

Nathália Vieira Batista

**REPERCUSSÕES IMUNOLÓGICAS E METABÓLICAS
DA INGESTÃO CONTINUADA DE ANTÍGENO POR
ANIMAIS SENSIBILIZADOS**

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - 2013

Nathália Vieira Batista

**REPERCUSSÕES IMUNOLÓGICAS E METABÓLICAS
DA INGESTÃO CONTINUADA DE ANTÍGENO POR
ANIMAIS SENSIBILIZADOS**

Dissertação 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 Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Denise Carmona Cara Machado

Departamento de Morfologia – ICB/UFMG

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Escola de Enfermagem - UFMG

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - 2013



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

NATHÁLIA VIEIRA BATISTA

234/2013/07
entrada
1º/2011
2011667660

Às quatorze horas do dia 01 de fevereiro de 2013, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "REPERCUSSÕES IMUNOLÓGICAS E METABÓLICAS DA INGESTÃO CONTINUADA DE ANTÍGENO POR ANIMAIS SENSIBILIZADOS", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Denise Carmona Cara Machado**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Denise Carmona Cara Machado	UFMG	<i>aprovada</i>
Dra. Joana Ferreira do Amaral	UFOP	<i>aprovada</i>
Dr. Sergio Henrique Sousa Santos	UFMG	<i>Santos</i>

aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: *aprovada*
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 01 de fevereiro de 2013.**

Dra. Denise Carmona Cara Machado (Orientadora) *Denise Carmona*

Dra. Joana Ferreira do Amaral *Joana Ferreira do Amaral*

Dr. Sergio Henrique Sousa Santos *Santos*

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Cláudia Aparecida de Oliveira

Prof. Cláudia Aparecida de Oliveira
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

Este trabalho foi realizado no Laboratório da Biologia do Sistema Linfóide e de Regeneração do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e contou com apoio financeiro das seguintes agências de fomento: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerias (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

"A imaginação é mais importante que o conhecimento.
O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o mundo."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À orientadora Denise Carmona, por ter me acolhido em seu laboratório e pelo apoio não apenas no mestrado mas também durante o período de iniciação científica.

À co-orientadora Adaliene, pelo apoio e atenção durante este trabalho.

À Mary, por todos os ensinamentos e carinho.

À Rafaela, que não mediu esforços para me ajudar no desenvolvimento deste trabalho, sempre com muita disponibilidade e competência.

À Denise Perez, Débora e Roberta pela amizade e ajuda sempre que necessário.

Aos colegas e professores do Laboratório da Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração pela agradável convivência.

Aos amigos da Biologia, por terem proporcionado ótimos momentos dentro e fora do ICB.

Aos meus pais, Vanda e Gilberto, e irmão que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa.

Ao Gustavo, que compartilhou cada momento do mestrado com muita paciência e amor.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN - Instituto americano de nutrição
ANOVA - análise de variância
CD - *cluster of differentiation*
CEBIO - centro de bioterismo
DAI - *disease activity index*
ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*
GALT - tecido linfóide associado ao intestino
GLUT - transportador de glicose
H.E - hematoxilina e eosina
IFN - interferon
Ig - imunoglobulina
IL - interleucina
MCP-1/CCL-2 – proteína quimioatraente de monócitos/macrófagos
NF-kB - fator de transcrição nuclear kappa B
OGTT - oral glucose tolerance test
OIT - imunoterapia oral
OPD - ortofenilenodiamino
OVA - ovalbumina
PBS - salina tamponada com fosfato
RPM - rotações por minuto
TAG - triacilglicerol
TCR - receptor de células T
TGF - fator de crescimento e transformação
TGI - trato gastrointestinal
Th - células T auxiliares
TLR - *toll like receptor*
TNF - fator de necrose tumoral
TTOG - teste oral de tolerância à glicose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo de indução da alergia alimentar	26
Figura 2 - Avaliação dos níveis séricos de IgE e IgG1 anti-OVA	35
Figura 3 - Avaliação da produção de citocinas no baço	36
Figura 4 - Avaliação dos parâmetros clínicos	37
Figura 5 - Avaliação do peso do tecido adiposo	39
Figura 6 - Avaliação da morfometria do tecido adiposo	39
Figura 7 - Microscopia intravital do tecido adiposo perigonadal	40
Figura 8 - Contagem de células sanguíneas	41
Figura 9 - Avaliação da produção de citocinas no tecido adiposo mesentérico	42
Figura 10 - Concentração sérica de adipocinas	43
Figura 11 - Dosagem sérica glicose e triglicérides	44
Figura 12 - Teste de tolerância oral à glicose	45
Figura 13 - Teste de sensibilidade à insulina	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ração padrão para roedores baseada na AIN-93G	27
Tabela 2 - Divisão dos grupos experimentais	28
Tabela 3 - Escala do índice de atividade da doença	30

RESUMO

A alergia alimentar afeta aproximadamente 5% das crianças e 3% da população adulta no mundo ocidental. A restrição ao alérgeno é o tratamento de escolha nessa condição, porém a ingestão do antígeno em doses crescentes e ininterruptas tem demonstrado resultados surpreendentes em protocolos clínico experimentais. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de alergia alimentar à ovalbumina (OVA) em camundongos que simula vários sinais desta patologia em seres humanos. Neste modelo, a ingestão de OVA por animais sensibilizados resulta em um aumento da produção de IgE e IgG1 anti-OVA, além de uma diminuição significativa do peso corpóreo e do tecido adiposo que se encontra inflamado. Devido à forte associação entre desordens metabólicas e inflamação no tecido adiposo, torna-se importante estudar as repercussões imunológicas e metabólicas da ingestão continuada de antígeno por animais sensibilizados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento das alterações imunológicas e metabólicas causadas pela ingestão contínua de OVA por camundongos BALB/c previamente imunizados. O processo alérgico, que ocorreu após a ingestão de OVA durante 7 dias por animais sensibilizados e foi evidenciado tanto pelo aumento de IgE e IgG1 anti-OVA quanto pelo aparecimento da aversão ao antígeno, resultou em perda de peso corporal e de tecido adiposo visceral juntamente com hipotrofia dos adipócitos. Houve também, no tecido adiposo, aumento no recrutamento de leucócitos e na produção de IL-6. Em níveis sistêmicos, foi possível observar diminuição no nível sérico de adipocinas como adiponectina, resistina e leptina além dos níveis de glicose e triglicérides. Também neste tempo, os animais foram mais tolerantes ao teste de tolerância à glicose (TTOG). Após 14 dias de desafio, os animais sensibilizados apresentaram um nível de IgE anti-OVA equivalente ao dos animais que foram somente sensibilizados, porém não houve alteração no nível de IgG1 anti-OVA atingido. Esta dessensibilização desenvolvida a OVA repercutiu em diversos parâmetros, fazendo com que eles retornassem ao nível apresentado por animais não sensibilizados. Dentre esses parâmetros podemos citar a quantidade de OVA ingerida, o peso corporal, a área dos adipócitos, o recrutamento de leucócitos para o tecido adiposo, a produção de IL-6 por este tecido, a tolerância à glicose (TTOG) e os níveis séricos de adiponectina, leptina, resistina e triglicérides. Entretanto, a perda de peso do tecido adiposo visceral e os níveis séricos de glicose permaneceram significativamente semelhantes aos de animais que receberam a ração de OVA por 7 dias. Com base nesses resultados, pode-se

concluir que a ingestão continuada de OVA por animais sensibilizados induz dessensibilização a esta proteína com consequência metabólica sistêmica.

ABSTRACT

Food allergy affects about 5% of children and 3% of adults in western world. The allergen restriction is the chosen treatment in this condition, but the ingestion of the antigen in increasing doses has shown interesting results in experimental clinical protocols. We developed an experimental food allergy model to Ovalbumin (OVA) in mice that induces several signals similar to those we found in human beings. In this model, the ingestion of OVA by sensitized mice results in an increased anti-OVA IgE and IgG1 production, besides a marked weight and adipose tissue loss which is inflamed. Because of the strong association between metabolic disorders and adipose tissue inflammation, it is important to study the immunological and metabolic consequences of the continued ingestion of antigen by sensitized mice. The aim of this study was to evaluate the development of the immunological and metabolic alterations caused by the continued ingestion of OVA by previously sensitized mice. The allergic process, that happened after 7 days of OVA ingestion by sensitized mice, was evidenced by the increased anti-OVA IgE and IgG1 levels and the development of antigen aversion. This process resulted in body and visceral adipose tissue weight loss with an adipocyte hypotrophy. Also, in the adipose tissue, there was an increase in the leucocyte recruitment and in the production of IL-6. In systemic levels, it was possible to observe a decrease in the serum titers of adipokines such as adiponectin, resistin and leptin as well as the glucose and triglyceride levels. Also in this time, mice were more tolerant to the oral glucose tolerance test (OGTT). After 14 days of oral challenge, sensitized mice showed an anti-OVA IgE level similar to the mice that were only sensitized, but the anti-OVA IgG1 level didn't change. With this developed desensitization to OVA, different parameters returned to the levels showed by nonsensitized animals. For example, the amount of OVA eaten, the body weight, the adipocyte area, the leukocyte recruitment to the adipose tissue, the production of IL-6 by this tissue, the tolerance to glucose (OGTT) and the serum levels of adiponectin, leptin, resistin and triglycerides. However, the loss of visceral adipose tissue and the serum levels of glucose were kept similar to the mice that received the OVA diet for only 7 days. Our data suggest that the continued ingestion of OVA by sensitized mice leads to a desensitization with systemic metabolic consequence.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Sistema imune associado à mucosa intestinal	14
1.1.2	Tolerância oral	15
1.2	Alergia alimentar	16
1.3	Metabolismo e inflamação do tecido adiposo	19
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Animais	25
3.2	Protocolo de indução da alergia alimentar à ovalbumina	25
3.3	Desenho experimental	27
3.4	Obtenção do sangue e do soro	28
3.5	Dosagem de anticorpos específicos	28
3.5.1	Dosagem de IgE anti-ovalbumina (soro)	28
3.5.2	Dosagem de IgG1 anti-ovalbumina (soro)	29
3.6	Avaliação dos parâmetros clínicos	29
3.6.1	Avaliação do consumo de ração de ovalbumina	29
3.6.2	Avaliação do peso corpóreo	30
3.6.3	Índice de atividade da doença (Score DAI)	30
3.7	Avaliação do peso relativo do tecido adiposo	30
3.8	Avaliação histológica do tecido adiposo	31
3.9	Microscopia intravital no tecido adiposo	31
3.10	Contagem total e diferenciada de leucócitos circulantes	31
3.11	Processamento do baço e tecido adiposo para detecção de citocinas	32
3.12	Dosagem de IL-6, IL-4 e IL-10	32

3.13	Dosagem de leptina, adiponectina e resistina	32
3.14	Dosagem de glicose e triglicérides	33
3.15	Teste de tolerância à glicose e de sensibilidade insulínica	33
3.16	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Avaliação dos níveis séricos de IgE e IgG1 anti-OVA	34
4.2	Avaliação da produção de citocinas no baço	34
4.3	Avaliação dos parâmetros clínicos	36
4.4.	Avaliação da perda de tecido adiposo visceral	38
4.5	Avaliação da hipotrofia dos adipócitos do tecido adiposo perigonadal e mesentérico	38
4.6	Avaliação do recrutamento de leucócitos para o tecidos adiposo perigonadal	40
4.7	Contagem total e diferenciada de leucócitos circulantes	41
4.8	Avaliação da produção de citocinas no tecido adiposo mesentérico	42
4.9	Quantificação sérica de adipocinas	42
4.10	Quantificação sérica de glicose e triglicérides	43
4.11	Teste de tolerância oral à glicose e teste de sensibilidade à insulina	44
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÕES	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema imune associado à mucosa intestinal

As superfícies mucosas representam a maior via de contato entre o ambiente e o organismo. A área total da mucosa intestinal é aproximadamente 100 vezes maior do que a área da pele e em humanos a sua área é estimada em 300 m² (Moog, 1981). Dessa forma, a maioria dos antígenos exógenos, como aqueles provenientes da microbiota e da dieta, tem acesso ao organismo através dessa superfície (Brandtzaeg, 1998). Estima-se que aproximadamente 30 kg de proteínas passam pelo trato gastrointestinal (TGI) humano anualmente e cerca de 130 a 190 gramas são absorvidas diariamente (Brandtzaeg, Farstad *et al.*, 1998). Além disso, o TGI abriga uma microbiota com densidade de 10¹⁴ microrganismos (Shanahan, 2002). Como consequência desta grande e constante estimulação antigênica do sistema imune, uma característica importante da mucosa intestinal é a presença de um grande e complexo tecido linfóide associado. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) apresenta cerca de 10¹² células linfóides por metro no intestino delgado humano (Mestecky, 1987) e ele pode ser dividido funcionalmente em dois compartimentos: GALT organizado ou locais indutores e GALT difuso ou locais efetores (Mowat, 2003). O GALT organizado é composto por placas de Peyer, os folículos linfóides isolados e os linfonodos locais. Neste compartimento, ocorre a captura do antígeno diretamente do lúmen intestinal, o processamento, a apresentação e conseqüentemente a ativação de células T e B *naïve*. Já o GALT difuso apresenta populações linfóides entre as células epiteliais, os linfócitos intraepiteliais, e células da lâmina própria intestinal, onde células efetoras como as células T contribuem para a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos secretores de imunoglobulina A (Brandtzaeg e Pabst, 2004). Pode-se dizer então que o GALT apresenta componentes imunes inatos e adaptativos que são adaptados tanto para inibir uma resposta aos antígenos da dieta e da microbiota quanto para montar uma resposta imunoprotetora contra organismos patogênicos, para dessa forma manter sua função fisiológica de absorção de nutrientes (Scurlock, Vickery *et al.*, 2010).

1.1.1 Tolerância oral

A administração oral de antígenos pode resultar em uma resposta imune local com produção de IgA secretória (imunização local), uma resposta imune sistêmica com produção de anticorpos séricos específicos (imunização oral) ou, mais frequentemente, em uma tolerância oral que é a supressão da reatividade imunológica a determinado antígeno (Faria e Weiner, 2005). A tolerância oral foi descrita pela primeira vez no início do século XX e é classicamente definida como um estado imunológico onde o organismo se torna especificamente refratário à imunização parenteral com um antígeno que foi previamente contatado por via oral (Vaz, Maia *et al.*, 1977). Este estado repercute em vários aspectos da reatividade imunológica específica ao antígeno como na redução da produção de imunoglobulinas de diferentes isotipos (Vaz, Maia *et al.*, 1977; Ngan e Kind, 1978), das reações de hipersensibilidade tardia (Mowat, Strobel *et al.*, 1982) e da produção de várias citocinas (Weiner, 1994). Dentre os fatores que podem influenciar no desenvolvimento da tolerância oral podemos citar a natureza, dose e frequência de administração do antígeno, além da imaturidade imunológica e a microbiota. Com relação à dose e à frequência de administração do antígeno, pode-se dizer que a ingestão contínua do antígeno diluído na mamadeira do animal é mais eficiente na indução de supressão que a administração da mesma quantidade de antígeno por via intragástrica *in bolus* (gavagem). Um dos mecanismos importantes na eficácia da ingestão contínua do antígeno é sua capacidade aumentada de induzir a produção das citocinas IL-10 e TGF- β (Faria, Maron *et al.*, 2003).

Apesar da tolerância oral ter sido descrita há mais de cem anos e da existência de vários trabalhos sobre este assunto, os mecanismos responsáveis pela sua indução ainda não estão totalmente elucidados. Os mecanismos propostos para explicar o desenvolvimento da tolerância oral são divididos em dois grupos: mecanismos passivos e mecanismos ativos. Os mecanismos passivos referem-se à eliminação (deleção clonal) ou bloqueio das funções da célula reativa (anergia). Sugere-se que estes mecanismos aconteceriam após a administração de altas doses de antígeno (Faria e Weiner, 1999). Dentre os mecanismos ativos, que aconteceriam após administração de baixas doses de antígeno, temos as células T expressando TCR-gama-delta (Mengel, Cardillo *et al.*, 1995) e as células T CD4+ apresentando um perfil regulatório (Curotto De Lafaille e Lafaille, 2009).

A falha em estabelecer a tolerância oral ou a quebra da tolerância já existente podem provocar a indução de reações de hipersensibilidade aos antígenos da dieta, estabelecendo,

por exemplo, as alergias alimentares (Saurer e Mueller, 2009). Recentemente, tem havido um grande interesse em entender os mecanismos de indução da tolerância oral com objetivo de prevenir ou até mesmo tratar as reações de hipersensibilidade aos alimentos. Este esforço é de grande importância, uma vez que atualmente não existe nenhuma terapia definitiva para as alergias alimentares e os tratamentos realizados são a restrição do alérgeno com suporte nutricional e a administração de medicamentos em casos de emergência (Scurlock, Vickery *et al.*, 2010). Dessa forma, atualmente a imunoterapia tem sido utilizada como tratamento para as reações alérgicas e o objetivo dessa terapia é alcançar um estado de tolerância ao alérgeno.

A imunoterapia oral (OIT) é realizada através da administração regular de pequenas quantidades do alérgeno por via oral, para induzir a princípio uma dessensibilização e então, com o tempo, induzir um estado de tolerância ao antígeno. Além da imunoterapia oral, existe ainda a imunoterapia sublingual (SLIT) na qual a administração do antígeno é feita embaixo da língua. Os dois tratamentos são tipicamente iniciados em um ambiente controlado em que as doses da proteína são dadas de forma gradual e crescente. Os benefícios desse tipo de tratamento geralmente envolvem a diminuição nos níveis de IgE específica ao antígeno, aumento no nível de IgG4 também específica, supressão dos mastócitos e basófilos, aumento nas Tregs e uma alteração no perfil de citocinas (Land, 2011).

1.2 Alergia alimentar

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imune anormal aos antígenos introduzidos no organismo por meio da alimentação. Em indivíduos que apresentam uma sensibilidade a esses antígenos, alguns distúrbios podem ser desencadeados após a ingestão de determinados alimentos (Sicherer e Sampson, 2008; 2010). Nesses indivíduos, a alergia está relacionada com a presença de anticorpos específicos para antígenos alimentares no soro e é frequentemente associada a altas concentrações de IgE sérica (Thijs, Muller *et al.*, 2010).

Os antígenos responsáveis pelas reações alérgicas, também chamados de alérgenos, geralmente são proteínas ambientais comuns. Ao entrar em contato com esses antígenos, a maioria das pessoas não produz IgE específica nem desenvolve reações ao mesmos. Esta observação se deve ao fato de que, conforme relatado anteriormente, a mucosa intestinal possui uma resposta imunológica caracterizada pela tolerância aos antígenos provenientes da dieta e vários componentes contribuem para evitar a sensibilização do indivíduo aos antígenos

alimentares. Esses componentes podem ser imunológicos, como a IgA e as células T reguladoras e não imunológicos, como as enzimas digestivas e o muco (Strobel e Mowat, 2006). No entanto, as reações alérgicas podem se desenvolver em pessoas geneticamente susceptíveis quando a seletividade da mucosa intestinal aos antígenos é alterada. Esta seletividade pode ser alterada devido à imaturidade da mucosa intestinal em crianças (Eigenmann, 2009; Sicherer e Sampson, 2010), ao uso prolongado de antiácidos (Untersmayr e Jensen-Jarolim, 2008), à ingestão crônica de álcool (Keshavarzian, Farhadi *et al.*, 2009) e ao stress (Vicario, Guilarte *et al.*, 2010).

Apenas um pequeno grupo de alimentos é responsável pela maioria das reações alérgicas. Esses alimentos incluem o leite, ovo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar (Seibold, 2005). Os alimentos que causam reações imunológicas, produzem após sua digestão macromoléculas com algumas propriedades em comum que provavelmente protegem os antígenos da desnaturação e da degradação no trato gastrointestinal e permitem sua absorção intacta (Helm, Furuta *et al.*, 2002). Dentre elas, pode-se citar o baixo peso molecular, a glicosilação e a alta solubilidade em fluidos corporais.

Nos casos em que há uma diminuição da regulação na mucosa digestiva, pode ocorrer uma absorção exacerbada de moléculas da dieta que interagem com células apresentadoras de antígeno presentes na mucosa intestinal. Essas moléculas são processadas e os peptídeos resultantes são apresentados nas sinapses imunológicas com linfócitos T CD4+. Após este estímulo, essas células se proliferam e se diferenciam em células produtoras de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) que irão induzir a secreção de imunoglobulina E específica ao antígeno pelos linfócitos B (Bischoff e 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, Engels *et al.*, 2008). Esta nova exposição ao antígeno desencadeia a reação de hipersensibilidade do tipo imediato responsável pelos sintomas clássicos da alergia alimentar como o aumento da produção de muco, desequilíbrio eletrolítico, diarreias e aumento do peristaltismo (Huard, Mckee *et al.*, 2008).

As reações alérgicas alimentares dependentes de IgE podem afetar um ou mais órgãos como a pele (dermatite atópica, angioedema 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 (Sicherer, 2002).

A alergia alimentar tem se tornado um problema de saúde pública devido à alta prevalência, principalmente nas crianças. Ela afeta aproximadamente 5% das crianças e 3% da população adulta no ocidente (Sicherer e Sampson, 2010). Nas crianças, as alergias alimentares estão relacionadas a deficiências nutricionais que podem interferir no crescimento e no desenvolvimento neurológico (Aldamiz-Echevarria, Bilbao *et al.*, 2008; Noimark e Cox, 2008). Outro fator preocupante do ponto de vista nutricional é a frequente utilização de restrição alimentar como medida preventiva das reações alérgicas (Sicherer e Sampson, 2010). Portanto, o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na inflamação alérgica é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essa doença.

Para o estudo dos mecanismos envolvidos na reação alérgica e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, a utilização de modelos animais é uma importante alternativa. Dessa forma, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de alergia alimentar à ovalbumina (OVA) em camundongos. Foi demonstrado que a ingestão de OVA por camundongos BALB/c sensibilizados é capaz de aumentar a produção de IgE e IgG1 anti-OVA, gerar edema intestinal e infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal. Além disso, uma das alterações sistêmicas mais marcantes da alergia alimentar observada nos camundongos BALB/c, é o acentuado emagrecimento com grande perda de tecido adiposo (Saldanha, Gargiulo *et al.*, 2004; Dourado, Noviello Mde *et al.*, 2011).

Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram ainda que, a perda de peso corpóreo não tem como causa a má absorção dos nutrientes provenientes da dieta, uma vez que a mucosa intestinal, analisada morfometricamente, apresentou-se íntegra. Investigando o mecanismo envolvido no emagrecimento e, conseqüentemente, na redução da adiposidade, foi observado que há diminuição do consumo de ração, devido ao fenômeno de aversão imunológica (Cara, Conde *et al.*, 1994; 1997). Entretanto, a redução no consumo de ração não parece ser suficiente para, só por ela mesma, refletir no emagrecimento alcançado por esses animais. Esse se dá associado, provavelmente, à inflamação localizada, não somente sistêmica, em sítios metabólicos importantes como o tecido adiposo pelo processo inflamatório alérgico (Dourado, Noviello Mde *et al.*, 2011). Observou-se que, 7 dias após o consumo contínuo do antígeno por animais sensibilizados, tal como acontece na desnutrição (Kosteli, Sugaru *et al.*, 2010) e na obesidade (Weisberg, Mccann *et al.*, 2003; Xu, Barnes *et al.*, 2003) há um infiltrado inflamatório 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. Além disso, a análise histológica revelou a presença de um infiltrado celular entre os adipócitos dos camundongos alérgicos. Dentre as células infiltradas no tecido adiposo epididimal dos camundongos alérgicos, foi observado um número elevado de mastócitos e macrófagos (Dourado, Noviello Mde *et al.*, 2011).

1.3 Metabolismo e inflamação do tecido adiposo

O conteúdo de gordura corporal é determinado pelo balanço entre a deposição e a mobilização de lipídios do tecido adiposo. As únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional, são os adipócitos. 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 que estão armazenados no próprio tecido (Ahmadian, Duncan *et al.*, 2007).

Além de participarem na regulação do metabolismo de lipídios, os adipócitos também contribuem para a captação da glicose auxiliando na manutenção da glicemia, sendo essas células cruciais para o controle do metabolismo sistêmico de carboidratos. O transporte da glicose 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, Fletcher *et al.*, 2002) ao passo que o GLUT-4 realiza o transporte de glicose dependente da ação da insulina (Antonescu, Foti *et al.*, 2009).

Além da clássica função como reservatório lipídico e da regulação do metabolismo intermediário, o tecido adiposo também está intimamente associado às atividades do sistema imune. O tecido adiposo unilocular, a forma predominante nos adultos, é um tecido

heterogêneo composto por adipócitos maduros e por células da fração estroma-vascular como pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e leucócitos (Cancello, Tordjman *et al.*, 2006; Tilg e Moschen, 2006). Essa grande variedade celular secreta várias substâncias sinalizadoras bioativas chamadas, em conjunto, de adipocinas. Dentre 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, Gee *et al.*, 2009).

A leptina foi a primeira adipocina identificada, em 1994, como um fator de saciedade secretado pelo tecido adiposo. Desde então, tem-se reconhecido um papel essencial dessa adipocina no controle da homeostase energética (Zhang, Proenca *et al.*, 1994). Ela é sintetizada e secretada principalmente pelos adipócitos, mas também é encontrada na placenta, coração, ovários e endotélio gástrico. A leptina é um hormônio responsável por enviar sinais para o hipotálamo sobre a quantidade de reservas energéticas no organismo. Se há um balanço energético positivo e conseqüente aumento da massa adiposa, ocorre aumento da secreção de leptina que, por meio da atuação da mesma em núcleos hipotalâmicos, atua inibindo o apetite e aumentando o gasto energético por meio da indução da maior taxa de oxidação lipídica (Yingzhong, Droma *et al.*, 2006). Os níveis de leptina no sistema circulatório também estão aumentados após as refeições e este aumento se dá devido à estimulação direta da expressão gênica e/ou da secreção da leptina do tecido adiposo pela glicose e insulina (Flier, Harris *et al.*, 2000). Na obesidade, está bem estabelecido que os níveis de leptina estão aumentados (Ahima, Qi *et al.*, 2006) e este aumento é devido à adiposidade corporal, uma vez que há uma correlação positiva entre os níveis de leptina e de tecido adiposo.

A partir da descoberta da leptina, outras adipocinas foram sendo descritas, dentre elas algumas citocinas como o TNF- α . A produção desta 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 (Coppack, 2001; Hsieh, Lu *et al.*, 2010). Os macrófagos são os principais responsáveis pela secreção de TNF- α no tecido adiposo. Existem evidências de que o TNF- α reduz a captação de glicose pelos adipócitos pela inibição da expressão do GLUT-4 nestas células (Lumeng, Deyoung *et al.*, 2007). Além disso, o TNF- α também induz a expressão de várias citocinas inflamatórias nos adipócitos, incluindo IL-6, MCP-1 e o próprio TNF- α (Wang e Trayhurn, 2006).

A IL-6, uma outra adipocina, apresenta concentração 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, Sandqvist *et al.*, 2004). Apesar dos adipócitos serem capazes de secretar IL-6, a maior parte desta citocina no tecido adiposo é proveniente das células do estroma vascular em humanos (Fain, Madan *et al.*, 2004). Adipócitos tratados com essa citocina secretam maiores quantidades de ácidos graxos livres e glicerol *in vitro*, ou seja, a IL-6 apresenta efeito lipolítico no tecido adiposo (Petersen, Carey *et al.*, 2005). Além dos efeitos metabólicos, altas concentrações plasmáticas de IL-6 foram correlacionadas à diminuição da ingestão alimentar e emagrecimento em um modelo experimental de colite (Melgar, Bjursell *et al.*, 2007; Morisset, Huot *et al.*, 2008).

A quimiocina MCP-1/CCL-2 também é secretada no tecido adiposo e sua produção é aumentada pela leptina (Wozniak, Gee *et al.*, 2009). Essa quimiocina desempenha 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 (Suganami, Nishida *et al.*, 2005; Kanda, Tateya *et al.*, 2006).

A resistina, que é secretada principalmente por adipócitos, é membro da família de proteínas secretórias ricas em cisteína, descoberta recentemente, chamada “*resistin-like molecules*” (Steppan e Lazar, 2004). Vários estudos demonstram que estímulos inflamatórios levam à produção desta adipocina (Stofkova, 2010). Apesar de ser expressa e secretada em indivíduos magros, níveis elevados desta adipocina estão associados à obesidade tanto em humanos como em modelos experimentais (Alonso, Fernandez *et al.*, 2005). Além disso, ela é responsável pelo aumento das concentrações de glicose e insulina no sangue (Spindler, 2005).

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 que expressam CD4⁺Foxp3⁺ responsáveis pela secreção local de IL-10 em altas concentrações (Feuerer, Herrero *et al.*, 2009).

Outra adipocina anti-inflamatória secretada pelo tecido adiposo é a adiponectina. A adiponectina foi descrita primeiramente em 1995 e é considerada como a proteína mais abundante produzida pelo tecido. A esta adipocina são atribuídos vários efeitos, como a inibição da produção TNF- α , aumento da sensibilidade a insulina, fator protetor para doenças cardiovasculares e efeitos moduladores de NF-kB (Yamauchi, Kamon *et al.*, 2002). As

atividades anti-inflamatórias da adiponectina podem inibir a produção de IL-6, acompanhados por indução de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e do antagonista de receptor de IL-1.

A grande diversidade de células imunes presente no tecido adiposo e a diversidade de adipocinas secretadas por esse sítio denota a inter-relação entre o sistema imune e metabólico. De fato, durante a ocorrência de um processo inflamatório o metabolismo do tecido adiposo responde à constante necessidade de energia requerida para manter a função das células imunes. Por outro lado, durante a sobrecarga ou privação de energia as células imunes profissionais são recrutadas para o tecido adiposo. A mobilização 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, Burmester *et al.*, 2003; Straub, Cutolo *et al.*, 2010). Dessa forma, a resposta inflamatória necessita de suporte metabólico e de redistribuição de energia, o que justifica a mobilização dos estoques de carboidratos e lipídios.

A glicose circulante é utilizada durante a resposta inflamatória como substrato para as células imunes. A captação de glicose é um fator limitante, por exemplo, para ativação dos linfócitos T (Jacobs, Herman *et al.*, 2008; Wofford, Wieman *et al.*, 2008). Da mesma forma, a hidrólise dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo disponibiliza ácidos graxos para a circulação 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, Cutolo *et al.*, 2010).

Um outro indicativo da inter-relação entre o tecido adiposo e as respostas inflamatórias é o fato de que a maioria dos linfonodos está envolvida por tecido adiposo. Após a ativação dos linfonodos por estímulo pró-inflamatório, ocorre aumento da lipólise nos depósitos lipídicos que circundam esses órgãos. Portanto, sugere-se que o tecido adiposo associado aos linfonodos representa uma importante fonte energética para as células do sistema imune (Gambero, Marostica *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, Marostica *et al.*, 2007). Conforme relatado anteriormente, 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, Carey *et al.*, 2005).

Dessa forma, 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, o que resultaria na perda de peso corpóreo após a ingestão do antígeno. Devido à forte associação entre desordens metabólicas e inflamação no tecido adiposo visceral, é importante elucidar como e porque o tecido adiposo torna-se inflamado na condição de alergia alimentar e avaliar se esta inflamação poderia resultar em alterações sistêmicas.

Conforme relatado anteriormente, todas as alterações metabólicas em nosso modelo de alergia alimentar foram analisadas somente após 7 dias de consumo do antígeno. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar, desde o primeiro dia de consumo do antígeno, o desenvolvimento das alterações imunológicas e metabólicas no modelo experimental de alergia alimentar à ovalbumina e analisar neste contexto as consequências provocadas pela ingestão continuada de OVA em animais previamente sensibilizados.