running on an IBM computer. Images were obtained at 40× (53.333 µm²/field) with a JVC TK-1270/RGB microcamera and analyzed with the KS300 software built in a Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer. For the determination of goblet cell volume, all pixels with green hues were selected for the creation of a binary image and subsequent calculation of the total area, and data were reported as µm² PAS/field.

2.7. Aversion test

Mice were housed in individual cages for 3 days after day 21. During this period, they received two small drinking bottles. One bottle contained sweetened (0.5% saccharin) egg white solution (20%) and the other contained tap water. The positions of the bottles were alternated daily to control side-preferences. The amount of liquid ingested from each bottle was determined by weighing them daily during the aversion test. The mean consumption over the 3 days was expressed as mg of solution ingested per gram body weight (mg g⁻¹).

2.8. Serum transfer

Serum from the donors were collected 7 days after the secondary sensitization. The serum transfer to wild type and IL-4^{-/-}

BALB/c mice was performed by intravenous (iv) injection of 0.4 ml of non-sensitized or hyperimmune serum. The aversion test was carried out 3 h after the serum transfer.

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA – Tukey) or by the Student *t*-test when appropriate. The level of significance was set at $P < 0.05$. The data shown in the figures are reported as means \pm SEM for 5 animals/group.

3. Results

3.1. Specific serum antibody and IL-4 production in a murine model of food allergy

Ovalbumin-stimulated spleen and mesenteric lymph node cells showed increased production of IL-4 in sensitized wild type BALB/c animals after 7 days of continuous EWS challenge (Fig. 1A).

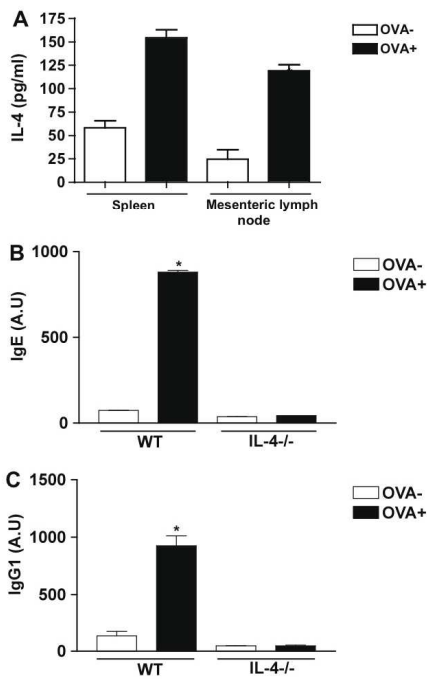


Fig. 1. Sensitization and continuous ingestion of EWS increased the production of IL-4 by spleen and mesenteric lymph node cells in vitro and induced the increase in serum concentrations of anti-Ova IgE and IgG1 in wild type BALB/c sensitized mice. Wild type and IL-4^{-/-} BALB/c mice were sensitized (OVA⁺) with 10 μ g Ova plus Al(OH)₃ on day 0 and with 10 μ g Ova on day 14. The non-sensitized group received only the adjuvant diluted in saline on day 0 and saline on day 14. Seven days after the secondary sensitization, all mice received EWS (20%) as the only liquid source. After 7 days, the mice were sacrificed. The spleen and mesenteric lymph nodes were removed for measurement of IL-4 and the serum was collected for measurement of anti-OVA IgE and IgG1 by ELISA. Data are reported as means \pm SEM for 5 animals/group. * $P < 0.05$ compared to non-sensitized group (OVA⁻). (ANOVA – Tukey).

The sensitization procedure alone induced the production of both anti-Ova IgG1 and IgE in wild type but not in the IL-4 deficient BALB/c mice (data not shown). Continuous ingestion of EWS boosted the production of these specific antibodies up to the end of the experiment in sensitized wild type but not in IL-4 deficient BALB/c mice (Fig. 1B and C).

3.2. Weight loss following allergen ingestion was dependent on IL-4 production

After oral challenge with EWS, sensitized but not non-sensitized wild type BALB/c mice lost about 15% of their body weight (Fig. 2A). However, IL-4-deficient mice showed no weight loss, even when sensitized and exposed to the antigen solution by oral route (Fig. 2B).

3.3. Eosinophil infiltration and mucus production in the gut mucosa of allergic mice were dependent on IL-4 production

Prolonged EWS ingestion induced a threefold increase in eosinophil infiltration in the proximal jejunum of sensitized wild type BALB/c mice compared to non-sensitized animals. However, only few eosinophils were detected in the gut of IL-4-deficient mice, even after sensitization and oral challenge with ovalbumin (Fig. 3).

Continuous exposure to the antigen induced a significant increase in mucus production by goblet cells in the proximal jejunum of sensitized wild type BALB/c mice when compared to non-sensitized animals. On the other hand, antigen ingestion induced no increase in mucus secretion in the jejunum of IL-4-deficient mice, even when these animals were subjected to the sensitization protocol (Fig. 4).

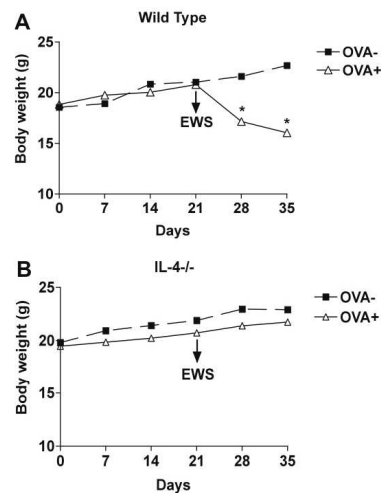


Fig. 2. Weight loss following allergen ingestion was dependent on IL-4 production. Wild type and IL-4^{-/-} BALB/c mice were sensitized (OVA⁺) with 10 μ g Ova plus Al(OH)₃ on day 0 and with 10 μ g Ova on day 14. The non-sensitized group received only the adjuvant diluted in saline on day 0 and saline on day 14. Seven days after the secondary sensitization, all mice received egg white solution (20%) as the only liquid source. The mice were weighed weekly throughout the experiment. Data are reported as means \pm SEM for 5 mice in each group. * $P < 0.05$ compared to non-sensitized group (OVA⁻). (Student *t*-test).

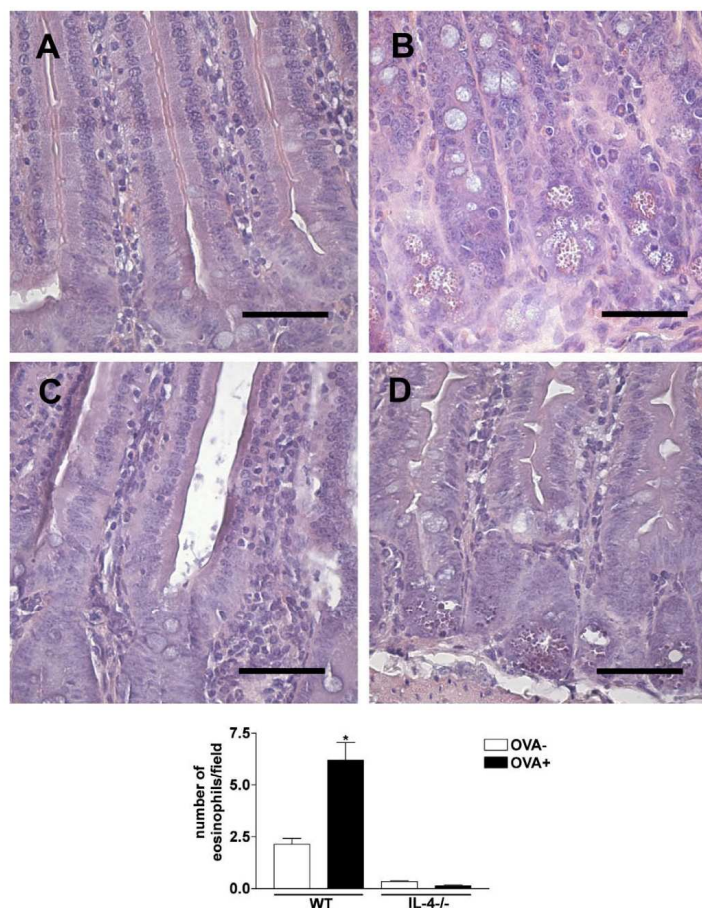


Fig. 3. Eosinophil infiltration in the gut mucosa of allergic mice was dependent on IL-4 production. Wild type and IL-4^{-/-} BALB/c mice were sensitized (OVA+) with 10 μ g Ova plus Al(OH)₃ on day 0 and with 10 μ g Ova on day 14. The non-sensitized group received only the adjuvant diluted in saline on day 0 and saline on day 14. Seven days after the secondary sensitization, all mice received EWS (20%) as the only liquid source. After 14 days, the mice were sacrificed and the proximal jejunum was collected. The number of eosinophils was evaluated in 10 fields of the jejunum. (A) non-sensitized wild type BALB/c mice; (B) sensitized wild type BALB/c mice; (C) Non-sensitized IL-4^{-/-} mice; (D) sensitized IL-4^{-/-} mice. Bar = 50 μ m. Data are reported as means \pm SEM of number of eosinophils for 5 animals in each group. **P* < 0.05 compared to non-sensitized group (OVA-). (ANOVA – Tukey).

3.4. Aversion to antigen ingestion was dependent on IL-4 production

When a choice of water or sweetened egg white solution (EWS) was offered, only ovalbumin-sensitized wild type BALB/c mice displayed aversion to the ingestion of the antigen solution. The volume of sweetened EWS ingested by these animals was four times lower than the volume ingested by non-sensitized group. In contrast, sensitized IL-4 deficient animals did not avoid ingesting the antigen solution (Fig. 5). Ingestion of water did not differ significantly among groups when non-sensitized and sensitized animals were compared (data not shown).

3.5. Aversion to antigen ingestion was dependent on specific antibody production

To investigate whether the effect of IL-4 in aversion was a direct effect or whether it depended of specific antibody production associated with IL-4, IL-4-deficient mice were transferred with serum from sensitized BALB/c mice. The serum transferred showed IgE levels similar to sensitized mice that were submitted to aversion test, even though the donors were not challenged orally with the antigen. When 0.4 ml of serum from sensitized donors was transferred to wild type or IL-4^{-/-} BALB/c mice, a significant aversion

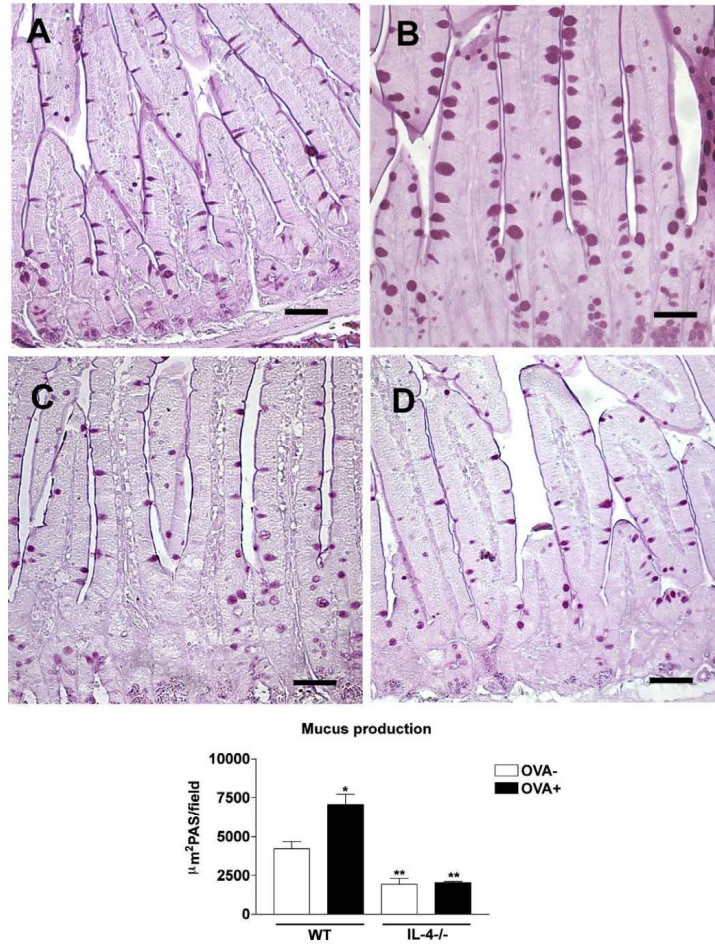


Fig. 4. Mucus production in the gut mucosa of allergic mice was dependent on IL-4 production. Wild type and IL-4^{-/-} BALB/c mice were sensitized (OVA+) with 10 μg Ova plus Al(OH)₃ on day 0 and with 10 μg Ova on day 14. The non-sensitized group received only the adjuvant diluted in saline on day 0 and saline on day 14. Seven days after the secondary sensitization, all mice received EWS (20%) as the only liquid source. After 14 days, the mice were sacrificed and the proximal jejunum was collected. The tissue was stained with P.A.S and the mucus production by goblet cells was evaluated in three fields of the jejunum. (A) non-sensitized wild type BALB/c mice; (B) sensitized wild type BALB/c mice; (C) non-sensitized IL-4^{-/-} mice; (D) sensitized IL-4^{-/-} mice. Bar = 50 μm. Data are reported as means ± SEM of mucus production for 5 mice in each group **P* < 0.05 compared to non-sensitized group (OVA-). ***P* < 0.05 compared to wild type (WT) groups. (ANOVA – Tukey).

to the ingestion of sweetened EWS was observed in both groups (Fig. 6). In contrast, the transfer of serum from non-sensitized donors did not induce the aversive behavior in any of the groups (data not shown).

4. Discussion

The gut has the greatest body surface area exposed to the outside environment, including food antigens. Normally, dietary pro-

teins induce oral tolerance, which is the suppression of immune responses to antigens that have been administered previously by the oral route. Abrogation of oral tolerance or failure to induce oral tolerance may result in the development of food allergy, characterized by the occurrence of IgE-producing B cells in response to activated T-helper type 2 (Th2) effector lymphocytes and cytokines like IL-4 [2]. We demonstrated that the cytokine IL-4 and its correlation with specific IgE and IgG1 antibodies are important for the development of almost all the characteristics of animal models of

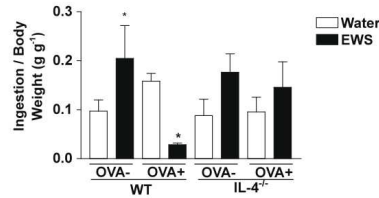


Fig. 5. Aversion to antigen ingestion was dependent on IL-4 production. Wild type and IL-4^{-/-} BALB/c mice were sensitized (OVA+) with 10 μ g Ova plus Al(OH)₃ on day 0 and with 10 μ g Ova on day 14. The non-sensitized group received only the adjuvant diluted in saline on day 0 and saline on day 14. After 7 days, the mice were housed in individual cages for 3 days with the option of drinking sweetened EWS or water. Data are represented as means \pm SEM and expressed as mg of sweetened EWS ingestion per gram of body weight (mg g^{-1}). * $P < 0.05$ compared to water ingestion (ANOVA – Tukey).

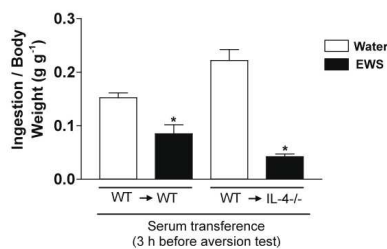


Fig. 6. Aversion to antigen ingestion was dependent on specific antibody production. The donors mice were sensitized (OVA+) with 20 μ g plus Al(OH)₃ on day 0 and with 20 μ g Ova on day 14. After 7 days, the serum of the donors was transferred to wild type or IL-4^{-/-} BALB/c mice. The recipient mice were housed in individual cages for 3 days with the option of drinking sweetened EWS or water. Data are represented as means \pm SEM and expressed as mg of sweetened EWS ingestion per gram of body weight (mg g^{-1}). * $P < 0.05$ compared to water ingestion (ANOVA – Tukey).

food allergy such as aversion to antigen ingestion, weight loss, hypersecretion of mucus and eosinophilic tissue infiltrate.

In this study, IL-4 production was increased after the stimulation with ovalbumin in spleen and mesenteric lymph nodes cultures of sensitized animals after 7 days of oral challenge. This high expression of IL-4 corroborates the hypothesis that the production of Th2 cytokines is increased in animal models of food allergy [11–13].

When ovalbumin-sensitized wild type BALB/c mice are given EWS as the only liquid option, they develop several local signs of food allergy such as mucus hypersecretion, eosinophil infiltration, edema and an increased number of mast cells in the intestinal mucosa. In addition, increased serum anti-ovalbumin IgG1 and IgE and dramatic weight loss are observed [5]. Previous studies by our research group have demonstrated that this weight loss is not associated with decreased liquid or food consumption (unpublished data). Rather, this alteration may be associated with immunological factors related to Th2 cytokines and antibodies, since IL-4^{-/-} BALB/c animals did not lose body weight when subjected to the protocol for inducing food allergy. As IL-4^{-/-} mice produced very low IgE and IgG1 levels, it is plausible that increased antibody secretion is necessary for the weight loss triggered by the allergic process.

Despite the enhancement of weight loss and antibody secretion, the intestinal alterations due to chronic antigen ingestion were lar-

gely regulated in our food allergy model. The mucosal immune system uses a number of mechanisms to avoid an injurious immune response to food antigens, including the presence of regulatory T cells in the lymphoid tissue of the gut and a physical filter represented by the mucus that limits antigen absorption [1]. Even in the presence of the immunosuppressive mechanisms in the intestinal mucosa, we were able to sensitize the animals, except the IL-4 deficient ones, by parenteral antigen administration, and the oral challenge induced mucus hypersecretion and increased eosinophil infiltration in the intestinal mucosa of the wild type sensitized group. Mucus hypersecretion is a common characteristic of allergic inflammation and has been shown to be IL-4 and IL-13 dependent [14]. The importance of IL-4 was confirmed in our study, since mucus production was impaired in IL-4^{-/-} animals and even the parenteral antigen administration and challenge were not able to induce the increase in mucus secretion.

In chronic allergic diseases, eosinophils are primed by IL-5 and attracted by chemokines, infiltrating the tissue, during continuous antigen exposure. These cells are responsible for the late phase of the allergic reaction, producing a basic protein that is toxic to the epithelium [15]. In addition to reduction in mucus secretion, IL-4^{-/-} BALB/c mice showed a diminished eosinophil infiltration in the jejunum than wild type animals, and the sensitization procedure and prolonged EWS ingestion did not change this profile. Previous studies have shown that, in a murine model of allergic asthma, IL-4 deficient mice displayed substantially fewer eosinophils in the lung tissue and bronchoalveolar lavage (BAL). These observations indicate that IL-4 is a central mediator in allergic airway inflammation, interfering with antigen-induced eosinophil recruitment [16–18].

When ovalbumin-sensitized wild type BALB/c mice were offered both water and EWS as liquid options, they displayed aversion to allergen ingestion [6]. We suggest that the flavor-aversive behavior observed in sensitized animals is an additional mechanism to protect against antigen entry by the oral route, contributing to the integrity of the intestinal mucosa. However, in this present study we have shown that when IL-4 is absent, these mice did not avoid ingesting the sweetened EWS even when subjected to the sensitization protocol with Ova. It is important to note that wild type BALB/c mice produced high levels of anti-Ova IgE and IgG1 after sensitization and that these levels were even higher after antigen ingestion; but IL-4 deficient mice did not show an accentuated humoral response, since this cytokine is crucial for IgE and IgG1 synthesis [19,20]. It has already been demonstrated that IgE production is essential for the development of food aversion: anti-IgE antibody treatment before oral challenge prevented the aversion to ingesting EWS in Ova-sensitized mice [8]. Our data confirm these previous observations and describe an upstream step in the net of factors triggering aversion to allergen ingestion in allergic animals: production of the cytokine IL-4.

Evidence suggests that food allergy influences behavioral changes and alters brain function. It has been demonstrated, for instance, that the aversion to antigen ingestion by sensitized animals is associated with elevated anxiety levels and to increased neuronal activation in emotionality-related brain areas. The development of food allergy and the resulting brain activation seem to be induced by mast cell degranulation, since these events are not observed in animals treated with anti-IgE antibodies [8,21]. A surprising number of mast cells in human and rat intestines are in contact with peptidergic nerves [22]. Hence, it is likely that IgE-induced mast cell degranulation is the major mechanism of food allergy signaling to the brain [8].

In this present study, we have shown that the same animals that demonstrated aversion to antigen ingestion when given a choice of liquid sources developed impressive food allergy signs when restricted to continuous ingestion of antigen solution. Hence,

we may infer that the same mechanism that triggers the aversive behavior in sensitized animals also leads to the development of food allergy when no choice of liquid source is available. We suggest that the development of the aversive behavior and the induction of the food allergy depends on the secretion of specific antibodies, since the IL-4^{-/-} mice did not demonstrate these alterations and showed very low levels of anti-Ova IgE and IgG1 in the serum.

To address if the cytokine IL-4 influences the aversion to antigen only by inducing the specific antibodies production, we transferred serum from sensitized animals to non-sensitized wild type and IL-4 deficient BALB/c mice. We were able to demonstrate that IL-4 is important to the development of food aversion only because it induces the production of specific antibodies, since when the IL-4 deficient animals were reconstituted with serum from sensitized donors, they demonstrated the aversive behavior even in the absence of this cytokine.

Taken together, these results support the hypothesis that production of the cytokine IL-4 and consequently specific IgE/IgG1 antibodies directly correlate with development of aversion to antigen ingestion in the ovalbumin-induced model of food allergy.

Acknowledgments

We are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil) for financial support. Some of the authors are also recipients of CNPq research fellowships (D.C.C. and L.P.A.D.).

References

- [1] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment, *Annu. Rev. Med.* 60 (2009) 261–277.
- [2] S. Bischoff, S.E. Crowe, Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives, *Gastroenterology* 128 (2005) 1089–1113.
- [3] M. Yazdanbakhsh, P.G. Kremsner, R. van Ree, Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis, *Science* 296 (2002) 490–494.
- [4] L. Christie, R.J. Hine, J.C. Parker, W. Burks, Food allergies in children affect nutrient intake and growth, *J. Am. Diet. Assoc.* 102 (2002) 1648–1651.
- [5] J.C. Saldanha, D.L. Gargiulo, S.S. Silva, F.H. Carmo-Pinto, M.C. Andrade, J.J. Alvarez-Leite, M.M. Teixeira, D.C. Cara, A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 809–816.
- [6] D.C. Cara, A.A. Conde, N.M. Vaz, Immunological induction of flavor aversion in mice, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27 (1994) 1331–1341.
- [7] D.C. Cara, A.A. Conde, N.M. Vaz, Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition, *Scand. J. Immunol.* 45 (1997) 16–20.
- [8] A.S. Basso, F.A. Pinto, M. Russo, L.R. Britto, L.C. de Sa-Rocha, J. Palermo Neto, Neural correlates of IgE-mediated food allergy, *J. Neuroimmunol.* 140 (2003) 69–77.
- [9] F. Capobianco, C. Butteroni, B. Barletta, S. Corinti, C. Afferni, R. Tinghino, M. Boirivant, G. Di Felice, Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE, T cell response and systemic anaphylactic reactions, *Int. Immunol.* 20 (2008) 1077–1086.
- [10] M. Russo, M.A. Nahori, J. Lefort, E. Gomes, A. de Castro Keller, D. Rodriguez, O.G. Ribeiro, S. Adriouch, V. Gallois, A.M. de Faria, B.B. Vargaftig, Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24 (2001) 518–526.
- [11] P.S. Leung, Y.S. Lee, C.Y. Tang, W.Y. Kung, Y.H. Chuang, B.L. Chiang, M.C. Fung, K.H. Chu, Induction of shrimp tropomyosin-specific hypersensitivity in mice, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 147 (2008) 305–314.
- [12] C.R. Cardoso, G. Teixeira, P.R. Provinciatto, D.F. Godoi, B.R. Ferreira, C.M. Milanezi, D.B. Ferraz, M.A. Rossi, F.Q. Cunha, J.S. Silva, Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation, *Clin. Exp. Allergy* 38 (2008) 338–349.
- [13] H. Nakajima-Adachi, A. Ebihara, A. Kikuchi, T. Ishida, K. Sasaki, K. Hirano, H. Watanabe, K. Asai, Y. Takahashi, Y. Kanamori, N. Shimojo, H. Matsuda, Y. Kohno, S. Hachimura, S. Kaminogawa, Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice, *J. Allergy Clin. Immunol.* 117 (2006) 1125–1132.
- [14] C. Blanchard, S. Durual, M. Estienne, K. Bouzakri, M.H. Heim, N. Blin, J.C. Cuber, IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis, *J. Immunol.* 172 (2004) 3775–3783.
- [15] S.P. Hogan, H.F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P.S. Foster, P. Lacy, A.B. Kay, M.E. Rothenberg, Eosinophils: biological properties and role in health and disease, *Clin. Exp. Allergy* 38 (2008) 709–750.
- [16] G.G. Brusselle, J.C. Kips, J.H. Tavernier, J.G. van der Heyden, C.A. Cuvelier, R.A. Pauwels, H. Bluethmann, Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice, *Clin. Exp. Allergy* 24 (1994) 73–80.
- [17] N.W. Lukacs, R.M. Strieter, S.W. Chensue, S.L. Kunkel, Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10 (1994) 526–532.
- [18] R. Fischer, D. Tome, J.R. McGhee, P.N. Boyaka, Th1 and Th2 cells are required for both eosinophil- and neutrophil-associated airway inflammatory responses in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 (2007) 44–49.
- [19] L.B. Bacharier, R.S. Geha, Molecular mechanisms of IgE regulation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (2000) S547–S558.
- [20] E.L. Faquim-Mauro, R.L. Coffman, I.A. Abrahamson, M.S. Macedo, Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12, *J. Immunol.* 163 (1999) 3572–3576.
- [21] A.S. Basso, F.A. Costa-Pinto, L.R. Britto, L.C. de Sa-Rocha, J. Palermo-Neto, Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents, *Brain Res.* 1009 (2004) 181–188.
- [22] R.H. Stead, M. Tomioka, G. Quinonez, G.T. Simon, S.Y. Felten, J. Bienenstock, Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 2975–2979.

.2 Anexo II

Manuscript

Adipose tissue inflammation contributes to weight loss induced by experimental food allergy in mice

Luana Pereira Antunes Dourado^a, Maria de Lourdes Meirelles Noviello^a, Débora Moreira Alvarenga^a, Gustavo Batista Menezes^a, Adaliene Versiani Matos Ferreira^b, Danielle da Glória de Souza^c, Denise Carmona Cara^{a*}.

^aDepartamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^bEscola de Enfermagem, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^cDepartamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding author: Denise Carmona Cara

Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas

Avenida Antônio Carlos, 6627, Bairro: Pampulha

Cep: 31.270-901. Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

Phone: 55- 31- 3499-2890

Fax: 55- 31- 3499- 2879

e-mail: deniseccm@icb.ufmg.br

Abstract

Objective: We investigated whether the body weight loss observed in a model of food allergy in mice was associated with inflammatory and metabolic alterations.

Research Methods and Procedures: BALB/c mice have been sensitized subcutaneously with ovalbumin. After 21 days they received antigen-containing diet for 7 days. Body weight and food consumption were measured throughout this period. Mice were sacrificed on the 28th day. We weighted evaluated lipolysis and TNF- α , IL-6 and CCL2 levels in the epididymal adipose tissue. Moreover, we investigated leukocyte interactions with the microvasculature of the adipose tissue using intravital microscopy. We have also weighted the muscle gastrocnemius and measure serum levels of triglyceride, glucose, total cholesterol and free fatty acids (FFA).

Results: We found that allergic mice lost approximately 16% of their body weight after 7 days of continuous oral challenge with a significant decrease in epididymal adipose tissue mass. This decrease was associated with increased lipolysis and local inflammation represented by elevated levels of TNF- α , IL-6 and CCL2, increased leukocyte rolling and adhesion in the microvasculature and high frequency of F4/80+ cells. Furthermore, we observed lower serum concentrations of triglyceride, glucose, total cholesterol and FFA in the allergic mice when compared to controls. The food intake and the weight of gastrocnemius muscle did not differ between groups.

Conclusion: Our results suggest that the induction of experimental food allergy in mice leads to adipose tissue inflammation and systemic metabolic alterations that may contribute to the body weight loss observed after antigen ingestion.

Key words: food allergy; mice; weight loss; ovalbumin; adipose tissue; lipolysis.

Introduction

Food allergy is defined as an adverse immunological response (hypersensitivity) to food proteins. The normal immune response to dietary proteins is associated with the induction of oral tolerance, which depends on an intact and immunologically active gastrointestinal barrier. The disruption of this barrier may lead to food allergy because alters the normal state of oral tolerance to food [1]. Food antigen induced allergic immune responses are generally characterized by the production of T-helper type 2 (Th2) -type cytokines, an increase in IgE antibody levels and infiltration of eosinophils and/or mast cells into the intestinal tract. Immunoglobulin E (IgE)-mediated food allergy (type I food allergy) accounts for the majority of food allergic reactions and the onset of symptoms can occur immediately after the allergen ingestion [2].

There is substantial data that the prevalence of sensitization to common allergens has increased markedly over the last half century, and there is also some evidence that sensitization to food has increased [3; 4]. It is of considerable interest that food allergy is particularly frequent among children [5]. The treatment strategy for most food allergic diseases is based on allergen avoidance. This approach may present potential adverse nutritional deficiencies related to inadequate growth, neurological development and cardiovascular health [6; 7]. The understanding of the mechanisms involved in allergic inflammation may provide useful insights into disease pathophysiology and aid in the development of novel therapeutic strategies.

Mouse models of food allergy allow relevant *in vivo* studies of the mucosal immune system to be conducted. Our group has developed an experimental model of food allergy in which ovalbumin (Ova)-sensitized BALB/c mice are given the antigen orally. This model mimics several pathological changes that occur in patients with food allergy (e.g. increased anti-Ova IgE and IgG1 production, intestinal edema and eosinophil infiltration in the jejunum). One of the most striking systemic alterations observed in the Ova-sensitized mice is an accentuated weight loss after the chronic antigen ingestion [8]. Although similar significant weight reduction has been observed in other murine models of food allergy, the mechanisms underlying the weight loss are not yet elucidated [9; 10].

Body mass is controlled by the balance of energy intake and energy expenditure. Energy use requires the coordination of key lipid and carbohydrate metabolic pathways. Fatty acids (FAs) are stored in adipose tissue as triacylglycerols (TAGs) constituting an important fuel reserve [11]. Lipid deposition in adipose tissue is dependent on the availability and uptake of exogenous nonesterified fatty acids released from plasma lipoproteins by lipoprotein lipase (LPL) and the rate of *de novo* synthesis (lipogenesis) of FA within the tissue, using glucose as the main substrate [12]. The amount of FA released to the blood stream from stored TAG is mainly dependent on the rate of lipolysis, mediated by hormone-sensitive lipase [13; 11].

Body weight reduction may be observed in various chronic disease (e.g. cancer, arthritis and inflammatory bowel disease) [14-16]. The excessive body weight loss seen in this condition may be related to increased energy demand required for proper inflammatory response, inducing redistribution of

substrates to generate energy for cells involved in inflammation. This process especially involves the mobilization of lipids stored in the adipose tissue [17; 18].

We hypothesized that the inflammatory process induced by experimental food allergy in mice could interfere with the metabolism. Hence, the aim of this study was to evaluate the mechanisms involved in weight loss observed in allergic mice after the chronic antigen ingestion.

Materials and Methods

Animals

Six weeks old male BALB/c mice were obtained from our animal facility (ICB/UFMG). All mice have received standard (Purina, Belo Horizonte, MG, Brazil) mouse chow until the antigen challenge. The investigations were in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of our Institution (CETEA/UFMG).

Mice sensitization

All injections were performed subcutaneously. The control group received 0.2 ml saline (0.9%) with adjuvant [1 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$] on day 0 and saline on day 14. The allergic group received 0.2 ml saline (0.9%) with adjuvant and 10 μg Ova (five times crystallized hen's egg albumin; Sigma, St. Louis, MO, USA) on day 0 and saline with 10 μg soluble Ova on day 14. Seven days after the secondary sensitization (day 21), the standard chow was replaced with 14% Ova containing diet for a period of one week (day 21 until 28). This diet was prepared using a lyophilized egg white (Salto's, Belo Horizonte, MG, Brazil) and nutrient contents were the same specified for AIN-93G [19].

Measurements of body weight, food intake, and tissue collection

Body weight was determined once a week throughout the four weeks. Food consumption was assessed every day.

After seven days of continuous antigen challenge, mice were anesthetized with 10mg/kg xylazine and 200 mg/kg ketamine hydrochloride – intraperitoneal (i.p) and serum samples were obtained from all groups. Later, mice were euthanized by i.p. injection of the same anesthetic solution, and the epididymal fat and the muscle gastrocnemius were collected and weighted. The weight of these tissues was correlated to the body weight of the animals. Epididymal fat fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C and or fixed in 10% neutral formalin for posterior analysis.

Histological evaluation of epididymal adipose tissue

Epididymal fat pads from allergic and control mice were fixed in 10% neutral formalin for 24 h, dehydrated in absolute ethanol, cleared in xylene and then embedded in paraffin. The histological sections (5µm) sections were stained with Harris haematoxylin counterstained with eosin, and then evaluated by light microscopy. Sections were analyzed by using a microscope (Olympus BX41) equipped with a digital camera (Moticam 2500) for quantification of adipocyte size. The cell area was measured in 50 adipocytes per animal, using the Image J software.

To evaluate the number of mast cells, epididymal fat pads were fixed in Carnoy for 1h, dehydrated in absolute ethanol, cleared in xylene and then

embedded in paraffin. The histological sections (7 μ m) were stained with Toluidine blue and evaluated by light microscopy. Ten fields were chosen randomly in order to count the number of mast cells.

Intravital microscopy visualization of epididymal adipose tissue microvasculature

Intravital microscopy was performed in the epididymal adipose tissue microcirculation. Briefly, mice were anesthetized with 10mg/kg xylazine and 200 mg/kg ketamine hydrochloride i.p. The right jugular vein was cannulated and rhodamine 6G (Sigma, St. Louis, MO, USA) was injected intravenous (i.v.) (0.15mg/kg) to measure the leukocyte – endothelial cell interactions. Rhodamine epiillumination was achieved with 150W variable HBO mercury lamp in conjunction with a Zeiss filter set 15 (546/12-nm band – pass filter, 580-nm Fourier transforms, 590-nm late potentials; Zeiss, Wetzlar, Germany). The microscopic images were captured with a video camera (5100 HS; Panasonic, Secaucus, NJ) and recorded on an S-VHS videotape, using both filters blocks consecutively. Data analysis was performed off - line.

Rolling leukocytes were defined as those cells moving slower than the cells at a regular flux in a given vessel. The flux of rolling cells was measured as the number of rolling cells passing by a given point in the venule per minute, with results expressed as cells/minute. A leukocyte was considered to be adherent if it remained stationary for at least 30 seconds, and total leukocyte adhesion was quantified as the number of adherent cells within a 100- μ m length of venule, with results expressed as cells/100 μ m.

Adipocyte isolation

Adipocytes were isolated from epididymal fat pads as previously described [20]. Briefly, digestion was carried out at 37°C, with constant shaking for 45 min. Cells were filtered through nylon mesh and washed three times with buffer containing (in mmol/l): 137 NaCl, 5 KCl, 4.2 NaHCO₃, 1.3 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 0.5 KH₂PO₄, 20 HEPES (pH7.4), and 1% BSA.

Analysis of adipose tissue macrophages by flow cytometry

Epididymal fat from mice was digested as described above. Adipose tissue derived stromal vascular cells were washed with DMEM supplemented with 10% FCS, counted, labeled with conjugated antibody for F4/80 (Biolegend) or their respective isotype control, and analyzed with a FACScan.

Adipose tissue cytokine and chemokine measurement

Epididymal adipose tissue extracts were obtained during the necropsy and were stored on ice. Thereafter, using Ultra-Turrax, the tissue was homogenized in extraction solution (100 mg of tissue per 1 mL) containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzetonio chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinin. The adipose tissue homogenate was spun at 10000 × g for 10 min at 4°C and the supernatants were stored at -70°C. The levels of TNF- α , IL-6, IL-10 and CCL-2 were measured by ELISA in supernatants of epididymal adipose tissue, at 1:3 dilution in PBS containing 1%

BSA, using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Lipolysis measurements

Lipolysis was measured by following the rate of glycerol release, as previously described [21]. After an initial wash, adipocytes were incubated at 37°C in a water bath for 60 min in the presence or absence of isoproterenol (ISO, 0.1µmol/L). At the end of incubation period, an aliquot of the supernatant was removed for enzymatic determination of glycerol released into the incubation medium (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brazil).

Serum analysis

Serum triglyceride, total cholesterol and glucose were assayed by conventional enzymatic methods using kits (KATAL, Belo Horizonte, MG, Brazil). FFAs were estimated using commercial kit from Wako (Pure Chemical Industries, Japan).

Statistical analysis

Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA - Tukey) or by the Student *t*-test when appropriate. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Food allergy leads to the loss of body weight and decreased fat mass in mice

Allergic but not control mice lost approximately 16% of their body weight after 7 days of Ova oral challenge (Figure 1A). We have also observed a marked reduction of epididymal adipose tissue mass in the allergic mice (Figure 1B), while the weight of gastrocnemius muscle remained unchanged (Figure 1C). Despite the loss of body weight and adipose tissue mass, the allergic mice did not exhibit a decrease in the Ova containing diet intake relative to control (Figure 1D).

Epididymal adipose tissue from allergic mice show decreased adipocyte area and increased infiltration of mast cells

Morphometric analysis has revealed that the adipocyte size, determined as cell area (Figure 2A), was strongly reduced in allergic mice (Fig. 2D), when compared to controls (Figure 2C).

The histological evaluation has also shown that the number of mast cells (Figure 2B) infiltrating the epididymal adipose tissue from allergic mice (Figure 2F) was higher than the observed in the controls (Figure 2E).

Leukocyte rolling and adhesion are increased in the epididymal adipose tissue of allergic mice

We analyzed the epididymal fat microcirculation using the intravital microscopy to investigate whether the antigen ingestion in sensitized mice could induce an inflammatory process in the adipose tissue. Figures 3A and 3B demonstrate a large increase in leukocyte rolling and adhesion in the venules of allergic mice relative to control.

Epididymal adipose tissue from allergic mice exhibit high frequency of F4/80⁺ cells among stromal cells

We analyzed the stromal vascular cells derived from epididymal adipose tissue using flow cytometry to address the frequency of cells expressing F4/80 (macrophage marker). The stromal cells of allergic mice demonstrated a higher percentage of cells expressing F4/80 when compared to controls (Figure 3C).

Alterations in adipose tissue from allergic mice are associated with increased levels of TNF- α , IL-6 and CCL2

TNF- α , IL-6 and CCL2 levels were determined to evaluate whether adipose tissue derived cytokines and chemokines were involved in the alterations induced in the epididymal fat of allergic mice. We found increased production of all the cytokines or chemokine investigated in the epididymal adipose tissue of allergic mice when compared to control mice (Figure 4A, B e C).

Epididymal adipose tissue from allergic mice show increased lipolytic activity

Adipocytes were incubated in a basal or ISO-stimulated conditions to determine the effect on lipolysis of the antigen ingestion in sensitized mice. The adipocytes from allergic mice showed an increased basal lipolysis relative to control. The presence of ISO produced a significant increase in lipolytic rate in both groups (Figure 4D).

Triglyceride, glucose, FFA and total cholesterol are decreased in the serum of allergic mice

Fasting serum triglyceride (Figure 5A), FFA (Figure 5B), total cholesterol (Figure 5C) and glucose levels (Figure 5D) were significantly decreased in allergic mice after the antigen ingestion when compared with the control animals.

Fed blood glucose levels also had a significant reduction (approximately 12%) in allergic animals (data not shown).

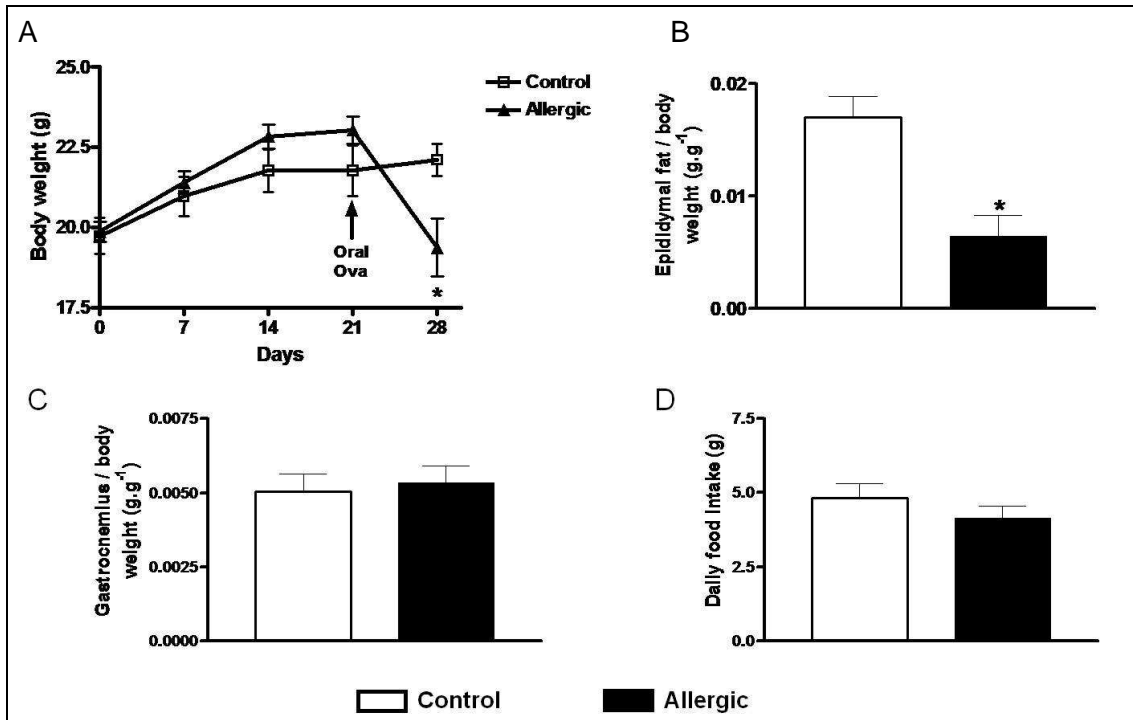


Fig.1. Allergic mice lose body weight and epididymal adipose tissue mass. The body weight was assessed weekly (A) and food intake was determined daily (D) throughout the experiment. The epididymal fat (B) and gastrocnemius muscle (C) were collected, weighted and correlated to body weight. Data are reported as means \pm SEM for 6 mice in each group. *P < 0.05 compared to control group. (Student t-test).

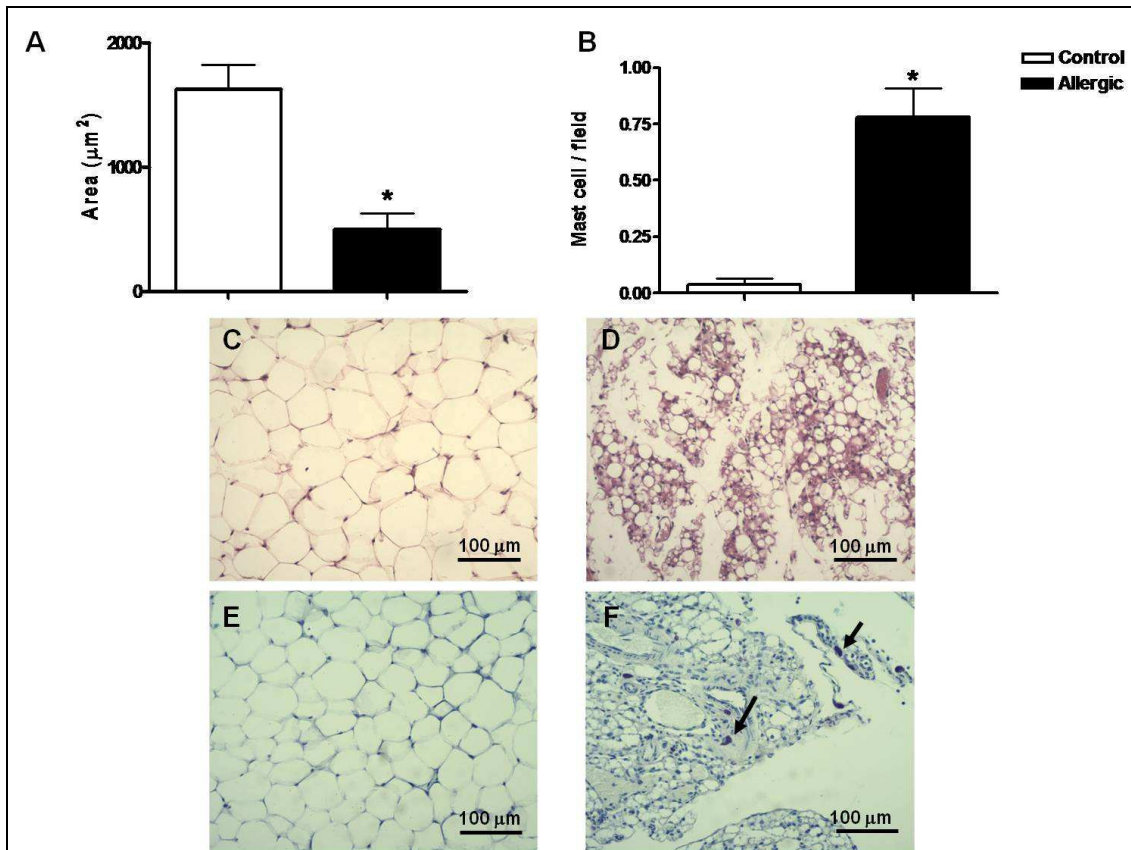


Fig.2. Decreased adipocyte area and increased number of mast cells in the epididymal adipose tissue of allergic mice. The area of 50 adipocyte from each animal was measured in hematoxylin-eosin stained sections of epididymal adipose tissue (A, B and C). The number of mast cells was evaluated in ten fields of Toluidine blue stained sections of epididymal adipose tissue (B, E e F). C and E: illustrative pictures of epididymal adipose tissue from control mice. D and F: illustrative pictures of epididymal adipose tissue from allergic mice. Arrows indicate mast cell. Data are reported as means \pm SEM for 6 mice in each group. * $P < 0.05$ compared to control group. ** $P < 0,05$ compared to allergic basal group (Student t-test / ANOVA - Tukey).

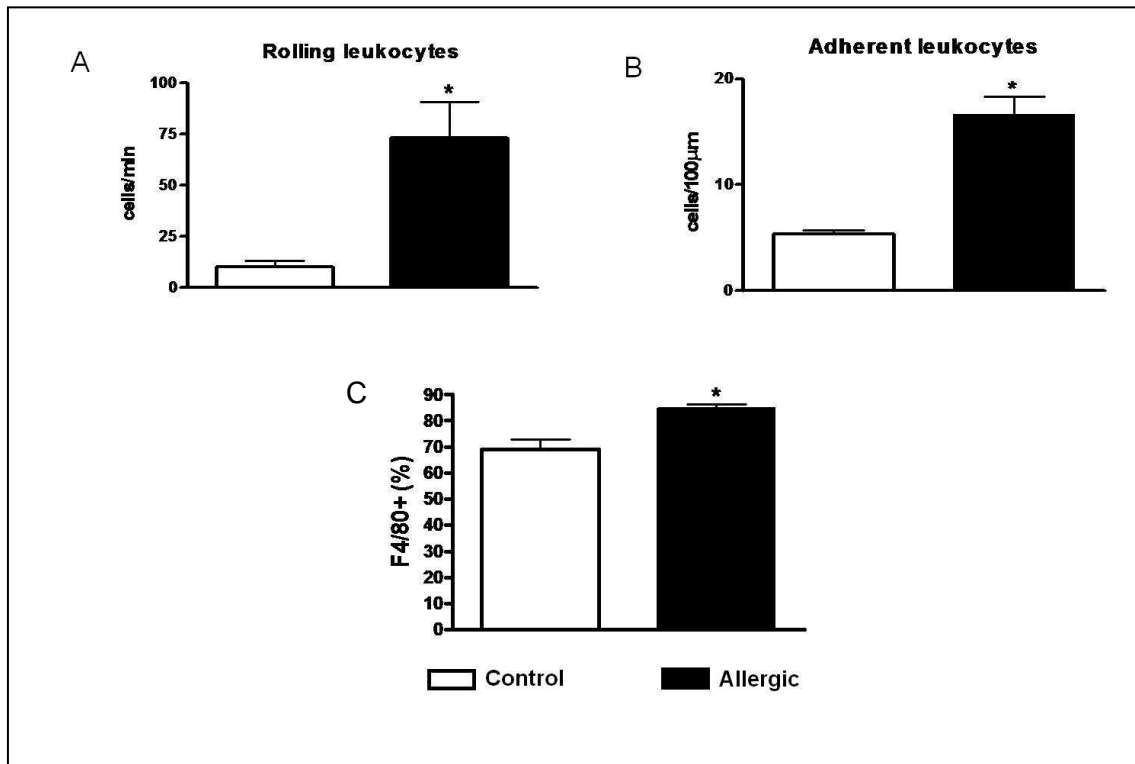


Fig.3. Epididymal adipose tissue of allergic mice exhibits increased number of rolling and adherent leucocytes and high frequency of macrophages. The leucocyte rolling (A) and adhesion (B) to the microvasculature of epididymal adipose tissue were assayed by intravital microscopy. The frequency of F4/80 positive cells among the stromal cells of epididymal adipose tissue were investigated by flow cytometry. Data are reported as means \pm SEM for 3 mice in each group. *P < 0.05 compared to control group. (Student t-test).

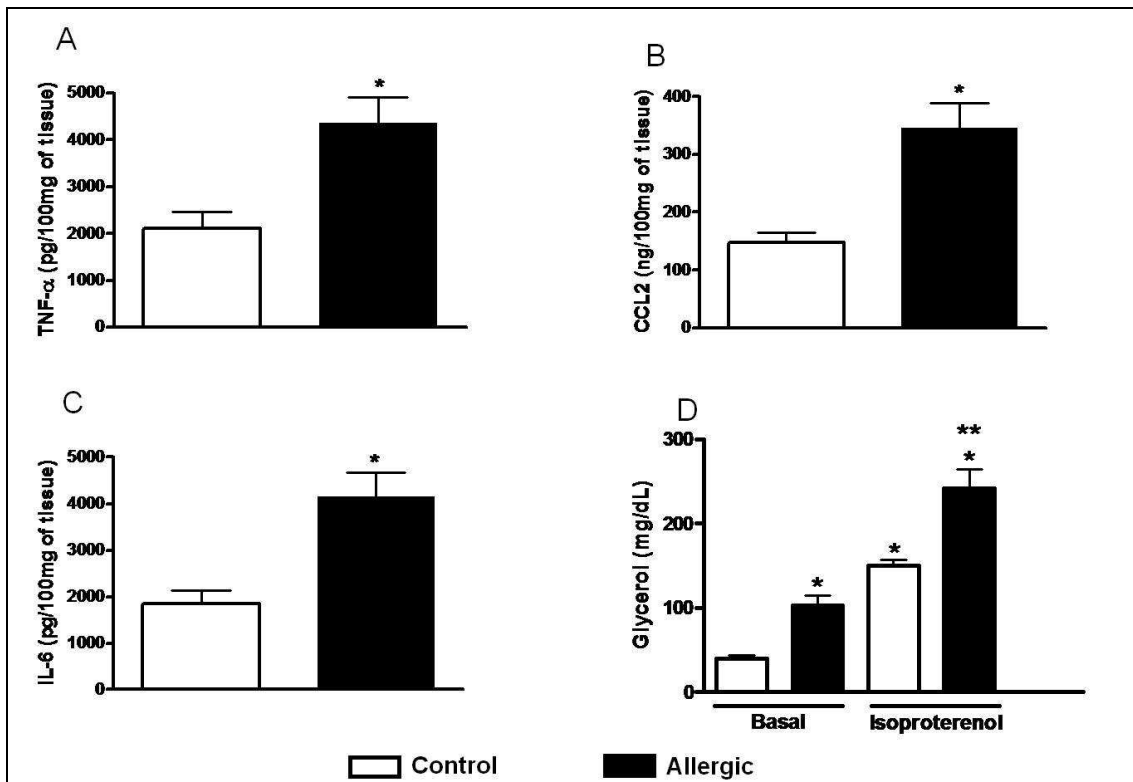


Fig.4. Elevated levels of the cytokines TNF- α and IL-6 and the chemokine CCL2 and increased lipolysis in the epididymal adipose tissue of allergic mice. The epididymal adipose tissue was assayed for TNF- α (A), IL-6 (B) and CCL2 (C) levels by ELISA. The glycerol release by isolated epididymal adipocytes were measured in the absence (basal) and presence of isoproterenol (D). Data are reported as means \pm SEM for 6 mice in each group. *P < 0.05 compared to control group. (Student t-test).

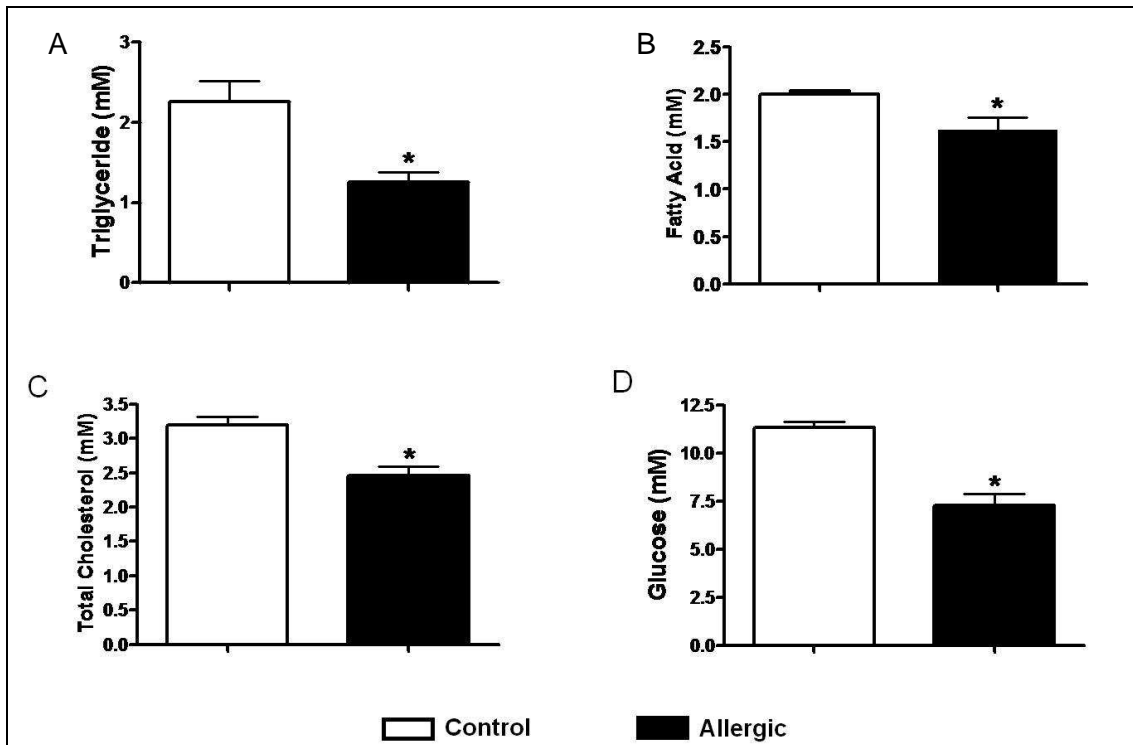


Fig.5. The levels of triglyceride, glucose, FFA and total cholesterol are decreased in the serum of allergic mice. Serum concentrations of triglyceride (A), glucose (B), FFA (C) and total cholesterol (D) were measured in overnight fasted mice. Data are reported as means \pm SEM for 6 mice in each group. *P < 0.05 compared to control group. (Student t-test). FFA (free fatty acids).

Discussion

In the present work, we used an experimental model of food allergy in which Ova-sensitized mice are chronically fed with the antigen [8]. Our results show that the allergic mice, despite the normal food intake, demonstrated an accentuated weight loss with a marked reduction in epididymal adipose tissue mass and important metabolic changes such as decreased triglyceride, FAs and glucose serum levels. We also investigated whether the inflammation associated to the food allergen ingestion was linked with the adipose tissue loss. We have shown, for the first time, that the induction of experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, with a marked increase in the number of rolling and adherent leukocyte in the microvasculature, increased frequency of F4/80 positive cells and mast cells within the stromal cells and high levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) and chemokine CCL2. This local inflammation could be, at least in part, responsible by the increased adipocyte lipolysis, which can contribute to the decreased fat pad mass in allergic mice.

It is well established that inflammatory conditions favors a catabolic state and suppresses anabolic pathways. Energy redistribution and particularly the mobilization of stored lipids occurs to redistribute nutrients to the cells involved in the inflammatory response [17;18]. In accordance with this, mice with acute colitis use preferentially fat instead of carbohydrates as an energy substrate, whereas healthy controls use carbohydrates as the main energy substrate [22].

We have shown that the induction of the experimental food allergy leads to inflammatory alterations in epididymal adipose tissue. Among these alterations is the increased number of mast cells in the adipose tissue from allergic mice. Previous studies have already demonstrated that allergic mice present high levels of circulating Ova specific IgE in our experimental model [8]. Therefore, it is likely that these antibodies can trigger the degranulation of mast cells in the adipose tissue once these cells present FcεRI receptors specific for IgE. During allergic responses, the antigen activates FcεRI -bound specific IgE and initiate degranulation of the mast cell with the release of various pro-inflammatory mediators, including some cytokines like TNF-α, IL-1 and IL-6 [23; 24]. Traditionally thought as mediators of allergic responses, recently, mast cell involvement in obesity has been shown. A recent study demonstrated that the depletion of mast cells resulted in reduced adipose tissue macrophage content in obesity, suggesting that mast cells may be involved in adipose tissue macrophage (ATM) recruitment [25].

The epididymal adipose tissue from allergic mice has also demonstrated a high frequency of cells expressing F4/80, a marker of mature macrophage [26], associated with high local levels of the chemokine MCP-1. These findings are in agreement with previous studies which have established that over expression of MCP-1 in adipose tissue results in increased macrophage recruitment [27; 28]. Macrophages represent a prominent source of inflammatory mediators in adipose tissue [29; 30] that can both initiate and maintain the inflammatory milieu during allergy.

Apart from stromal cells, there is growing evidence showing that adipocytes also produce and secrete bioactive molecules, referred to as

adipocytokines. During inflammation the production of substances like leptin, TNF- α and IL-6 by adipocytes and stromal cells can be up regulated and contribute to the pro-inflammatory milieu in the adipose tissue [31]. We have shown increased TNF- α and IL-6 levels in the epididymal adipose tissue from allergic mice and it is likely that these cytokines may be acting to induce and exacerbate the local inflammation. We could hypothesize that the high production of TNF- α seen in the adipose tissue from allergic mice contributes to increase the leukocyte migration in the microvasculature of this tissue because TNF- α up regulates endothelial adhesion molecules allowing the recruitment of leukocytes into sites of inflammation [32].

A previous study, using an *in vitro* co culture system composed of adipocytes and macrophages, demonstrated that a paracrine loop involving saturated FAs and TNF- α derived from adipocytes and macrophages, respectively, establishes a vicious cycle that augments the inflammatory changes; leading to marked up-regulation of pro inflammatory adipocytokines, such as MCP-1, TNF- α and IL-6. It was postulated that TNF- α , which is derived mostly from infiltrated macrophages in adipose tissue, acts on the receptor in adipocytes, thereby inducing proinflammatory cytokine production and adipocyte lipolysis. The saturated FAs released from adipocytes by lipolysis activity, in turn, induces inflammatory changes in macrophages via Toll like receptor 4 (TLR4), accelerating the adipose tissue inflammation [33]. It has already been demonstrated *in vitro* that TNF- α increases lipolysis in adipocytes presumably via nuclear factor – κ B dependent mechanism [34]. The lipolytic action of TNF- α was confirmed *in vivo* once it has been reported that

administration of recombinant TNF- α to human subjects increases whole body lipolysis by 40% [35].

The cytokine IL-6, which was also found increased in epididymal adipose tissue from allergic mice, presents a clearly lipolytic action with weight-reducing properties [36]. Loss of body weight in mice with acute colitis was associated with highly elevated plasma levels of IL-6 [22]. Therefore, it is very plausible that both TNF- α and IL-6 can contribute to the increased basal lipolytic activity seen in adipose tissue from allergic mice in our study.

We have also demonstrated that the adipocyte area is decreased in the epididymal adipose tissue from allergic mice. Adipocyte atrophy may be attributable to a decrease in lipid deposition or an increase in the lipolysis rate [37]. We can infer that the increased basal lipolysis contributes to the diminished size of adipocytes in allergic mice. On the other hand, the increased macrophage infiltration in the adipose tissue may be related to an occurrence of apoptotic adipocytes [38]. Thereby, the number of adipocyte can also be diminished in the adipose tissue from allergic mice. Further studies are needed to investigate whether alterations in lipogenesis and/or adipocyte hypoplasia are also involved in the adipose tissue loss observed in our model.

In summary, the inflammatory state induced by food allergy probably contributed to the metabolic changes, represented by the increased lipolysis activity associated with a reduction in the adipose tissue mass with decreased adipocyte size. These alterations culminate in greater loss of body weight after the ingestion of the Ova containing diet in the allergic mice. In this sense, our study provides important contributions about the mechanisms involved in the body weight loss in animal models of food allergy.

Conclusion

We can conclude that the induction of experimental food allergy leads to epididymal adipose tissue inflammation. This inflammatory condition can trigger local and systemic metabolic alterations that culminate in the extensive loss of body weight observed in the allergic mice.

References

- [1] Saurer L, Mueller C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy*. 2009; Apr;64(4):505-19.
- [2] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annual review of medicine*. 2009; 60:261-77.
- [3] Cochrane S, Beyer K, Clausen M, Wjst M, Hiller R, Nicoletti C, et al. Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy*. 2009; Sep;64(9):1246-55.
- [4] Jarvis D, Luczynska C, Chinn S, Potts J, Sunyer J, Janson C, et al. Change in prevalence of IgE sensitization and mean total IgE with age and cohort. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005; Sep;116(3):675-82.
- [5] Christie L, Hine RJ, Parker JG, Burks W. Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *Journal of the American Dietetic Association*. 2002; Nov;102(11):1648-51.
- [6] Atkins D. Food allergy: diagnosis and management. *Primary care*. 2008; Mar;35(1):119-40, vii.
- [7] Aldamiz-Echevarria L, Bilbao A, Andrade F, Elorz J, Prieto JA, Rodriguez-Soriano J. Fatty acid deficiency profile in children with food allergy managed with elimination diets. *Acta Paediatr*. 2008; Nov;97(11):1572-6.
- [8] Saldanha JC, Gargiulo DL, Silva SS, Carmo-Pinto FH, Andrade MC, Alvarez-Leite JI, et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian journal of medical and biological research. Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica*. 2004; Jun;37(6):809-16.

[9] Cardoso CR, Teixeira G, Provinciatto PR, Godoi DF, Ferreira BR, Milanezi CM, et al. Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2008; Feb;38(2):338-49.

[10] Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Kikuchi A, Ishida T, Sasaki K, Hirano K, et al. Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006; May;117(5):1125-32.

[11] Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiological reviews*. 2009; Apr;89(2):381-410.

[12] Cryer A, Riley SE, Williams ER, Robinson DS. Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat-cells and to plasma insulin concentrations. *Clinical science and molecular medicine*. 1976; Mar;50(3):213-21.

[13] Redinger RN. Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl Res*. 2009; Aug;154(2):52-60.

[14] Saini A, Al-Shanti N, Stewart CE. Waste management - cytokines, growth factors and cachexia. *Cytokine & growth factor reviews*. 2006; Dec;17(6):475-86.

[15] Granado M, Martin AI, Castellero E, Lopez-Calderon A, Villanua MA. Cyclooxygenase-2 inhibition reverts the decrease in adiponectin levels and attenuates the loss of white adipose tissue during chronic inflammation. *European journal of pharmacology*. 2009; Feb 21.

[16] Shamir R. Nutritional aspects in inflammatory bowel disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009; Apr;48 Suppl 2:S86-8.

[17] Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2005; May;115(5):1111-9.

[18] Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2005; Feb;24(1):16-31.

[19] Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *The Journal of nutrition*. 1993; Nov;123(11):1923-31.

[20] Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *The Journal of biological chemistry*. 1964; Feb;239:375-80.

[21] Gasic S, Green A. Gi down-regulation and heterologous desensitization in adipocytes after treatment with the alpha 2-agonist UK 14304. *Biochemical pharmacology*. 1995; Mar 15;49(6):785-90.

[22] Melgar S, Bjursell M, Gerdin AK, Svensson L, Michaelsson E, Bohlooly YM. Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *American journal of physiology*. 2007; Jan;292(1):G165-72.

[23] Berin MC, Mayer L. Immunophysiology of experimental food allergy. *Mucosal Immunol*. 2009 Jan;2(1):24-32.

[24] Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S73-80.

[25] Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):940-5.

[26] Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *The Journal of biological chemistry*. 2003; Mar 14;278(11):9850-5.

[27] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2006; Jun;116(6):1494-505.

[28] Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *The Journal of biological chemistry*. 2006; Sep 8;281(36):26602-14.

[29] Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of leukocyte biology*. 2005; Apr 1.

[30] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*. 2007; Jan;117(1):175-84.

[31] Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010; Mar 25;316(2):129-39.

[32] Kneilling M, Mailhammer R, Hultner L, Schonberger T, Fuchs K, Schaller M, et al. Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation. *Blood*. 2009; Aug 20;114(8):1696-706.

[33] Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005; Oct;25(10):2062-8.

[34] Laurencikiene J, van Harmelen V, Arvidsson Nordstrom E, Dicker A, Blomqvist L, Naslund E, et al. NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Journal of lipid research*. 2007 May;48(5):1069-77.

[35] Plomgaard P, Fischer CP, Ibfelt T, Pedersen BK, van Hall G. Tumor necrosis factor-alpha modulates human in vivo lipolysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008 Feb;93(2):543-9.

[36] Hoene M, Weigert C. The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. *Obes Rev.* 2008; Jan;9(1):20-9.

[37] Bing C, Trayhurn P. New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 2009 Nov;68(4):385-92.

[38] Alkhouri N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, et al. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *The Journal of biological chemistry.* 2010 Jan 29;285(5):3428-38.