

**Ana Cristina Gomes Santos**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ALERGIA ALIMENTAR E  
ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2007

**Ana Cristina Gomes Santos**

# **ASSOCIAÇÃO ENTRE ALERGIA ALIMENTAR E ATEROSCLEROSE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite

Co-orientadora: Dra. Denise Carmona Cara

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2007

*Aos anjos de minha vida: vovó Ana e mamãe Beth.*

*Amor eterno.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Márcio e Beth, por me ensinarem a viver, a ter força e alegria sempre diante de qualquer situação e pelo apoio a cada segundo de minha caminhada enquanto pessoa. Nem a distância é capaz de separar quando o sentimento é forte demais.

À minha orientadora Jacqueline Alvarez Leite por contribuir com minha formação como pesquisadora e pelo apoio, carinho, dedicação e confiança durante esses anos no laboratório.

À minha co-orientadora Denise Carmona Cara pelo incentivo e alegria com a pesquisa vibrando sempre a cada resultado.

Ao laboratório de Bioquímica Nutricional (LABIN), minha segunda casa, durante todo esse tempo...

Ao laboratório NIPE, em especial à Luana, Maria Letícia, Maria e Mirna por me receberem de braços abertos e por me ajudarem nos experimentos. Muito obrigada!

Às minhas chefinhas Lu Potugal e Lu Fernandes que trouxeram calma e união ao LABIN.

À Érica Leandro, por me auxiliar nos experimentos e ser minha professora de intestino além de amiga, principalmente.

À Tatiana Fonseca, por compartilhar comigo os medos, os sonhos e os longos dias no micrótomo.

À Juliana Lauar, Jubs, pela ajuda com o colágeno e com as imagens de coração e por ser minha nova parceira e amiga.

Aos meus alunos de iniciação científica: Carol, Aline e Diego pela ajuda e colaboração. Crescemos juntos...

À Sabrina, Dani, Luciano, Maysa, Ana Cecília, Luís e Alexandre pela excelente convivência.

À Maria Helena por cuidar tão bem de nossos camundongos e por fazer de cada encontro uma festa!

Ao Rodrigo Guabiraba por me divertir no corredor, sempre!

Aos meus irmãos, Juliana e Gustavo, pela amizade, ajuda e gargalhadas diárias.

À tia Tereza, fada madrinha, Nanda, Tio Josef e Gigi: minha família que eu amo! Em especial a Melinha que me mostrou o caminho da Federal.

Ao meu amor, amigo e conselheiro, Rodrigo, que tanto me incentivou, me ajudou, me aturou...Obrigada por me trazer domingos e feriados na Federal!

Ao Enemir, meu tutor do PET, e ao Thiago Rennó que me colocaram na carreira científica.

Ao Impar, em especial à Eneida e Soraia que sempre me receberam com um sorriso estampado no rosto em meio à nossa correria.

Às minhas amigas do peito e de todas as horas: Gabi e Mari Braga.

Aos professores da Pós Graduação em Ciência de Alimentos. Um obrigada especial ao Valbert, Virgílio e Roberto pelo incentivo, conselhos e conversas.

À Úrsula e Marilene pela ajuda em todos os momentos.

À todos que contribuíram com meu trabalho, com a minha formação ou com um sorriso...  
Meu muito obrigada!

*A Ciência, a ciência, a ciência...*

*Ah, como tudo é nulo e vão!*

*A pobreza da inteligência*

*Ante a riqueza da emoção!*

*Aquela mulher que trabalha*

*Como uma santa em sacrifício,*

*Com quanto esforço dado ralha!*

*Contra o pesar, que é o meu vício!*

*A Ciência! Como é pobre e nada!*

*Rico é o que alma dá e tem.*

*Fernando Pessoa, "Obra poética".*

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	X
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIII
1- INTRODUÇÃO .....	14
1.1-Objetivo Geral.....	16
1.2-Objetivos Específicos .....	16
2-REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 – Alergia alimentar .....	19
2.2-Modelo de alergia alimentar experimental.....	24
2.3 - Transporte de lipoproteínas.....	25
2.4 - Patogênese da Aterosclerose.....	30
2.5 - Aterosclerose em modelos murinos .....	38
2.6– Associação entre doenças inflamatórias e aterosclerose.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 - Animais e dieta .....	43
3.2 – Protocolo de imunização.....	43
3.3 - Amostras de sangue.....	44
3.4 - Determinação dos anticorpos IgE específicos anti-ova séricos .....	45
3.5 - Determinação dos anticorpos IgG1 específicos anti-ova séricos.....	45
3.6- Avaliação morfológica do intestino .....	46
3.7 - Determinação das concentrações de colesterol total sérico .....	46
3.8 - Determinação das concentrações de colesterol em HDL e frações aterogênicas ....	47
3.9 - Determinação das concentrações de triacilgliceróis séricos .....	48
3.10 - Quantificação das concentrações de lipídeos hepáticos.....	48
3.11 - Quantificação das concentrações de lipídeos cecais .....	49
3.12 - Avaliação da peroxidação lipídica pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	49
3.13 - Separação da LDL utilizada para determinação de anticorpos anti-LDL oxidada...	49
3.14 - Quantificação das Imunoglobulinas Anti - LDL Oxidada .....	50

3.15 - Quantificação da deposição lipídica na aorta torácica e abdominal.....	51
3.16 - Avaliação das lesões ateroscleróticas na raiz aórtica .....	51
3.17 - Avaliação do infiltrado inflamatório na raiz aórtica .....	52
3.18- Quantificação do colágeno nas lesões ateroscleróticas.....	52
3.19- Análises estatísticas .....	52
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
4.1- Confirmação e comparação do modelo de alergia alimentar experimental em camundongos C57BL/6 e LDLr/- .....	54
4.1.1- <i>Quantificação dos anticorpos IgE e IgG1 anti-ovalbumina.....</i>	54
4.1.2- <i>Controle das ingestões da solução de clara de ovo e da dieta, dos pesos corpóreo e de gordura abdominal. ....</i>	55
4.1.3- <i>Análise histológica do intestino.....</i>	58
4.2- Avaliação do efeito da alergia alimentar crônica no metabolismo e perfil lipídico em camundongos .....	59
4.2.1- <i>Análise do perfil lipídico.....</i>	59
4.2.2- <i>Análise do metabolismo lipídico .....</i>	62
4.3- Determinação do efeito da alergia alimentar no estresse oxidativo em camundongos susceptíveis para a aterosclerose. ....	63
4.4- Estudo da alergia alimentar na aterogênese em camundongos C57BL/6 e LDLr/- .	64
4.4.1- <i>Camundongos C57BL/6 .....</i>	64
4.4.2- <i>Camundongos LDLr/- .....</i>	66
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6- SUMÁRIO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>79</b>
<b>7 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>98</b>
Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais - CETEA .....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores de Risco para Aterosclerose.....	31
Tabela 2: Composição da dieta padrão .....	43
Tabela 3: Lipídeos e colesterol do fígado e do ceco. ....	62

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos celulares em resposta à alergia alimentar.....	23
Figura 2 - Passos seqüenciais na via do receptor de LDL.....	28
Figura 3: Metabolismo de lipoproteínas.....	29
Figura 4: Infiltração da LDL na artéria e formação de célula espumosa.....	33
Figura 5: Papel do macrófago na inflamação da artéria.....	35
Figura 6: Efeito das células T ativadas na inflamação da placa aterosclerótica.....	36
Figura 7: Protocolo de imunização.....	44
Figura 8: Anticorpos IgE anti-ovalbumina.....	54
Figura 9: Anticorpos IgG1 anti-ovalbumina.....	55
Figura 10: Razão do consumo líquido da solução de clara de ovo a 20% pelo peso corpóreo.....	56
Figura 11: Peso corporal dos camundongos ao longo das 8 semanas de experimento ...	57
Figura 12: Razão do peso da gordura abdominal pelo peso corpóreo.....	57
Figura 13: Aspecto histológico do jejuno proximal de camundongos controles e sensibilizados com ovalbumina.....	58
Figura 14: Colesterol sérico total de camundongos C57BL/6.....	60
Figura 15: HDLc, Frações aterogênicas, Relação Colesterol sérico/HDLc e Triacilgliceróis de camundongos C57BL/6.....	60
Figura 16: Colesterol sérico total de camundongos LDLr-/-. .....	61
Figura 17: HDLc, Frações aterogênicas, Relação Colesterol sérico/HDLc e Triacilgliceróis de camundongos LDLr-/-. .....	61
Figura 18: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado de camundongos LDLr-/-. .....	63
Figura 19: Anticorpos anti-LDL oxidada de camundongos LDLr-/-. .....	63
Figura 20: Imagens da superfície interna de aortas torácica e abdominal de camundongos C57BL/6.....	65
Figura 21: Raiz aórtica de camundongos C57BL/6.....	65
Figura 22: Lesões ateroscleróticas na aorta torácica e abdominal de camundongos LDLr/-.....	67
Figura 23: Lesão aterosclerótica na raiz aórtica de camundongos LDLr-/-. .....	67
Figura 24: Infiltrado inflamatório na área de lesão aterosclerótica e musculatura adjacente de camundongos LDLr-/-. .....	68
Figura 25: Área de colágeno na raiz aórtica de camundongos LDLr/- .....	68
Figura 26: Aspecto histológico da raiz aórtica de camundongos LDLr/- .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetros
ACAT	Acil CoA colesterol acil transferase
AIN	Instituição Americana de Nutrição
APC	Célula apresentadora de antígeno
Apo	Apolipoproteína
Apo E-/-	Deficiência para apo E
CAM	Molécula de adesão celular
CD	Domínio citoplasmático
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
cm	Centímetros
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
g	grama
H&E	Hematoxilina e eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDLc	Colesterol em HDL
dL	Decilitros
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A redutase
HSP	Proteína de choque térmico
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
Ig	Imunoglobulina
KD	Quilodáton
Kg	Quilogramas
IL	Interleucina
LCAT	Lecitina: colesterol acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLr	Receptor de LDL
LDLr -/-	Deficiência para o receptor de LDL
LLP	Lipase lipoprotéica
MCP	Proteína quimiotática para monócitos

MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mg	Miligramas
mL	Mililitros
Mm LDL	LDL minimamente oxidada
N	Normal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NK	Células matadoras naturais
nm	Nanômetros
°C	Grau centígrado
OPD	Ortofenileno-diamino
OVA	Ovalbumina
PBS	Salina tamponada com fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
QM	Quilomícron
rpm	Rotações por minuto
SR	Receptor <i>scavenger</i>
TCR	Receptor de célula T
TGF	Fator de transformação e crescimento
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidades
UA	Unidades Arbitrárias
V	Volume
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

## RESUMO

A aterosclerose é vista hoje como doença inflamatória crônica. Recentemente, rinites alérgicas e asma têm sido relacionadas com risco aumentado para aterosclerose em humanos. Paradoxalmente, aterosclerose é uma doença com predominância de resposta Th1, enquanto em alergias as respostas Th2 são dominantes. A associação entre alergia alimentar e aterosclerose, no entanto, ainda deve ser definida. Para investigar tal associação, utilizamos camundongos C57BL/6 e camundongos deficientes para o receptor de LDL alimentados com dieta aterogênica. A alergia alimentar foi induzida pela ingestão de solução de clara de ovo por camundongos previamente sensibilizados com ovalbumina. O grupo controle não foi sensibilizado. A alergia foi confirmada pela alta produção dos anticorpos IgE e IgG1 anti-ovalbumina e aversão à solução de clara de ovo nos camundongos alérgicos, sem que houvesse injúria intestinal. No entanto, camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alérgicos apresentaram redução de IgE ao término do experimento quando comparado ao tempo inicial e menor aversão do que camundongos C57BL/6 alérgicos. Esses perdem gordura abdominal enquanto em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> não foi vista diferença. Os resultados sugerem que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> são mais resistentes ao modelo de alergia do que camundongos C57BL/6. Foi observado perfil lipídico pró-aterogênico com redução de HDL em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> e C57BL/6 sensibilizados. Além disso, a deposição lipídica na aorta abdominal e torácica, a área, composição da placa aterosclerótica e o *status* oxidativo não foram afetados em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alérgicos. Em conclusão, a alergia alimentar levou a um perfil lipídico pró-aterogênico, sem alterar o estresse oxidativo e o tamanho da lesão em camundongos C57BL/6 e deficientes para o receptor de LDL.

Palavras chave: aterosclerose, alergia alimentar, metabolismo lipídico, LDLr nocaute.

## ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease. Recently, Allergic Rhinitis and Asthma have been linked with enhanced risk for atherosclerosis in humans. Paradoxically, atherosclerosis is a Th1-cell- driven disease while, in allergies, Th2- type cell responses are dominant. To investigate the effect of food allergy in this process and in lipid profile, C57BL/6 and low density lipoprotein receptor deficient mice were fed atherogenic diet. The food allergy was induced in ovalbumin-sensitized mice by the egg-white solution intake. The control group was not sensitized. Allergy was confirmed by the high production of anti-ovalbumin IgE as well as anti-OVA IgG1 antibodies in both mice strain, without intestinal injury detection. However, LDLr<sup>-/-</sup> allergic mice had reduced IgE level of oral challenger to the end of the experiment and less aversion compared to C57BL/6 allergic mice. This mice lost abdominal fat while in LDLr<sup>-/-</sup> was not seen difference. The results suggest that LDLr<sup>-/-</sup> was more resistant of food allergy model than C57BL/6 mice. C57BL/6 and LDLr<sup>-/-</sup> sensitized mice had a pro-atherogenic profile associated to HDL reduction. Lipid deposition in thoracic and abdominal aorta, area and composition of atherosclerotic plaque and oxidative stress marker were not affect in LDLr<sup>-/-</sup> allergic mice. In conclusion, the food allergy was able to alter the lipid profile without affecting the oxidative stress and the atherogenesis in C57BL/6 and LDLr<sup>-/-</sup> mice.

Key words: atherosclerosis, food allergy, lipids metabolism, LDLr Knockout.

## **1- INTRODUÇÃO**

Uma pessoa que vive em uma sociedade ocidental ingere, em média, de 2 a 3 toneladas de alimentos em sua vida (SAMPSON, 1999a). Do total de nutrientes ingeridos, cerca de 20% são de proteínas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), um adulto saudável deve ingerir para cada quilograma do seu peso corpóreo, 0,8 g de proteínas. Esta recomendação leva em consideração o papel estrutural e energético das proteínas.

Aproximadamente 30 quilos de proteínas alimentares encontram o intestino humano durante um ano e de 130 a 190 gramas de proteínas são absorvidas diariamente (BRANDTZAEG, 1998). No entanto, as proteínas podem escapar ou resistir à digestão e passar para o lúmen intestinal em uma forma intacta, acarretando uma resposta imunológica que pode desencadear um quadro de alergia alimentar (UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2006).

A alergia alimentar é uma resposta adversa às proteínas alimentares sendo uma doença inflamatória crônica que acomete o intestino, prevalente em crianças. Os alimentos que mais comumente provocam alergia são: leite de vaca, ovos, soja, trigo, amendoim, peixes, castanhas e crustáceos (BOCK, 1986).

Em 2004, Saldanha e colaboradores descreveram um modelo de alergia alimentar experimental utilizando camundongos BALB/c. Esses animais foram previamente sensibilizados com um antígeno presente na clara de ovo, a ovalbumina, e novamente entravam em contato com o alérgeno por via oral. Observou-se que além da produção de imunoglobulinas E específicas para o antígeno e uma suave inflamação na mucosa intestinal, os camundongos perdiam peso.

Em 2006, Moreira investigou a perda de peso observada em camundongos alérgicos. A suplementação protéica da solução de clara de ovo foi substituída por dieta balanceada contendo clara de ovo liofilizada como única fonte protéica. No entanto, os animais continuavam perdendo peso. Foi levantada a hipótese de que o emagrecimento ocorria devido às alterações metabólicas causadas pela reação de hipersensibilidade imediata. Além disso, uma das alterações notadas foi o aumento de colesterol no fígado dos camundongos com alergia alimentar. Essas alterações podem predispor a outras condições patológicas tais como a aterosclerose.

A aterosclerose é uma doença cardiovascular que tem como origem primária alterações no metabolismo de lipídeos e a conseqüente hiperlipidemia (ROSS, 1999). A

doença está fortemente associada a um estado inflamatório que pode ser perpetuado por uma infecção ou por outra doença inflamatória (MAGEN *et al.*, 2005).

Tanto a alergia alimentar como a aterosclerose apresentam um forte componente imunológico envolvido. Mas as respostas imunológicas de cada patologia são opostas. Na aterosclerose, há prevalência de uma resposta Th1 (NICOLETTI *et al.*, 2000; BUONO *et al.*, 2005), enquanto na alergia alimentar ocorre uma reação de hipersensibilidade imediata com resposta Th2 (UNTERSMAYR e JENSEN-JAROLIM, 2006). A associação entre alergia alimentar e aterosclerose ainda não foi evidenciada. Porém, estudos recentes demonstraram a associação entre alergias respiratórias e aterosclerose em estudos epidemiológicos (KNOFLACH *et al.*, 2005; ONUFRAK *et al.*, 2006).

Este estudo visa investigar o efeito da alergia alimentar na aterosclerose em um modelo de camundongo LDLr nocaute.

## 1.1-Objetivo Geral

Avaliar o efeito da alergia alimentar crônica na aterogênese, no metabolismo lipídico e estresse oxidativo em camundongos C57BL/6 e deficientes para o gene do receptor de LDL.

## 1.2-Objetivos Específicos

- ✓ Constatar a indução da alergia alimentar experimental por meio da dosagem de anticorpos séricos IgE e IgG1 específicos anti-ovalbumina no soro dos camundongos.
- ✓ Averiguar o modelo de alergia alimentar nos camundongos deficientes para o gene do receptor de LDL com relação aos seguintes parâmetros: concentrações de imunoglobulinas séricas, ingestão da solução de clara de ovo, peso corpóreo, peso de gordura abdominal e histologia do intestino quando comparado a camundongos selvagens.
- ✓ Avaliar o efeito da alergia alimentar crônica no metabolismo lipídico hepático e cecal e nas concentrações séricas de colesterol total, triacilgliceróis, de HDLc e

das frações aterogênicas em camundongos C57BL/6 e deficientes para o gene do receptor de LDL.

- ✓ Determinar o efeito da alergia alimentar no estresse oxidativo por meio da mensuração da peroxidação lipídica no fígado e da quantificação indireta da oxidação de lipoproteínas LDL nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.
  
- ✓ Pesquisar se a alergia alimentar é capaz de alterar a aterogênese na aorta torácica e abdominal e no sinus aórtico em camundongos C57BL/6 e LDLr<sup>-/-</sup> e se essa afeta o número de células inflamatórias e a estabilidade da placa por meio da medida de deposição de colágeno em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

## **2-REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 – Alergia alimentar

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imunológica adversa às proteínas alimentares que afeta em torno de 6% das crianças e de 3 a 4% dos adultos (SICHERER e SAMPSON, 2006).

Os alimentos que comumente provocam alergia são: leite de vaca, ovos, soja, trigo, amendoim, peixes, castanhas e crustáceos (BOCK, 1986). A maioria dos alérgenos alimentares são glicoproteínas solúveis em água, com tamanho de 10 a 70 KD que são estáveis ao calor, ácido e a proteases (BREITENEDER e MILLS, 2005).

As reações alérgicas aos alimentos podem afetar a pele, causando urticária e angioedema, o trato respiratório, ocasionando rinite e asma, o trato gastrointestinal, provocando diarreia, vômito e cólica e o sistema cardiovascular acarretando choque anafilático (SICHERER, 2002). Essas reações alérgicas podem aparecer em poucos minutos ou horas após a ingestão do alimento. Os sintomas variam dependendo da idade do indivíduo, do alérgeno envolvido, da quantidade de alimento ingerido, dentre outros fatores (BURKS *et al.*, 1998).

O trato gastrointestinal é o sítio de absorção de nutrientes e de defesa contra antígenos sendo a maior parte do sistema imunológico. Este não somente captura mais antígenos do que qualquer outra parte do corpo, como também discrimina organismos invasivos de antígenos próprios como proteínas alimentares e bactérias comensais (MOWAT, 2003).

Aproximadamente 30 quilogramas de proteínas alimentares encontram o intestino humano durante um ano. Diariamente, são absorvidas de 130 a 190 gramas de proteínas (BRANDTZAEG, 1998). As proteínas são assimiladas de modo eficiente após a ação de enzimas gástricas, pancreáticas e outras proteases, o que resulta na redução da maioria das proteínas da dieta a uma mistura de aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos que podem ser absorvidos pelas células epiteliais intestinais (ERICKSON e KIM, 1990). Oligopeptídeos com 8 aminoácidos ou menos não reagem com o MHC, sendo, então, ignorados pelo sistema imunológico. No entanto, as proteínas podem escapar ou resistir à digestão e passar para o lúmen intestinal em uma forma intacta (UNTERSMEYR e JENSEN-JAROLIM, 2006).

Os antígenos podem entrar na lâmina própria intestinal através das células M e após serem reconhecidos pelas células dendríticas, são apresentados a linfócitos T nas placas de Peyer. Alternativamente, esses antígenos ou células dendríticas provenientes das placas de Peyer podem ter acesso a linfonodos drenantes com subsequente

reconhecimento pelas células T nos linfonodos mesentéricos. Outra forma de entrada do antígeno seria através das células epiteliais. Neste caso, existe a possibilidade dos enterócitos expressarem MHC de classe II agindo como células apresentadoras de antígeno (APCs) locais. Nos dois casos, as células T CD4<sup>+</sup> reativas expressam integrinas  $\alpha 4\beta 7$  e receptor de quimiocina CCR9, abandonam os linfonodos mesentéricos e se dirigem para os ductos linfáticos eferentes ganhando então, a circulação sanguínea através do ducto torácico e retornando para a mucosa intestinal por meio de veias da lâmina própria. As células T que reconhecem antígenos nos linfonodos mesentéricos podem se disseminar diretamente para a corrente sanguínea através do sistema imunológica periférico. Os antígenos também podem ter acesso direto à corrente sanguínea no intestino e interagir com as células T nos tecidos linfóides periféricos (MOWAT, 2003).

Na grande maioria das vezes, a resposta imunológica às proteínas da dieta leva à tolerância oral. No entanto, pode ocorrer hipersensibilidade alimentar, dependendo da comunicação de numerosas células imunocompetentes e de como e onde esse antígeno é apresentado a essas células (UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2006). A tolerância oral se refere a um estado de inibição ativa da resposta imunológica à antígenos provenientes do trato oral (CHEHADE e MAYER, 2005). Essa pode ser induzida em camundongos após a administração de altas doses do antígenos, poucas vezes, induzindo a anergia de linfócitos, ou de repetidas pequenas doses (FRIEDMAN e WEINER, 1994) que são mediadas pelas células T reguladoras em adição às células T CD8<sup>+</sup> supressoras. Alguns fatores estão envolvidos na indução da tolerância oral. Dentre estas variáveis estão incluídos a genética, a idade, a estrutura antigênica e a composição das proteínas alimentares, a integridade da barreira epitelial e o grau de ativação do sistema imunológica que é dependente do perfil de citocinas e da expressão de células co-estimulatórias pelas APCs da mucosa (BRANDTZAEG, 2002).

Uma falha nos mecanismos da tolerância oral resulta em hipersensibilidade alimentar (Figura 1-A) (CHEHADE e MAYER, 2005). Esta resposta imunológica adversa aos alimentos pode ser dependente de IgE ou não. O desenvolvimento de uma resposta mediada por IgE a um alergênico é resultado de uma série de interações moleculares e celulares envolvendo APCs, células T e células B. As APCs apresentam pequenos fragmentos de peptídeos em conjunto com as moléculas de MHC de classe II às células T. Estas células ligam o TCR ao complexo peptídeo-MHC (Figura 1-B). Esta interação,

conhecida como "primeiro sinal", leva à proliferação de células T e à geração de citocinas que promovem o "segundo sinal", que por fim, leva à ativação de células Th2 (Figura 1-C). Os linfócitos Th2 e as citocinas liberadas por esses ativam linfócitos B específicos para os antígenos alergênicos (Figura 1-D). Sob a influência do ligante CD40 e de citocinas, principalmente IL-4, os linfócitos B sofrem a troca de isotipo de IgM para IgE (Figura 1-E)(FULEIHAN, 1998). Os anticorpos IgE específicos para o antígeno se ligam aos receptores de superfície de mastócitos, basófilos, macrófagos e outras APCs, armando o sistema imunológica para a reação alérgica que ocorrerá no próximo contato com esse antígeno específico (Figura 1-F) (SAMPSON, 1999b).

Em uma nova exposição ao antígeno, ocorre a ligação cruzada entre o antígeno e a IgE ligada aos mastócitos com conseqüente degranulação e secreção de mediadores pré-formados como histamina, enzimas e fatores quimiotáticos (Figura 1-G). Prostaglandinas e leucotrienos são formados no momento da degranulação. Esses mediadores são responsáveis pelos sintomas das reações alérgicas. Histamina, prostaglandinas e leucotrienos promovem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. Fatores quimiotáticos atraem eosinófilos que liberam outros mediadores prolongando a resposta alérgica (Figura 1-H) (ANDERSON, 1997; FULEIHAN, 1998).

A alergia alimentar conduz, portanto, a uma hiper atividade imunológica e a um quadro inflamatório (BUFE, 1998). As citocinas Th2 influenciam uma variedade de eventos associados com a inflamação alérgica crônica. IL-4 e IL-13 estimulam a produção de IgE e o aumento da expressão das moléculas de adesão celular (VCAM-1) seletivas para eosinófilos/basófilos. IL-5 e IL-9 induzem a maturação de eosinófilos. IL-3 e IL-9 promovem o desenvolvimento de mastócitos. IL-4, IL-9 e IL-13 aumentam a produção de muco pelas células caliciformes da mucosa (KAY, 2000).

Nas últimas duas ou três décadas, a prevalência de doenças alérgicas vêm aumentando consideravelmente, principalmente nos países industrializados. A ligação entre o aumento da incidência de alergias e o moderno estilo de vida com hábitos de higiene foi inicialmente sugerido, embazando a então, denominada, hipótese da higiene (YAZDANBAKHSI *et al.*, 2002).

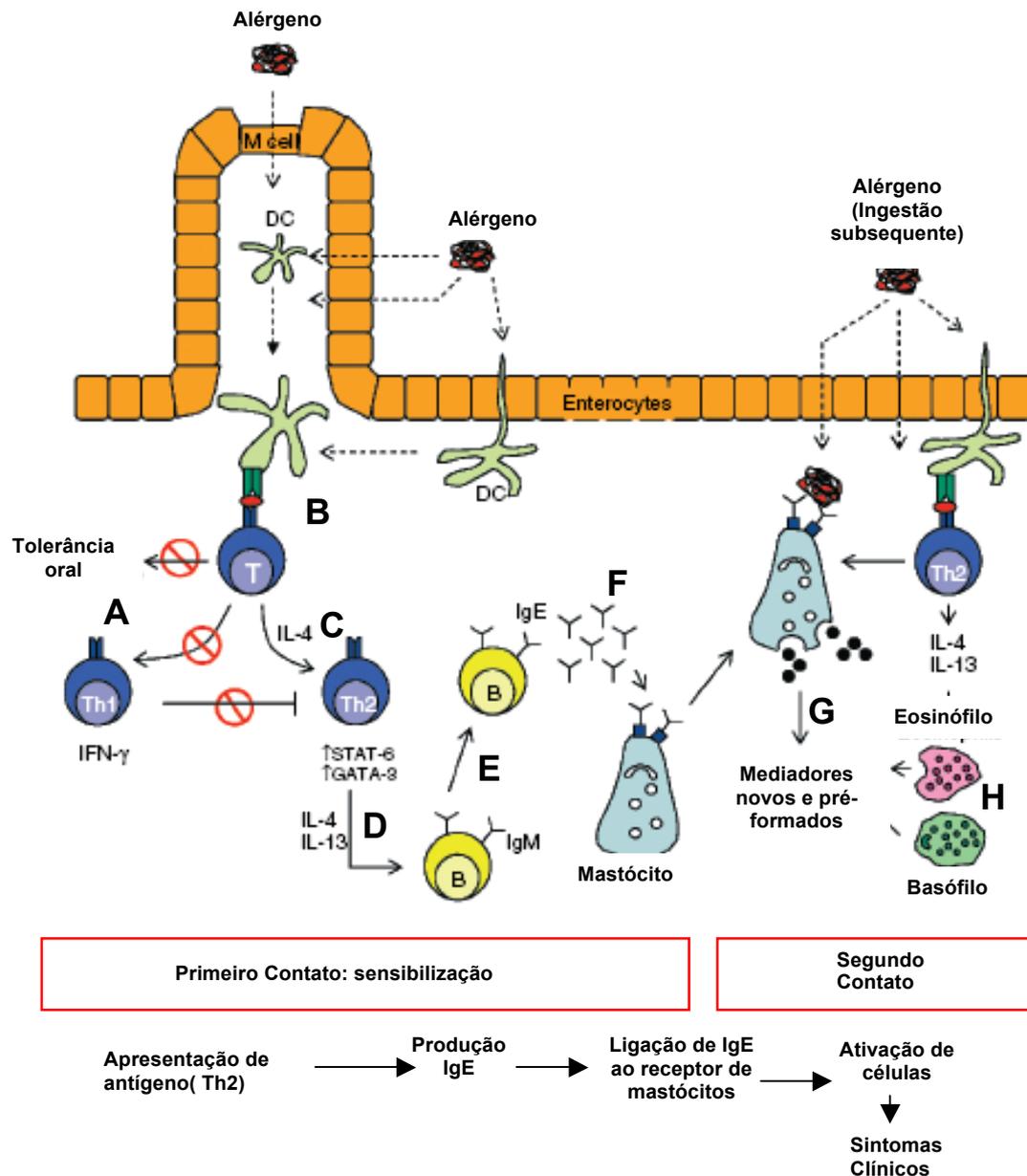
Sintomas das reações alérgicas são conseqüências da resposta Th2. O balanço entre respostas Th1 e Th2 foi considerada central para a homeostase do sistema imunológico. Inicialmente, assumiu-se que o aumento da higiene resulta em diminuição da

exposição a microorganismos, que induzem a atividade de células Th1. Essa resposta poderia então, contra regular a resposta Th2. Tal desbalanço imunorregulatório, no entanto, não explica o simultâneo aumento da incidência de distúrbios imunológicos como doença de Crohn's, diabetes tipo 1 e esclerose múltipla, todas direcionadas para uma resposta Th1 (GUARNER *et al.*, 2006).

A decisão em gerar uma resposta imunológica sistêmica, com o potencial de causar um dano no tecido ou inflamação ou uma resposta tolerogênica parece ser determinada pelo impacto dos antígenos nas APCs e células T. Células TCD4<sup>+</sup> virgens são ativadas por APCs e necessitam de uma co-estimulação apropriada para diferenciação em células Th1 e Th2 com resultante polarização na secreção de citocinas. Em determinadas circunstâncias, as APCs podem induzir vários tipos de células T reguladoras. Através da secreção de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , ou por meio da interação celular direta, células T reguladoras podem suprimir tanto respostas Th1 como Th2 (GUARNER *et al.*, 2006).

Diversos patógenos induzem células da imunidade inata e adaptativa a secretarem altos níveis de citocinas imunossupressivas (IL-10 e TGF- $\beta$ ) (MCGUIRK *et al.*, 2002). Essas citocinas induzem células T reguladoras. Dessa forma, foi sugerido que certos patógenos desenvolvem estratégias para induzir células T reguladoras, de forma a conter a resposta pró-inflamatória e prolongar sua sobrevivência no hospedeiro (HIGGINS *et al.*, 2003).

Recentemente acredita-se que somente distúrbios que envolvem defeito na atividade de células T reguladoras têm sua incidência aumentada em sociedades ocidentais. Indivíduos com predisposição alérgica possuem deficiência na atividade de células T reguladoras (KARLSSON *et al.*, 2004).



**Figura 1: Mecanismos celulares em resposta à alergia alimentar**

Em indivíduos saudáveis, a ingestão de antígenos inócuos leva a uma resposta sistêmica não responsiva (tolerância oral). Em pacientes alérgicos, ocorre a quebra da tolerância oral (A). Em um micro ambiente da mucosa intestinal com predomínio de citocinas Th2, uma resposta Th2 específica para o antígeno é gerada quando fragmentos do antígeno são apresentados às células T virgens por meio de células apresentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas (B). Uma vez ativadas (C), as células TCD4<sup>+</sup> produzem IL-4 e IL-13 (D) que promovem a produção de IgE pelas células B (E). As IgEs se ligam a receptores específicos de células efectoras na alergia como mastócitos (F). Em uma subsequente ingestão, a apresentação de antígeno leva a uma rápida ativação de células T e secreção de citocinas Th2, promovendo a liberação de mediadores por basófilos e eosinófilos. Ao mesmo tempo, fragmentos do antígeno se ligam aos receptores de IgE em mastócitos promovendo a liberação de mediadores químicos pré-formados e levando à síntese de novos mediadores (principalmente histamina), responsável pelos sintomas clínicos (G e H). Fonte: (PRIOULT e NAGLER-ANDERSON, 2005).

## 2.2-Modelo de alergia alimentar experimental

Modelos animais experimentais são utilizados em pesquisas uma vez que fornecem informações sobre a patofisiologia e os mecanismos envolvidos nas doenças. Especialmente em situações clínicas em que os órgãos alvo são inacessíveis, como o trato gastrointestinal no caso da alergia alimentar, esses modelos animais são insubstituíveis (UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2006).

Na indução da alergia alimentar experimental parâmetros como a concentração e duração de exposição do alérgeno, o tipo de alimento que induz a alergia, o uso de adjuvantes, além da idade e predisposição genética do animal frente à alergia, devem ser cuidadosamente escolhidos (HELM e BURKS, 2002).

A utilização de roedores para pesquisas em alergia alimentar apresenta vantagens tais como a variedade de linhagens, além de incluir também animais geneticamente modificados, e a possibilidade de utilização de um grande número de animais. No entanto, a polarização de células T para os fenótipos Th1 e Th2 são mais extremas em roedores quando comparado a humanos (UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2006).

Camundongos BALB/c são a linhagem mais utilizada em modelos de alergia alimentar experimental devido à grande produção de IgE em resposta à sensibilização com antígeno, semelhantes à vista em indivíduos atópicos (DEARMAN e KIMBER, 2005).

Um modelo experimental que representa a situação clínica de pacientes atópicos foi descrito por Saldanha et al., (2004). Nesse modelo, camundongos BALB/c foram previamente sensibilizados com ovalbumina e, posteriormente, receberam clara de ovo "in natura" a 20% como única fonte de consumo líquido durante 3 semanas. Nessa condição de alergia moderada e persistente foi notado aumento dos títulos de anticorpos IgE e IgG1 anti-ovalbumina, edema intestinal e aumento no número de eosinófilos com pico após 48 horas de exposição oral do antígeno. Após 21 dias de contínua ingestão de clara de ovo, as alterações morfológicas foram suaves no intestino com hiperplasia de mastócitos e aumento da produção de muco no local. Além disso, foi notada perda de 20% do peso dos camundongos após uma semana de ingestão de ovalbumina. Essa perda de peso não foi associada a um estado de desidratação ou desnutrição já que as concentrações de albumina e o hematócrito estavam normais (SALDANHA *et al.*, 2004).

Posteriormente, Moreira (2006) investigou se a perda de peso estava relacionada com um desequilíbrio protéico devido à suplementação de proteína contida na solução de

clara de ovo a 20%. No estudo, foi utilizada a dieta padrão para roedores AIN93G, modificada, em que foi substituída a fonte protéica de caseína por clara de ovo liofilizada. Porém, camundongos da linhagem BALB/c continuavam perdendo peso, descartando a hipótese de caquexia devido a um desequilíbrio nutricional. Já em camundongos da linhagem C57BL/6, foi observada a manutenção do peso corpóreo com perda de gordura abdominal (MOREIRA, 2006).

A perda de peso em camundongos alérgicos foi, então, associada a um maior consumo energético devido ao quadro inflamatório sistêmico promovido pela alergia alimentar. Essa reação de hipersensibilidade, além de ocasionar alterações imunológicas, promoveu o aumento de colesterol no fígado de camundongos C57BL/6 e BALB/c sensibilizados (MOREIRA, 2006).

### 2.3 - Transporte de lipoproteínas

O sistema de transporte de lipídeos envolve moléculas hidrofóbicas do sítio de síntese para o sítio de utilização através do plasma. Existem quatro tipos principais de lipídeos circulantes no plasma: colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídeos e triacilgliceróis (GENEST, 2003).

Devido à natureza hidrofóbica de lipídeos, estes são empacotados em partículas esféricas de lipoproteínas (GENEST, 2003). As lipoproteínas são globulares, sendo uma combinação de lipídeos com proteínas específicas. O núcleo da partícula de lipoproteína é composto por triacilglicerídeos e ésteres de colesterol. A membrana é composta por fosfolipídeos, pequena quantidade de colesterol livre e proteínas chamadas apolipoproteínas, todos orientados de modo que suas porções polares estejam expostas na superfície (CHAMPE, 1997).

De acordo com sua origem, composição, densidade e tamanho, as lipoproteínas podem ser classificadas em: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (GOTTO *et al.*, 1986).

As apolipoproteínas (Apo), proteínas componentes das lipoproteínas, são um grupo de proteínas de imensa diversidade estrutural, que conferem estabilidade às partículas de lipoproteínas (apo-B, E, A-I, A-II), bem como o seu direcionamento metabólico, graças à interação com receptores celulares específicos que as reconhecem em células alvo (apo

A-I, B-100, E). Além disso, as Apo atuam como cofatores para as enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas (apo- AI, C-II, C-III) (SEGREST *et al.*, 1992; MACKNESS e DURRINGTON, 1995; GENEST, 2003).

Existem duas funções preponderantes do transporte de lipoproteínas. A primeira é o eficiente transporte de triacilgliceróis do intestino e do fígado para o sítio de utilização (tecido adiposo ou músculo) e, a segunda, o transporte de moléculas de colesterol do tecido periférico para a síntese de membrana ou produção de hormônios esteróides, ou ainda, para a síntese de ácido biliar no fígado (GENEST, 2003).

A maior porção da gordura ingerida está na forma de triacilgliceróis. Depois da ingestão, as gorduras são emulsificadas por sais biliares formando micelas que depois são hidrolisadas por lipases pancreáticas em ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos (GENEST, 2003).

Os quilomicrons transportam os triacilglicerídeos de origem alimentar. São formados no intestino, a partir da digestão das gorduras alimentares e Apo B-48, E, A-1 e C sintetizadas nos enterócitos. A composição, o número e o tamanho dos quilomicrons formados dependem do suprimento e características da dieta. A partícula é rica principalmente em triacilgliceróis. Uma vez sintetizados, os quilomicrons são lançados na linfa intestinal, atingindo a circulação geral através do ducto torácico, sofrendo a ação da enzima lipase lipoprotéica que se encontra aderida à membrana basal das células endoteliais dos capilares sanguíneos (GOLDBERG, 1996).

Sob a ação da lipase lipoprotéica (LLP), os quilomicrons têm os triacilgliceróis hidrolizados, liberando ácidos graxos livres que, quando armazenados, serão utilizados como fonte de energia. As lipoproteínas resultantes, agora de menor tamanho, são denominadas quilomicrons remanescentes e são, então, captadas no fígado por receptores de alta afinidade que possibilitam a utilização do colesterol e dos fosfolídeos fornecidos pela dieta (GENEST, 2003).

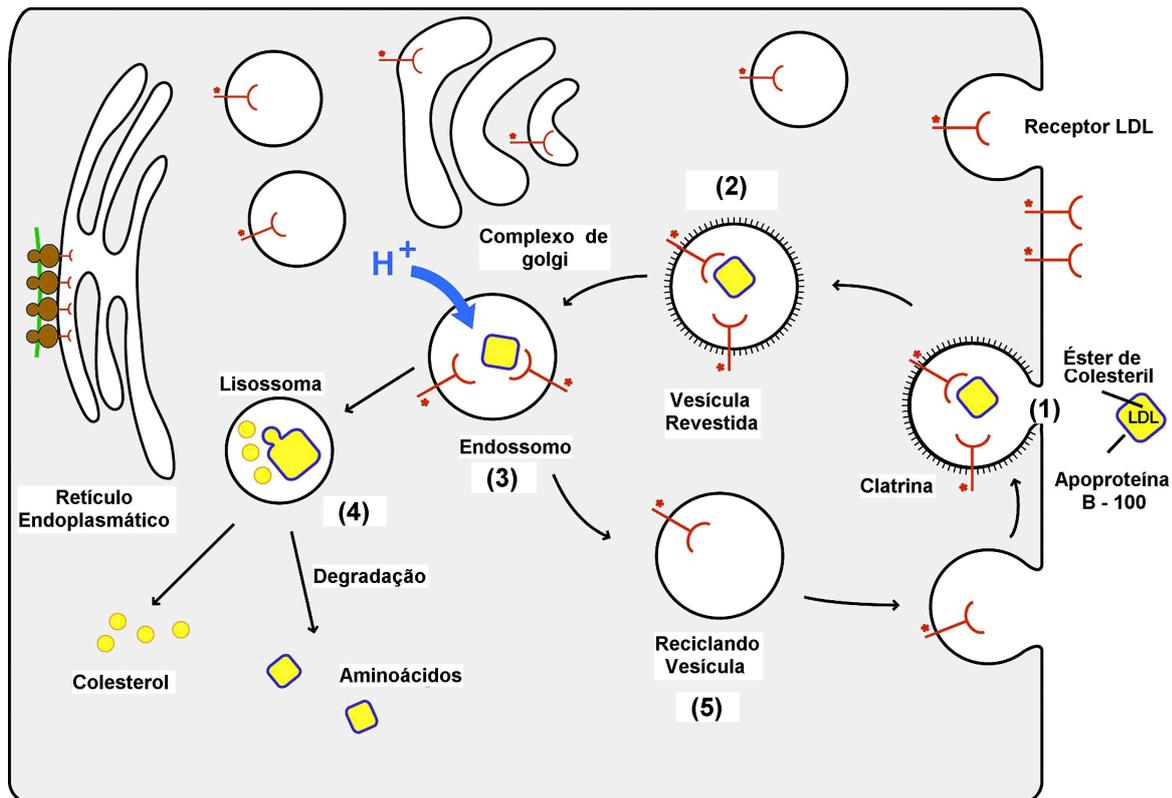
O fígado “re-empacota” os lipídeos e os secreta diretamente no sangue em VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), rica em triacilgliceróis que contém apo B-100 e apo-AI. Estas lipoproteínas adquirem apo C-II e apo E das partículas de HDL circulantes. Nos capilares, as VLDL são hidrolizadas sob a ação da lipase lipoprotéica, da mesma maneira como ocorre com os quilomicrons. As apo C e E são transferidas a HDL. Os ésteres de colesterol são transferidos da HDL para a VLDL em uma reação de troca concomitante em que o triacilglicerol ou fosfolídeo é transferido da VLDL à HDL. Essa

troca é realizada através da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) (CHAMPE, 1997; GENEST, 2003).

Após a hidrólise de triacilgliceróis, as VLDL são denominadas VLDL remanescentes ou IDL e contêm Apo-B100 e Apo-E na sua superfície. Cerca de 50% das partículas de IDL são removidas da circulação pelo fígado, através da ligação de Apo-E com o receptor de remanescentes (receptor de Apo-E) ou da ligação de Apo B-100 ou Apo-E com o receptor de LDL. Os 50% restantes são convertidos em LDL pela lipase lipoprotéica hepática ou transformados em LDL no soro após a perda de Apo-E, dentre outras modificações (ALVAREZ-LEITE, 1993; RADER, 1995).

As partículas de LDL apresentam como componentes o colesterol e a apo-B 100. Normalmente, as LDL contêm apenas de 4 a 8% de sua massa como triacilgliceróis (GENEST, 2003). A função principal das partículas de LDL é fornecer o colesterol aos tecidos periféricos. Isto ocorre através da deposição de colesterol livre nas membranas das células à medida em que entram em contato com a superfície celular e através da ligação aos receptores na superfície das membranas que reconhecem a apo-B 100 (CHAMPE, 1997). A única molécula de Apo B-100 contida na LDL é reconhecida tanto nos tecidos extra-hepáticos quanto no fígado pelos receptores de LDL (ALVAREZ-LEITE, 1995).

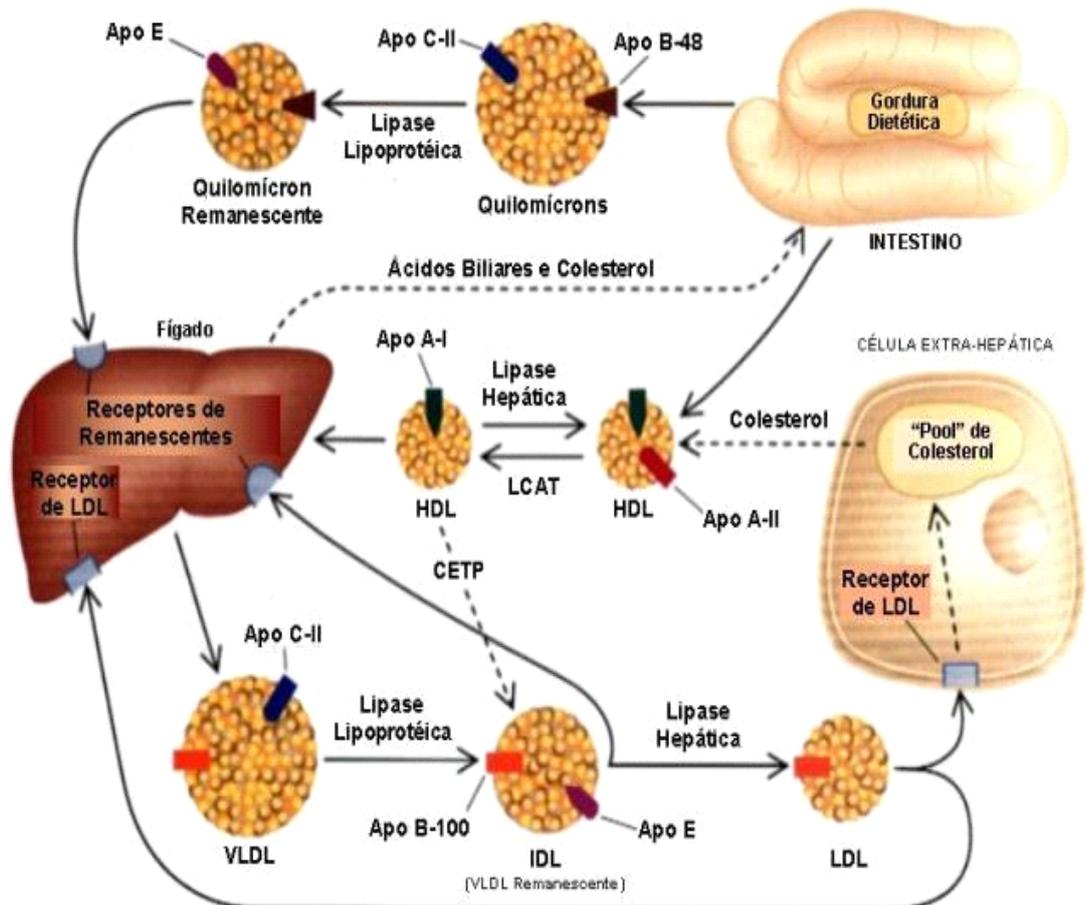
Os receptores de LDL são agrupados em fendas nas membranas celulares. O lado interno da fenda é estabilizado pela proteína clatrina. A LDL é internalizada via receptor por endocitose. A vesícula contendo a LDL perde a clatrina e se funde a vesículas maiores denominadas endossomos. A LDL então, se separa de seu receptor e a lipoproteína é degradada por enzimas lisossômicas liberando colesterol, aminoácidos, ácidos graxos e fosfolípidos (Figura 2). O conteúdo de colesterol celular é regulado pela síntese de colesterol via HMG CoA redutase, pela esterificação de colesterol intracelular via acil CoA colesterol aciltransferase (ACAT), pela síntese de receptor de LDL e por efluxo de colesterol livre na membrana por partículas de HDL (CHAMPE, 1997; GENEST, 2003).



**Figura 2 - Passos sequenciais na via do receptor de LDL.**

(1) ligação da LDL ao receptor → (2) internalização da LDL → (3) formação dos endossomos → (4) hidrólise dos componentes → (5) reciclagem dos receptores. Fonte: (JEON e BLACKLOW, 2005).

A HDL possui como apolipoproteína principal a apo A-I. Esta lipoproteína é sintetizada pelo intestino e fígado. O colesterol livre em contato com HDL nascente é substrato para a enzima plasmática lecitina: colesterol acil transferase (LCAT) e ativada pela apo A-1, resultando na formação de ésteres de colesterol e aumento do tamanho da partícula de HDL. Os ésteres de colesterol podem ser transferidos para as lipoproteínas que contêm Apo B pela CETP e em seguida retornar para o fígado via receptor de LDL (ALVAREZ-LEITE, 1993). O colesterol esterificado proveniente da HDL é degradado, podendo ser reempacotado por lipoproteínas ou ser convertido em ácidos biliares (CHAMPE, 1997). O metabolismo de lipoproteínas pode ser visualizado na figura a seguir:



**Figura 3: Metabolismo de lipoproteínas.**

Os quilomírons contêm apoB-48 e principalmente triacilgliceróis. Lipase lipoprotéica, com seu cofator apoC-II, hidrolisa os QM que são captados pelo fígado pela ligação da apoE. O fígado libera os lipídeos como VLDL com apoB-100. VLDL é hidrolisada em IDL, a qual pode ser captada pelo fígado. IDL também pode sofrer hidrólise pela lipase hepática e se tornar LDL. Células hepáticas e periféricas removem a LDL da circulação quando apoB-100 se liga ao receptor de LDL. HDL remove o excesso de colesterol das células para o fígado para excreção na bile. O metabolismo das lipoproteínas está simbolizado por linhas sólidas. O transporte de colesterol, quando não contido nas lipoproteínas, está indicado por linhas pontilhadas. Fonte: (RADER, 1995).

A HDL é considerada fator de risco negativo para as doenças cardiovasculares devido a seu importante papel no transporte reverso de colesterol, removendo-o do tecido periférico (ROSENSON, 2004). Já o aumento dos níveis de LDL causa disfunção endotelial, inflamação, formação de células espumosas e instabilidade da placa sendo associado, portanto, com o aumento de risco para aterosclerose (ROSENSON e TANGNEY, 1998). Além da LDL, as lipoproteínas ricas em triacilgliceróis como os quilomírons, as VLDL e as IDL, também apresentam potencial aterogênico, apesar do maior componente da placa aterosclerótica ser o colesterol esterificado.

## 2.4 - Patogênese da Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória progressiva caracterizada pelo acúmulo de células imunológicas, principalmente macrófagos e células T, bem como de células musculares lisas, matriz extracelular, lipídeos e de debris acelulares nas grandes artérias. A lesão aterosclerótica primária ou estria gordurosa consiste no acúmulo de macrófagos repletos de colesterol que são denominados células espumosas (*foam cells*) no subendotélio (LUSIS, 2000; LIBBY, 2002; HANSSON e LIBBY, 2006).

Embora qualquer artéria possa ser afetada, os principais alvos da aterosclerose são a aorta e as artérias coronárias e cerebrais. Como consequência clínica, há o infarto do miocárdio, a isquemia cerebral e o aneurisma aórtico (ALVAREZ-LEITE *et al.*, 2003). Em humanos, a aterosclerose tem início na vida fetal, progride lentamente durante a infância e a adolescência e então, pode acelerar na vida adulta resultando em erosão ou ruptura da placa (BINDER *et al.*, 2002). A estria gordurosa pode usualmente ser encontrada na aorta na primeira década de vida, nas artérias coronárias na segunda década de vida e nas artérias cerebrais na terceira ou quarta décadas de vida (LUSIS, 2000).

Os principais fatores de riscos para aterosclerose estão descritos na tabela 1, os quais podem ser agrupados, em não modificáveis, modificáveis pelo estilo de vida, modificáveis pelo uso de drogas e fatores de risco não-tradicionais (SCOTT, 2004).

**Tabela 1:** Fatores de Risco para Aterosclerose

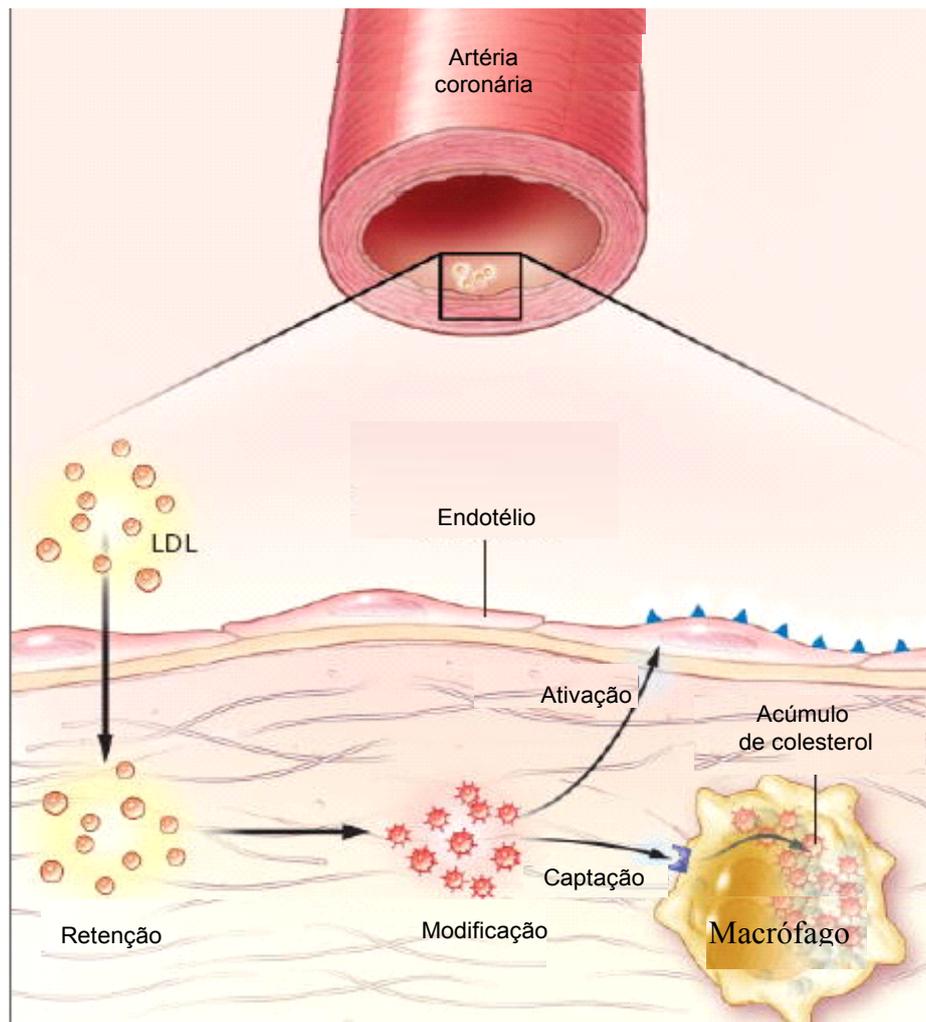
<b>Fatores de risco da aterosclerose</b>
<b><i>Não modificáveis</i></b>
Idade
Etnia
Gênero (masculino)
História familiar
<b><i>Modificáveis pela mudança do estilo de vida</i></b>
Dieta com alta quantidade de gordura saturada e colesterol, e baixa quantidade de frutas, vegetais e grãos integrais
Obesidade
Sedentarismo
Tabagismo
<b><i>Modificáveis por drogas</i></b>
Dislipidemias
Hipertensão
<b><i>Não tradicionais</i></b>
Elevados níveis de Lp (a)
Elevados níveis de homocisteína
Agentes infecciosos

A hipercolesterolemia parece ser um pré-requisito absoluto para o início e progressão da lesão aterosclerótica. O sistema imunológico, em um contexto mais amplo, juntamente com o colesterol, é um dos fatores dominantes na modulação da aterogênese. A aterogênese pode ser afetada por outros processos inflamatórios como em doenças agudas e crônicas e em infecções (BINDER *et al.*, 2002).

Tal resposta inflamatória ocorre em estímulo à presença de um agente inflamatório, sendo este, normalmente, a LDL oxidada. A agregação de lipoproteínas tem sido proposta como sendo primordial na aterosclerose e a agregação da LDL oxidada tem sido observada em lesões ateroscleróticas (ROSENSON, 2004). (GOLDSTEIN *et al.*, 1979) foram os primeiros a propor que uma modificação da LDL como a oxidação, seria pré-requisito para a captação pelo macrófago e desenvolvimento da placa.

As partículas de LDL difundem-se passivamente através das células endoteliais e sua retenção na parede do vaso envolve interações entre a apolipoproteína B, presente na partícula desta lipoproteína, e os proteoglicanos da matriz (LUSIS, 2000). Neste estágio a LDL encontra-se minimamente oxidada (mm LDL) apresentando oxidação de seus lipídeos e com pequena alteração na apo B (BERLINER *et al.*, 1995). A acumulação desta na camada íntima, contribui significativamente para o recrutamento de monócitos, já que a LDL estimula o endotélio a produzir moléculas pró-inflamatórias, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento (LUSIS, 2000). Os monócitos, então, diferenciam-se em macrófagos e devido a sua enorme capacidade oxidativa os lipídeos da LDL são adicionalmente oxidados e a parte protéica da LDL também é modificada, o que impede o reconhecimento da lipoproteína pelo receptor de LDL (BERLINER *et al.*, 1995).

A captação da LDL oxidada se dá, então, por meio de receptores *scavengers* específicos ou removedores. Os receptores *scavengers* tais como CD36 e SR-A, internalizam a LDL oxidada (BINDER *et al.*, 2002), já que essa contém grupos acetil ou análogos que são reconhecidos apenas por estes receptores. Como não ocorre controle do conteúdo de colesterol internalizado por *feedback* negativo, o acúmulo de colesterol conduz à formação de células espumosas (*foam cells*) e, conseqüentemente, das estrias gordurosas (Figura 4) (LUSIS, 2000).



**Figura 4: Infiltração da LDL na artéria e formação de célula espumosa**

Em casos de hipercolesterolemia, o excesso de LDL infiltra na artéria e é retido na camada íntima, particularmente nos sítios em que a hemodinâmica é favorável. Modificações oxidativas e enzimáticas na partícula de LDL promovem o início do processo inflamatório com indução da expressão de moléculas de adesão no endotélio. As partículas de LDL modificadas são captadas através de receptores scavengers de macrófagos formando as células espumosas. Fonte: (HANSSON, 2005).

O recrutamento de monócitos via LDL oxidada induz as células da parede do vaso a secretarem moléculas quimiotáticas como a MCP-1 (proteína 1 quimioatrativa de monócitos), ativa as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão para monócitos e células T, induz a expressão do fator estimulador de colônias de monócitos (MCSF) que facilita a transformação fenotípica de monócitos em macrófagos, e estimula a proliferação de células musculares lisas (GLASS e WITZTUM, 2001).

A adesão e rolamento de leucócitos na superfície endotelial podem ser mediados por moléculas de adesão. Células endoteliais expressam VCAM-1 que é responsável pelo recrutamento preferencial de monócitos e possui papel primário na regulação do estímulo

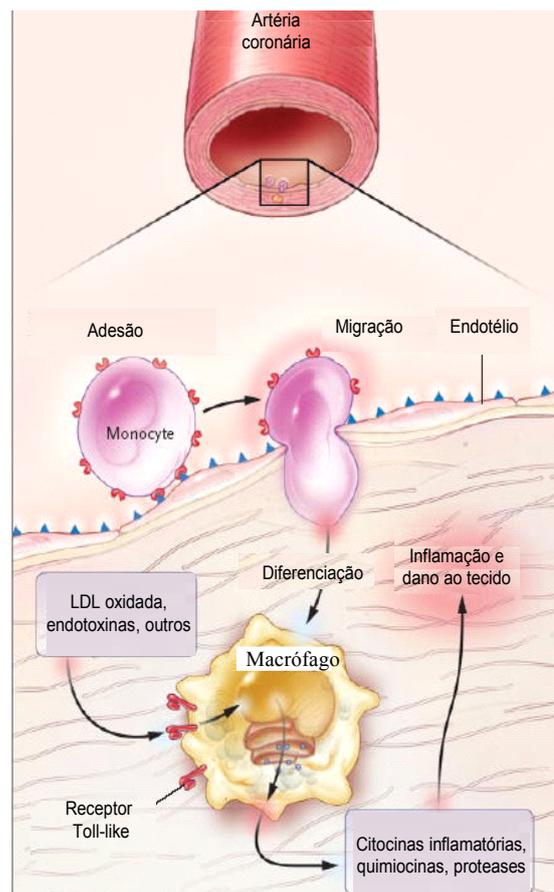
pró-inflamatório. Além da molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1), a molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), a P-selectina e a E-selectina também têm o mesmo papel na interação entre células envolvidas na aterosclerose (LUSIS, 2000; GLASS e WITZTUM, 2001; LIBBY, 2002).

Locais com alta expressão de moléculas de adesão estão associados a regiões que apresentam baixa tensão de cisalhamento (*shear stress*) e fluxo sanguíneo oscilatório ou turbulento, como por exemplo, áreas de ramificações e curvaturas de vasos (VANDERLAAN *et al.*, 2004). As células endoteliais nestes locais apresentam formas poligonais e sem orientação, contribuindo para um aumento da permeabilidade a LDL, tornando-se, assim, locais de preferência para a formação das lesões ateroscleróticas (LUSIS, 2000).

A entrada de diferentes tipos de leucócitos na parede da artéria é mediada por moléculas de adesão e por fatores quimiotáticos. A firme adesão destas células no endotélio é mediada pela integrina VLA-4 (*very late activation antigen*), presente nestas células, que interage com a VCAM-1 do endotélio (LUSIS, 2000).

Na placa aterosclerótica humana, aproximadamente 40% das células expressam marcadores de macrófagos, 10% são células T CD3<sup>+</sup> e o restante são células musculares lisas (HANSSON e LIBBY, 2006).

Os macrófagos são as células imunológicas mais numerosas na placa aterosclerótica e seu acúmulo progressivo e ativação na parede do vaso são responsáveis por um importante passo para a formação da placa aterosclerótica (BERLINER *et al.*, 1995; HANSSON, 2005). Os macrófagos secretam uma variedade de produtos pró-inflamatórios que afetam a progressão da lesão e a estabilidade da placa como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina IL-1 $\beta$ , quimiocinas e enzimas como a mieloperoxidase, que é uma fonte potencial de estresse oxidativo e inflamação (BINDER *et al.*, 2002; LIBBY, 2002). Além disto, estas células expressam moléculas de MHC de classe II, podendo apresentar antígenos às células T (Figura 5).



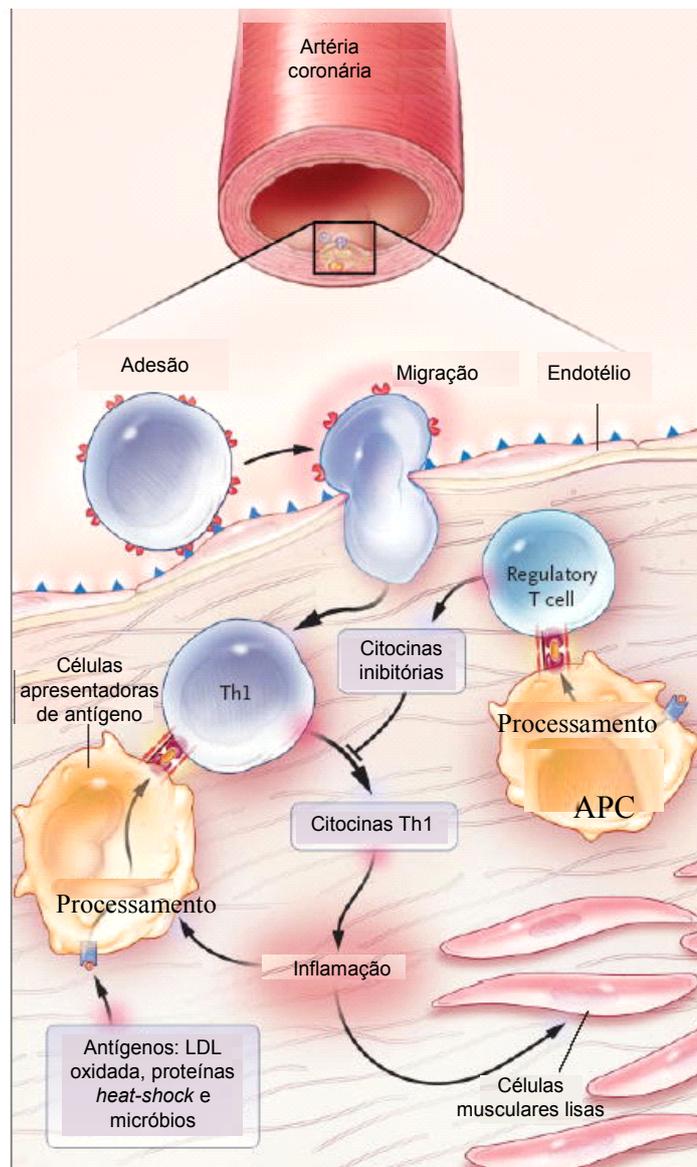
**Figura 5: Papel do macrófago na inflamação da artéria**

Monócitos são recrutados pelo endotélio ativado e se diferenciam em macrófagos. Diversas moléculas endógenas e microorganismos podem se ligar através de receptores Toll-like dos macrófagos, induzindo sua ativação e levando a liberação de citocinas inflamatórias, quimiocinas, radicais de oxigênio dentre outras moléculas que acarretam dano tecidual. Fonte: (HANSSON, 2005).

As células T são componentes da lesão primária e avançada. A razão de células T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  na placa avançada é similar àquela encontrada no sangue periférico. Em modelos experimentais de aterosclerose foi detectada expansão oligoclonal de células T  $CD4^+$  ativadas em resposta aos antígenos locais como LDL oxidada, HSP 60 (proteína 60 de choque térmico) ou outros antígenos derivados de patógenos como microorganismos. A ativação de células T pode ocorrer em linfonodos regionais possivelmente após apresentação do antígeno por células dendríticas que trafegam da placa para o linfonodo (HANSSON e LIBBY, 2006).

A maioria das células T  $CD4^+$  apresentam o fenótipo de células T helper 1 (Th1) e secretam as citocinas  $IFN-\gamma$ , IL-12, IL-15, IL-18 e TNF, em contraste, poucas células produzem citocinas Th2 como a IL-4 e IL-5. O  $IFN-\gamma$  é uma importante citocina que acelera a aterosclerose devido a sua ação em macrófagos, aumentando a produção de

óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias, além de causar decréscimo na produção de colágeno (HANSSON, 2005; HANSSON e LIBBY, 2006). Duas citocinas anti-inflamatórias contrabalançam a ação das células T: TGF- $\beta$  e IL-10. A citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  é secretada por macrófagos, células musculares lisas e por células T reguladoras estando envolvida com a estabilidade da placa pois estimula a síntese de colágeno e modula a atividade de células T (Figura 6) (BINDER *et al.*, 2002; HANSSON e LIBBY, 2006).



**Figura 6: Efeito das células T ativadas na inflamação da placa aterosclerótica.**

Antígenos são apresentados pelas células dendríticas e macrófagos às células T que, então, são ativadas. A maioria das células T ativadas produzem citocinas Th1 que ativam macrófagos e células do vaso exacerbando a inflamação. Células T reguladoras regulam este processo secretando citocinas anti-inflamatórias como TGF- $\beta$  e IL-10. Fonte: (HANSSON, 2005).

A resposta Th1 é predominante na placa aterosclerótica tanto em humanos quanto em modelos animais. Essa hipótese é suportada por estudos com camundongos C57BL/6, propensos a resposta Th1, que desenvolvem estrias gordurosas quando alimentados com dieta aterogênica, enquanto os animais BALB/c, favoráveis a resposta Th2, são resistentes à aterogênese (PAIGEN *et al.*, 1985). Em outro estudo a deleção de STAT6, fator de transcrição essencial para a diferenciação de células Th2, faz com que camundongos BALB/c tornem-se susceptíveis à aterosclerose (HUBER *et al.*, 2001). Em concordância com este estudo, camundongos hipercolesterolêmicos deficientes para o fator de transcrição de indução do fenótipo Th1 denominado T-bet apresentam redução da lesão aterosclerótica (BUONO *et al.*, 2005).

Componentes da imunidade inata também estão envolvidos na lesão aterosclerótica. Ocorre deposição de complexos do complemento como C3, C4 e terminal C5b-C9 e imunoglobulinas IgM, estas últimas têm sido encontradas no local da lesão com epitopos específicos para LDL oxidada (BINDER *et al.*, 2002).

O acúmulo de células imunológicas e lipídeos na íntima ocorre durante o primeiro estágio da formação da placa. Estrias gordurosas são prevalentes em indivíduos jovens, nunca causam sintomas e podem progredir para uma lesão aterosclerótica madura ou desaparecer com o tempo (HANSSON e LIBBY, 2006).

A transição de uma estria gordurosa relativamente simples para uma mais complexa é caracterizada pela emigração de células musculares lisas da camada média para a íntima. Essas proliferam, captam lipoproteínas modificadas contribuindo para a formação de células espumosas e sintetizam proteínas da matriz extracelular provocando o desenvolvimento da capa fibrosa (GLASS e WITZTUM, 2001). Esta capa fibrosa é formada por matriz extracelular derivada das células musculares lisas. As lesões fibrosas podem tornar-se altamente avançadas e complexas, com a presença de calcificação, erosão ou ulceração e hemorragia (LUSIS, 2000).

O risco de erosão ou ruptura da placa é dependente de fatores como tamanho do centro necrótico rico em lipídeos, da espessura da capa fibrosa, da extensão da inflamação e das forças hemodinâmicas. Para que a placa torne-se vulnerável devem ocorrer modificações no componente lipídico, nas células musculares lisas e no endotélio. Um pré-requisito para a formação de capa fibrosa é a formação de um centro necrótico lipídico. Também ocorre morte de células musculares lisas que formam a capa fibrosa com redução da produção de matriz extracelular que acarreta vulnerabilidade da placa e

possível ruptura. A disfunção endotelial e a morte celular são fatores que predis põe à erosão e ao início de eventos aterotrombóticos (LINDSTEDT e KOVANEN, 2004).

## 2.5 - Aterosclerose em modelos murinos

Nas últimas décadas, um número substancial de estudos em aterosclerose têm sido realizados em diferentes modelos animais. Recentemente, está aumentando consideravelmente o número de estudos *in vivo* usando modelos de camundongos geneticamente modificados. Isto se deve às vantagens oferecidas ao utilizar estes modelos como rápida reprodução e viabilidade de numerosos descendentes congênitos, conhecimento amplo da sua genética, novas ferramentas biológicas e recursos, manutenção fácil devido ao pequeno tamanho dos animais possibilitando o uso de um número grande de camundongos ao mesmo tempo e formação relativamente rápida das lesões ateroscleróticas (OHASHI *et al.*, 2004; VANDERLAAN *et al.*, 2004).

Porém, os camundongos selvagens são naturalmente resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose. Estes animais transportam a maior parte do colesterol em Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) e possuem baixos níveis de colesterol em Lipoproteínas de Muito Baixa densidade (VLDL) e Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) (HOFKER *et al.*, 1998). Em humanos, a LDL é a principal transportadora de colesterol no plasma (MOUGENOT *et al.*, 1997). Apesar desta diferença, camundongos e humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (HOFKER *et al.*, 1998).

A aterosclerose em camundongos foi primeiramente observada em 1969 (THOMPSON, 1969). Uma lesão foi induzida em camundongos C57BL/6 quando estes foram alimentados com dieta rica em 50% de gordura por 5 semanas. No entanto, houve alta taxa de mortalidade ao se utilizar esta dieta. Posteriormente, camundongos C57BL/6 submetidos a uma dieta rica em 15% de gordura por 10 semanas foi constatado a presença de placa ateromatosa e baixa mortalidade (PAIGEN *et al.*, 1985). Apesar do camundongo C57BL/6 ser susceptível ao desenvolvimento da aterosclerose com a indução através da dieta, a lesão se restringe ao arco aórtico. Posteriormente, o uso deste modelo diminuiu com a utilização dos camundongos geneticamente modificados que exibem lesões extensas (OHASHI *et al.*, 2004).

Os camundongos modificados geneticamente são gerados por modulação gênica, onde ocorre a eliminação de um alelo específico responsável por codificar uma proteína com alto grau de especificidade. Os camundongos mais utilizados para o estudo da aterosclerose são gerados pela modulação genética da apo E (apolipoproteína E) e do LDLr (receptor para LDL), ambos fundamentais para o metabolismo de lipídios (DAUGHERTY, 2002).

A deficiência do receptor de LDL causa pronunciada hipercolesterolemia com complicações cardiovasculares em humanos. Em 1993, foi criado o camundongo deficiente para o receptor de LDL através de genes alvo em células embriológicas. Estes camundongos mostram um aumento de duas vezes nos níveis de colesterol total devido à alta nos níveis de LDL, quando submetidos à dieta com 10% de gordura. No entanto, os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> não desenvolvem aterosclerose quando alimentados com dieta regular (ISHIBASHI *et al.*, 1993). Apesar disso, esse modelo apresenta lesão ateromatosa mais extensa do que o modelo de camundongos selvagens C57BL/6 alimentados com dieta Ocidental (MASUCCI-MAGOULAS *et al.*, 1997). Além disso, o perfil de lipídeos do plasma em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> é mais similar a humanos com hiperlipidemia do que o modelo de apo E<sup>-/-</sup> (OHASHI *et al.*, 2004). As lesões formadas apresentam morfologia simples, consistindo predominantemente por macrófagos repletos de lipídios. Algumas das características das lesões avançadas, como calcificação e núcleo necrótico, são vista somente se esses camundongos forem alimentados com dieta aterogênica por um longo período (DAUGHERTY, 2002).

É importante ressaltar que o desenvolvimento de aterosclerose destes modelos murinos, como em virtualmente todos os modelos experimentais de aterosclerose é dirigido por elevações extremas nos níveis de colesterol circulante que resultam na formação de lesões extensivas em uma escala de tempo que oscila de semanas a meses. Em contraste, o desenvolvimento de aterosclerose em humanos evolui sobre décadas, apresentando menos células envolvidas na lesão daquelas observadas em modelos murinos. Apesar disso, os estudos *in vivo* realizados nos animais fornecem aproximação do papel de genes envolvidos na patogênese da aterosclerose, bem como elucidam o mecanismo pelo qual esta se desenvolve (GLASS e WITZTUM, 2001).

## 2.6– Associação entre doenças inflamatórias e aterosclerose

Em mais de 50% dos pacientes com aterosclerose não têm sido identificada a presença de fatores de risco tradicionais como hipertensão, hábito de fumar, hipercolesterolemia e diabetes indicando que fatores de risco adicionais que predispõe a aterosclerose ainda não foram identificados (EPSTEIN *et al.*, 1999).

A relação entre infecção e aterosclerose foi estabelecida já que diversos estudos têm correlacionado infecção com bactérias, vírus e protozoários na aterogênese (FAHDI *et al.*, 2003). Esses estudos levam em consideração que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e que a infecção pode ter papel importante na perpetuação do estado inflamatório (MAGEN *et al.*, 2005).

Recentes estudos têm demonstrado que a inflamação e o sistema imunológico contribuem significativamente para a aterogênese. Infecções microbianas que envolvem ativação do sistema imunológica estão associadas com lesão vascular (OHASHI *et al.*, 2004). Os principais microorganismos estudados são *Chlamidia pneumonia*, *herpes simplex virus* e *cytomegalovirus* (LANGHEINRICH e BOHLE, 2005).

Elevados títulos de anticorpos contra *C. pneumonia* foram detectados em pacientes com doença arterial coronariana (SAIKKU *et al.*, 1988). A infecção com *C. pneumonia* em modelos animais de aterosclerose foi capaz de acelerar a lesão aterosclerótica em camundongos apo E<sup>-/-</sup> (BURNETT *et al.*, 2001) e em LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta aterogênica (HU *et al.*, 1999). Isto pode ser devido à ação direta do microorganismo na placa ou ao aumento da sinalização de mediadores inflamatórios (KALAYOGLU *et al.*, 2002).

O herpesvírus mais estudado em aterosclerose é o *cytomegalovirus*. Este foi detectado em lesões ateroscleróticas humanas (KWON *et al.*, 2004), pode modular as células imunológicas e ativar as células do vaso, além de aumentar a aterosclerose em modelos animais (HSICH *et al.*, 2001; VLIEGEN *et al.*, 2002; BURNETT *et al.*, 2004; GREDMARK *et al.*, 2004).

Outro microorganismo cuja relação com a aterosclerose tem sido investigada é o *Helicobacter pylori*, mas os estudos são conflitantes. Em um estudo populacional realizado por (SINGH *et al.*, 2002) foi encontrada correlação positiva entre a infecção bacteriana e doença coronariana, porém outros estudos falharam ao tentar detectar este microorganismo no tecido vascular (BLASI *et al.*, 1996; DANESH *et al.*, 1999). Estudos

experimentais utilizando camundongos LDLr<sup>-/-</sup> infectados com *H. pylori* não apresentaram aumento da aterosclerose (MACH *et al.*, 2002).

Um parasita também envolvido na aterogênese foi estudado por (DOENHOFF *et al.*, 2002), que demonstraram que animais apoE<sup>-/-</sup> infectados com *Shistosoma mansoni* apresentaram redução tanto das lesões aterogênicas quanto dos níveis de colesterol sérico. A infecção helmíntica crônica pode atenuar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares por elicitar uma resposta crônica Th2, podendo modular a ativação de monócitos e aumentar a produção de citocinas, tais como IL-4, IL-10 e IL-13 no local da infecção (MAGEN *et al.*, 2005).

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório visaram investigar o efeito de protozoários no desenvolvimento da aterosclerose. Animais apoE<sup>-/-</sup> infectados por *Toxoplasma gondii* exibiram um aumento da lesão na válvula aórtica, independente dos níveis séricos de colesterol. Este fato pode ser devido à exacerbação do processo inflamatório provocado pelo parasita, assim como pela maior captação do colesterol pelas células infectadas, para o fornecimento de colesterol ao *T. gondii* (PORTUGAL *et al.*, 2004). O efeito da *Leishmania major*, que provoca uma inflamação local, na aterogênese também foi investigado (FERNANDES, 2006). Camundongos apo E<sup>-/-</sup> infectados na pata com o parasita apresentaram aumento da lesão aterosclerótica que foi acompanhada por aumento de células inflamatórias no local.

Além dos processos inflamatórios promovidos por infecção e da diabetes, doença inflamatória já estabelecida como fator de risco para a aterosclerose, recentemente outras doenças inflamatórias têm sido correlacionadas com a aterogênese como artrite reumatóide (SZEKANECZ *et al.*, 2007) e lupus sistêmico eritematoso (STANIC *et al.*, 2006).

Em 2005, foi investigada, pela primeira vez, a associação entre doenças alérgicas como rinite alérgica e asma, e aterosclerose em estudos populacionais. Pacientes com doenças alérgicas tiveram risco aumentado para espessamento da camada íntima e para desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Quando os dados foram correlacionados com os níveis séricos de IgE a associação foi confirmada (KNOFLACH *et al.*, 2005). Outro estudo relatou aumento das doenças coronarianas arteriais em mulheres adultas com asma (ONUFRAC *et al.*, 2006). Os autores justificam o aumento de doenças cardiovasculares já que componentes envolvidos no processo alérgico, como a produção

de leucotrienos e a ativação de mastócitos, também estão envolvidos na inflamação aterosclerótica.

Os mastócitos são células efetoras típicas nas reações alérgicas. Esses apresentam receptores de superfície (FcεRI) e ao realizarem ligações com moléculas de IgE, liberam histamina, heparina, carboxipeptidase A, proteoglicanos, quimase e triptase (PRUSSIN e METCALFE, 2006). A acumulação de mastócitos em lesões ateroscleróticas humanas foi demonstrada em estudos prévios (KAARTINEN *et al.*, 1994; JEZIORSKA *et al.*, 1997).

Os mastócitos apresentam diversas funções que podem modular a aterogênese (KELLEY *et al.*, 2000). Essas células, através da liberação de histamina, podem aumentar a permeabilidade vascular e alterar o tônus do vaso (LIBBY e SHI, 2007). Os mastócitos produzem citocinas como TNF-α, IL-6 e IFN-γ e mediadores lipídicos como prostaglandinas e leucotrienos envolvidos na resposta pró-inflamatória (SUN *et al.*, 2007). Por meio das proteinases, quimase e triptase, os mastócitos promovem a ativação de metaloproteinases que estão envolvidas no remodelamento e ruptura da placa (JOHNSON *et al.*, 1998).

O papel da ativação de mastócitos perivasculares na aterogênese e desestabilização da placa foi investigada em camundongos deficientes para apo E. Os efeitos incluem o aumento da incidência de hemorragia intraplaca, da apoptose de macrófagos e do recrutamento de leucócitos (BOT *et al.*, 2007). A participação direta de mastócitos na aterogênese também foi investigada recentemente (SUN *et al.*, 2007). Os autores desenvolveram camundongos mutantes deficientes para o receptor de LDL e que não apresentavam mastócitos. Nesses animais foi notado decréscimo no tamanho da lesão aterosclerótica, na deposição lipídica, no número de macrófagos e linfócitos T presentes na placa e na proliferação celular e apoptose quando comparado a camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

Apesar de não existirem trabalhos relatando a associação entre alergia alimentar e aterosclerose, foi sugerido que anticorpos alimentares poderiam aumentar os riscos para doenças arteriais coronarianas (DAVIES *et al.*, 1969). Segundo o autor, os anticorpos seriam como fatores de risco. A persistente presença de anticorpos alimentares na circulação ocorria devido à absorção repetitiva de antígenos alimentares levando à formação de complexos antígeno-anticorpo. Esses complexos poderiam causar dano no endotélio vascular, promover a aderência de plaquetas e trombose intravascular, além da

deposição de fibrina. De fato, foi encontrada a presença de maiores quantidades de anticorpos na circulação para leite e ovo em pacientes que sofreram infarto do miocárdio do que nos pacientes controles saudáveis (DAVIES *et al.*, 1974), sugerindo que absorção de proteínas antigênicas alimentares durante um longo período de vida em indivíduos susceptíveis é causa de ateroma (DAVIES, 1976).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1 - Animais e dieta

Os camundongos homozigotos para a ausência do gene do receptor de LDL e camundongos C57BL/6 com 12 semanas de idade, fêmeas, foram mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica Nutricional, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas e temperatura em torno de  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Estes foram distribuídos nos grupos experimentais tomando em consideração o peso inicial e o colesterol total. Aos camundongos foi ofertada dieta padrão para roedores (AIN93G) com modificação na quantidade de maltodextrina que foi substituída por amido de milho e suplementada com colesterol, para a indução da aterosclerose (tabela 2). O peso corporal e o consumo alimentar foram avaliados semanalmente. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal de nossa instituição (UFMG, processo 42/2007).

**Tabela 2:** Composição da dieta padrão

Ingredientes	%*
Caseína	20
Metionina	0,3
Amido de milho	52,95
Sacarose	10
Celulose	5
Óleo de soja	7
Mistura de minerais	3,5
Mistura de vitaminas	1,0
Colina	0,25

\*Dieta acrescida com 1,25 % de colesterol e 0,014% de BHT. Caseína: Naarden Agro Products; Metionina, Bitartarato de Colina, Mistura de minerais e mistura de vitaminas: Rhoster; Amido de milho: Milhena; Sacarose: Único; Celulose: Mingtai Chemical CO.; Óleo de soja: Bertol, Colesterol: Sigma.

### 3.2 – Protocolo de imunização

Os camundongos receberam (dia 0) injeção subcutânea no dorso com 0,2 mL de solução salina contendo  $10\mu\text{g}$  de ovalbumina (antígeno) adsorvida em 1 mg de hidróxido

de alumínio (adjuvante). Os camundongos dos grupos controles receberam somente o adjuvante diluído em salina. O reforço consistiu da aplicação de injeção com o antígeno (10 $\mu$ g de ovalbumina), apenas nos animais dos grupos alérgicos, 14 dias após a primeira imunização. Os grupos controles receberam injeção com solução salina. O desafio oral foi realizado 7 dias após o reforço quando todos os animais experimentais receberam solução de clara de ovo a 20% na mamadeira, como única fonte líquida. Essa solução continha, aproximadamente, 10 mg de ovalbumina/mL. O desafio oral teve a duração de 5 semanas.

	<p><i>Sensibilização primária (dia 0):</i> OVA+ : 10 <math>\mu</math>g OVA+ 1 mg Al(OH)<sub>3</sub> OVA- : 1 mg Al(OH)<sub>3</sub></p>
	<p><i>Reforço (14<sup>o</sup> dia):</i> OVA+ : 10 <math>\mu</math>g OVA OVA- : solução salina</p>
	<p><i>Desafio oral (21<sup>o</sup> dia):</i> OVA+ e OVA- : solução de clara de ovo a 20%</p>

Figura 7: Protocolo de imunização

### 3.3 - Amostras de sangue

As amostras de sangue foram retiradas no início do experimento (dia 0), no dia do desafio oral (21<sup>o</sup> dia), no 42<sup>o</sup> dia e ao término do experimento (56<sup>o</sup> dia). Essas foram retiradas após jejum de 8 a 10 horas. No início do experimento e no 21<sup>o</sup> dia, o sangue foi retirado pela veia caudal por meio de capilares heparinizados. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 6.000 rpm durante 5 minutos em centrífuga de mesa para separação do plasma. Ao término do experimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de ketamina (130 mg/Kg) e Xilazina (0,3 mg/Kg) e foram sacrificados

por exanguinação pela artéria femural, sem anticoagulante. O soro foi separado da mesma forma que as amostras de plasma e estas foram armazenadas à  $-70^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises.

### 3.4 - Determinação dos anticorpos IgE específicos anti-ova séricos

Microplacas de poliestireno foram incubadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250, 50 $\mu\text{l}$  por poço, durante 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora com 200 $\mu\text{l}$  por poço de solução caseína a 0,25% em PBS para bloqueio à temperatura ambiente. A solução foi desprezada e as placas incubadas por 2 horas com 50 $\mu\text{l}$  por poço de soro dos camundongos. As placas foram lavadas com solução salina-Tween e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com 1 $\mu\text{l}$  de OVA-Biotina em 50 $\mu\text{l}$  de PBS-caseína por poço. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 50 $\mu\text{l}$  por poço de estreptoavidina-peroxidase na concentração de 1:6000 por 45 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz, com 100 $\mu\text{l}$  por poço de tampão citrato pH=5.0 contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  e ortofenileno-diamino (OPD). As reações foram interrompidas, após 15 minutos, pela adição de 20 $\mu\text{l}$  por poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Em todas as placas foi colocado um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunológicas), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA com filtro de 492 nm. Os resultados foram amostrados em unidades arbitrárias (U.A.) a partir do padrão positivo considerado como 1000 unidades.

### 3.5 - Determinação dos anticorpos IgG1 específicos anti-ova séricos

Microplacas de poliestireno serão incubadas *overnight*, a  $4^{\circ}\text{C}$ , com 2 $\mu\text{g}$  de OVA diluídos em 100 $\mu\text{l}$  por poço de tampão carbonato pH=9,6. Após 18 horas, as placas foram lavadas 2 vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 e incubadas, por 1 hora, com 200 $\mu\text{l}$  de solução caseína a 25% em PBS (PBS-caseína), por poço, para bloqueio à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas

incubadas, por 1 hora, com 100µl por poço de 6 diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição=0,5, diluições 1:100 a 1:3200). As placas foram lavadas 6 vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora a 37°C com anticorpos de cabra anti-IgG1 de camundongo, diluídos a 1:20000. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora a 37°C com anticorpos de coelho anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase. As placas foram mais uma vez lavadas 6 vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100µl por poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo peróxido de hidrogênio e ortofenileno-diamino (OPD). Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20µl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2%. A densidade óptica foi obtida em leitor de ELISA automático com filtro de 492 nm. Em todas as placas foi colocado um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunológicas), um controle negativo (*pool* de soro de animais controles), além do branco.

### 3.6 - Avaliação morfológica do intestino

O aspecto morfológico do intestino foi avaliado para observar se a alergia alimentar experimental poderia ocasionar inflamação no mesmo. Primeiramente, o intestino foi lavado com salina fisiológica para retirada das fezes. Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção foi baseado segundo (FERRARIS *et al.*, 1992). O intestino foi dividido em quatro partes de 20%, 30%, 30% e 20% a partir da parte proximal. Essas porções foram designadas como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. As porções foram fixadas em formol tamponado a 10% e desidratadas em soluções decrescentes de álcoois absolutos para inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados no micrótomo, obtendo-se cortes com espessura de 5 µm. Estes foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e analisados utilizando microscópio óptico.

### 3.7 - Determinação das concentrações de colesterol total sérico

As concentrações de colesterol foram medidos por método enzimático (Doles) (ALLAIN *et al.*, 1974) que consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de

fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima em 505 nm. As concentrações de colesterol no soro ou plasma dos animais foram determinados por um ensaio em microplaca de 96 poços (FAZIO *et al.*, 1997). Resumindo, 5 µl das amostras de soro foram diluídas em água destilada para adequar as leituras de absorvância à variação linear do teste. Cem microlitros de reagente de colesterol total foram adicionados aos 100 µl de soro diluído. Após um período de incubação de 10 minutos a 37°C, a absorvância foi lida a 492 nm em um leitor de microplaca. As dosagens foram feitas em duplicata.

### 3.8 - Determinação das concentrações de colesterol em HDL (HDLc) e frações aterogênicas

A dosagem HDL-Colesterol foi feita pelo método enzimático colorimétrico (Doles). A dosagem foi realizada após a precipitação seletiva de LDL e VLDL em polietilenoglicol tamponado em pH 10. No sobrenadante, obteve-se o HDL. O teor de colesterol da fração HDL foi determinado pelo sistema enzimático utilizado para dosagem de colesterol total sérico. Para dosagem, 15µL de reagente precipitante foram adicionados em um eppendorf contendo 15µL de soro, homogeneizado e mantido em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Após esse período, o eppendorf foi centrifugado por 4 minutos a 12000 rpm. Em seguida, 10µL do sobrenadante (contendo o HDL da amostra) foram adicionados a 190µL de reagente de cor (reagente de colesterol total) em microplacas e incubados em estufa a 37°C por 10 minutos. A leitura foi realizada a 492 nm. As dosagens foram feitas em duplicatas. O mesmo procedimento foi feito utilizando 10µL de padrão (100mg/dL). Para o cálculo das concentrações de HDLc foi feita a determinação do fator de calibração por meio da seguinte equação:  $F$  (fator de Calibração) =  $100/\text{Média da absorvância do padrão}$ ;  $\text{HDLc} = \text{absorvância da amostra} \times \text{fator de calibração}$ . O colesterol das frações aterogênicas foi calculado pela diferença entre o colesterol total e HDL.

### 3.9 - Determinação das concentrações de triacilgliceróis séricos

As concentrações de triacilgliceróis séricos foram medidos de acordo com o método enzimático colorimétrico (FOSSATI e PRENCIPE, 1982). O método consiste da hidrólise dos triacilgliceróis do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é, então, fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinona), com máximo de absorção a 492 nm. As dosagens foram feitas em microplaca como descrito acima para o colesterol. Porém, a diluição utilizada foi de 5 µl de soro em 245 µl de água destilada.

### 3.10 - Quantificação das concentrações de lipídeos hepáticos

No sacrifício, os fígados dos animais foram removidos, lavados em solução salina fisiológica, secos em papel filtro, pesados e armazenados a -20°C. Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método de Folch (FOLCH *et al.*, 1957; OLIVEIRA *et al.*, 2001). Em resumo, 100 mg de fígado foram triturados durante três minutos com 1900µL de solução clorofórmio: metanol (2:1) usando-se homogeneizador. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm após adição de 400µL de metanol. O sobredanante foi recolhido em 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 3000 rpm, a fase superior foi desprezada. A parede interior de cada tubo foi lavada 3 vezes com 600µL de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). 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.

Os extratos lipídicos foram homogeneizados com 500µL de isopropanol e as determinações das concentrações de colesterol total foram feitas conforme descrito para as amostras de soro.

### 3.11 - Quantificação das concentrações de lipídeos cecais

As fezes foram retiradas do ceco dos animais no momento do sacrifício e armazenadas à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram pesadas, maceradas em gral e submetidas à técnica de Folch da mesma maneira que a descrita para o fígado.

### 3.12 - Avaliação da peroxidação lipídica pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A formação de malondialdeído (MDA), resultante da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, é um conveniente índice para se determinar o grau de peroxidação lipídica. O ácido tiobarbitúrico reage com o MDA formando um aduto na proporção de 2:1 sendo este detectado espectrofotometricamente a 535nm.

A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada segundo o método descrito por (BUEGE e AUST, 1978). Para tal, o homogenato do fígado foi obtido triturando-se 100 mg de tecido em 1 mL de PBS pH 7,4. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do homogenato foi misturada com 1 mL da solução de ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico, 0,38% (p/v) e HCl a 0,25 N. A mistura foi aquecida em banho fervente por um período de 15 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 1,5 mL de butanol, para extração do cromóforo, e centrifugou-se a 3000 RPM por 10 minutos. A absorvância foi lida a 535nm. Uma curva padrão de malondialdeído foi feita nas seguintes concentrações: 0, 1,25, 2,5, 5, 10 e 50  $\mu\text{M}$ . Uma dosagem de proteínas (LOWRY *et al.*, 1951) foi realizada no mesmo homogenato e o resultado foi expresso em nanomoles de MDA por miligrama de proteína.

### 3.13 - Separação da LDL utilizada para determinação de anticorpos anti-LDL oxidada

Após a coleta de 10 ml do sangue de indivíduo saudável (voluntário) não fumante, em tubo *vacutainer* com EDTA 10%, procedeu-se a centrifugação a 3000 rpm por quinze minutos, em centrífuga de mesa. O soro foi coletado e adicionado os conservantes: aprotinina, benzamidina, azida sódica 5% com EDTA 5% e clorafenicol 0,1%, PMSF 0,5 mM

em DMSO. O soro então, teve sua densidade elevada para 1,21 com solução de Brometo de potássio (KBr). Três mililitros deste soro foram colocados em tubos de polipropileno, com volume total de 10 mL, próprios para ultracentrifuga Sorvall Ultra pro-80/Du Pont, utilizando o rotor 875T. Após o soro, foi adicionada a solução de KBr de densidade 1,006 até completar o volume total do tubo, formando assim o gradiente descontínuo de densidade de duas camadas. Os tubos devidamente equilibrados foram colocados para centrifugação por duas horas e meia a 50.000 rpm e 4<sup>o</sup>C, para separação das lipoproteínas. Terminada a rodada, foi retirada a camada composta pela LDL e a amostra foi submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS), por um período de vinte e quatro horas a 4<sup>o</sup> C, com quatro trocas do tampão. Em seguida, o material foi filtrado e guardado estéril em atmosfera de nitrogênio a 4<sup>o</sup> C, em recipiente protegido da luz (CHUNG *et al.*, 1986).

### 3.14 - Quantificação das Imunoglobulinas Anti - LDL Oxidada

Os anticorpos anti-LDL oxidada foram mensurados por ELISA. Para tal, uma placa de 96 poços foi coberta com 100µL de LDL nativa e de LDL oxidada (50µg/mL), em duplicata. A placa foi embrulhada em papel alumínio e mantida por 24 horas à temperatura ambiente. A placa foi vertida descartando o excesso de LDL que não fixou-se à placa. Posteriormente, adicionou-se 200µL de BSA a 1% em cada poço durante 1 hora à 37<sup>o</sup>C. O excesso de BSA foi descartado e a placa lavada 5 vezes com PBS-Tween 0,05%. O soro foi diluído diretamente na placa. Colocou-se 80µL de BSA a 1% em cada poço com 20µL de soro. A placa foi novamente embrulhada em papel alumínio e mantida por 24 horas à temperatura ambiente. No dia seguinte, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-Tween e incubada por 2 horas a 37<sup>o</sup>C com anticorpo IgG peroxidase diluído 1:10000, 100µL por poço. A placa foi lavada 10 vezes com PBS-Tween sendo adicionado em cada poço 100µL da solução OPD diluída em tampão citrato e adicionado peróxido de hidrogênio por 20 minutos no escuro. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na diluição 1:20. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492 nm.

O valor de cada amostra de soro foi expresso como U.A. (Unidades Arbitrárias) (492 nm), obtido pelo cálculo da absorbância da LDL oxidada dividida pela absorbância da LDL nativa de cada amostra.

### 3.15 - Quantificação da deposição lipídica na aorta torácica e abdominal

A deposição lipídica na aorta foi detectada utilizando a análise *en face* pela coloração Sudan IV. As aortas foram dissecadas removendo toda a adventícia a partir da válvula aórtica até a bifurcação ilíaca. As aortas foram abertas longitudinalmente e fixadas *overnight* com solução de formol-sacarose (4% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20µmol/L de BHT, e 2 µmol/l EDTA, pH 7,4) à 4<sup>o</sup>C. Depois de fixadas, as aortas foram submetidas a uma solução de 70% de etanol durante 5 minutos, posteriormente foram coradas por 10 minutos sob agitação numa solução filtrada contendo 0,5% de Sudan IV, 35% de etanol, e 50% de acetona e descoradas por 5 minutos em solução de 80% de etanol (PALINSKI *et al.*, 1994). As imagens das aortas coradas com Sudan IV foram digitalizadas por “scanner” e a análise feita pelo programa Image Pro Plus. A soma das áreas das lesões ateroscleróticas foi calculada pelo programa, sendo o resultado expresso pelo percentual da área total da aorta. O valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

### 3.16 - Avaliação das lesões ateroscleróticas na raiz aórtica

Os corações foram retirados em bloco com a raiz da aorta e perfusionados com PBS diluído uma vez. Os corações foram separados das aortas torácicas e abdominais, fixados em formol tamponado a 10% e recortados transversalmente sob visão estereoscópica, ao nível da borda atrial inferior direita, de modo a obter um fragmento contendo a porção proximal do coração e a raiz da aorta. Posteriormente, estes foram processados, conforme rotina para inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 6 µm, rigorosamente consecutivos, a partir da superfície de inclusão. As lâminas foram numeradas em série, codificadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

O tamanho da lesão aterosclerótica foi avaliado em dez cortes, tomando sempre como referência a presença da válvula aórtica. Localizada a formação da válvula, a cada 30 µm um corte era selecionado para medida. Assim, foi percorrida uma extensão média de 300µm, com os cortes analisados sendo intercalados por 4 cortes consecutivos, segundo técnica modificada de (PAIGEN *et al.*, 1987). As áreas foram medidas por meio da análise morfométrica utilizando o programa Image Pro Plus. O cálculo do tamanho da

lesão de cada animal foi feito pela soma das áreas dos dez cortes. O valor médio por grupo foi utilizado para comparações estatísticas.

### 3.17 - Avaliação do infiltrado inflamatório na raiz aórtica

O infiltrado inflamatório na raiz aórtica foi determinado pela contagem do número de células na área de lesão aterosclerótica. A área de cada campo foi determinada aleatoriamente, no total de 4 campos por corte. Foram analisados 3 cortes não consecutivos por animal, totalizando análise de 12 campos por animal (PORTUGAL *et al.*, 2004). O número de células foi determinado automaticamente pelo software Image Pro Plus por intensidade de cor.

### 3.18- Quantificação do colágeno nas lesões ateroscleróticas

O colágeno extracelular presente nas lesões ateroscleróticas foi visualizado utilizando o corante Tricômio de Gomori, apresentando coloração esverdeada e contracolorados com hematoxilina. Foram analisados 4 cortes não consecutivos por animal (DAUGHERTY e RATERI, 1994; GUPTA *et al.*, 1997) e os resultados foram expressos como porcentagem de colágeno por área de lesão.

### 3.19- Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para verificar a normalidade das amostras foi utilizado teste de Lilliefords. As comparações entre os quatro grupos experimentais foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA *one-way*) e quando havia diferença estatística aplicava-se o teste T student. Nos dados relativos às dosagens séricas de colesterol, frações de lipoproteínas e triglicerídeos não foram comparados camundongos C57BL/6 e LDLr<sup>-/-</sup> já que as variações são extremas. Neste caso, realizou-se apenas o teste T student. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles com valores de  $p < 0,05$ .

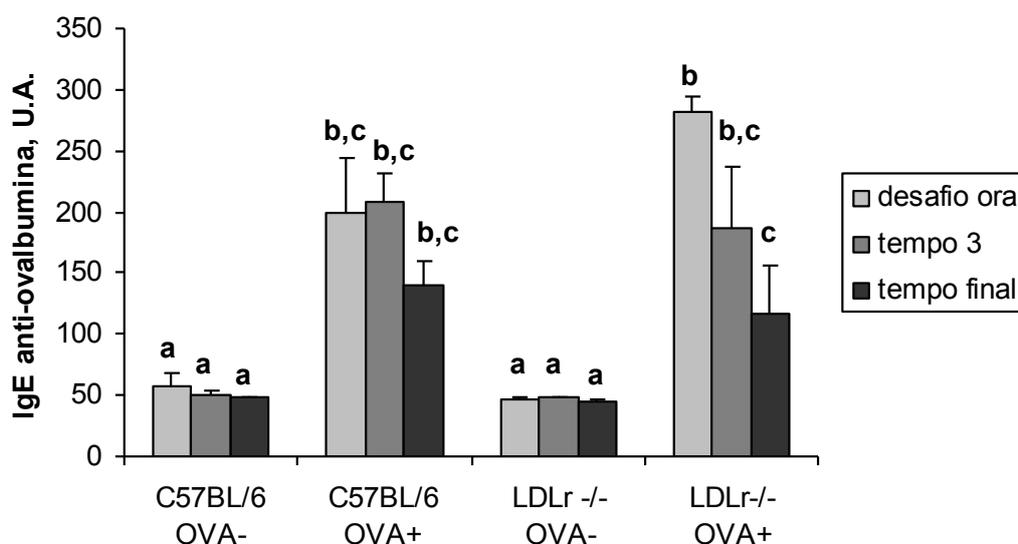
## **4- RESULTADOS**

#### 4.1- Confirmação e comparação do modelo de alergia alimentar experimental em camundongos C57BL/6 e LDLr-/-

##### 4.1.1- Quantificação dos anticorpos IgE e IgG1 anti-ovalbumina

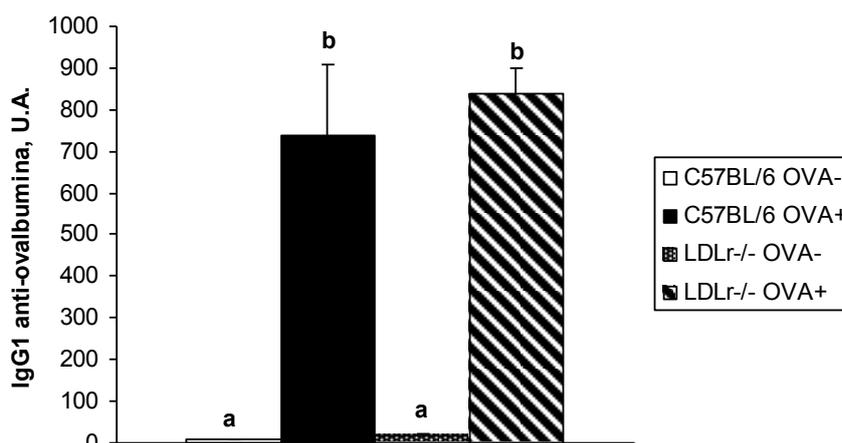
Os anticorpos IgE e IgG1 específicos para o antígeno (ovalbumina) foram determinados para confirmar a indução da alergia alimentar experimental. Dosagens séricas dos anticorpos IgE foram realizadas no primeiro dia do desafio oral (21º dia), na 3ª semana de ingestão do antígeno (42º dia) e ao término do experimento (56º dia). Conforme pode ser visualizado na Figura 8, o protocolo de indução da alergia alimentar causou aumento na quantidade de anticorpos IgE em camundongos C57BL/6 e LDLr nocaute sensibilizados com ovalbumina. A ingestão diária da solução de clara de ovo foi capaz de manter altos os níveis de IgE nos camundongos dos grupos OVA+ até o término do experimento. No entanto, camundongos LDLr-/- OVA+ apresentaram redução no níveis de IgE anti-OVA no tempo final quando comparado ao desafio oral.

O anticorpo IgG1 sérico anti-ovalbumina foi mensurado ao término do experimento. Esse também esteve aumentado em camundongos sensibilizados quando comparado aos controles confirmando a indução da alergia alimentar (Figura 9).



**Figura 8: Anticorpos IgE anti-ovalbumina**

Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias (U.A.) da absorbância das amostras quando comparado a um controle positivo equivalente a 1 U.A. C57BL/6 n=6, LDLr -/- n=5 a 6. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Letras distintas representam p < 0,05 pelo teste t student. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).



**Figura 9: Anticorpos IgG1 anti-ovalbumina.**

Os resultados foram expressos em Unidades Arbitrárias (U.A.) da absorbância das amostras quando comparado a um controle positivo equivalente a 1 U.A. C57BL/6 n=5 a 6 e LDLr -/- n=9 a 14. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Letras distintas representam  $p < 0,05$  pelo teste t student. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).

#### 4.1.2- Controle das ingestões da solução de clara de ovo e da dieta, dos pesos corpóreo e de gordura abdominal.

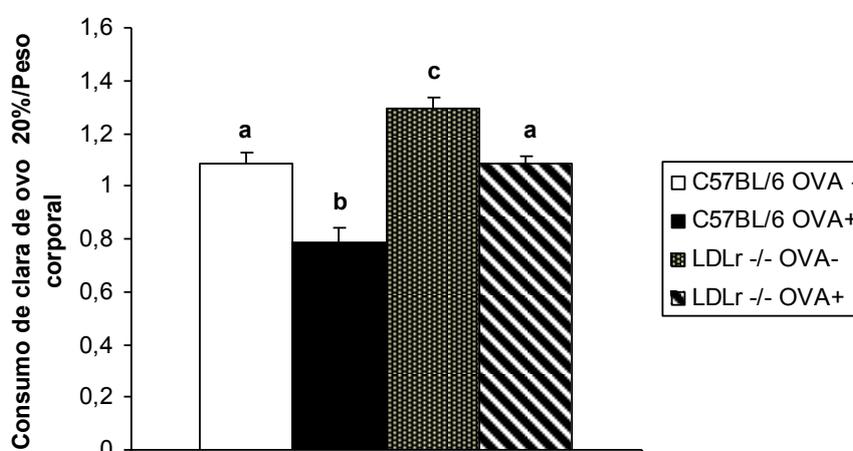
O controle do consumo da solução de clara de ovo a 20% foi realizado diariamente durante as 5 semanas experimentais. Tanto camundongos C57BL/6 quanto camundongos LDLr-/- sensibilizados com o antígeno ingeriram menor quantidade da solução de clara de ovo quando comparado aos grupos controles (Figura 10), havendo, portanto, aversão à ovalbumina presente na solução. Porém, a aversão em camundongos C57BL/6 OVA+ foi 1,7 vezes maior que em camundongos LDLr-/- OVA+. A aversão é também um parâmetro que confirma a indução da alergia alimentar.

Uma restrição alimentar discreta foi imposta aos grupos controles que receberam a mesma quantidade de dieta ingerida pelos grupos sensibilizados (C57BL/6 OVA-:  $20,25 \pm 2,61$ ; C57BL/6 OVA+:  $20,26 \pm 2,31$ ; LDLr-/-OVA-:  $17,76 \pm 2,44$ ; LDLr-/-OVA+:  $17,75 \pm 3,03$  g/animal/semana). O consumo dietético foi similar entre os quatro grupos quando foi considerado o peso corpóreo final dos animais. O controle do consumo de dieta teve como propósito evitar ofertas calóricas diferentes que pudessem influenciar nos dados metabólicos analisados neste estudo.

Nos camundongos alérgicos não foi observada alteração do peso corpóreo durante o experimento, em nenhuma das semanas avaliadas (Figura 11). Todos os grupos experimentais tiveram um ganho de peso significativo do início do experimento

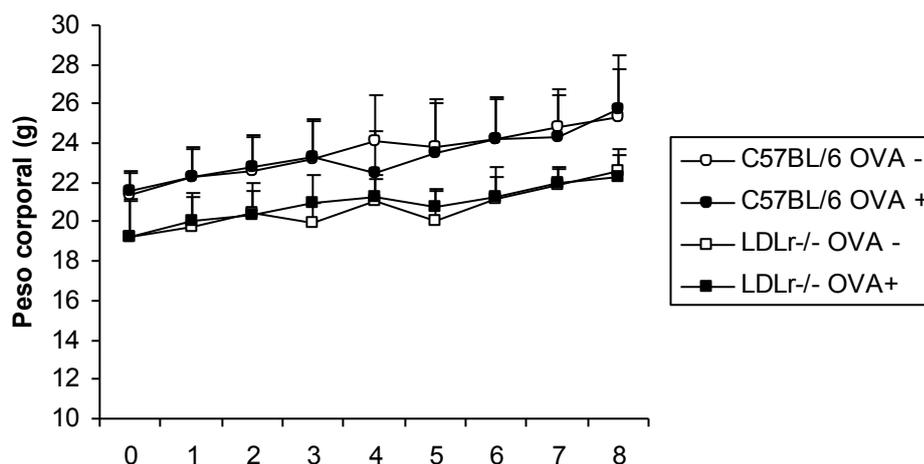
(dia 0) ao término do experimento (56º dia). Os camundongos C57BL/6 são mais pesados do que os camundongos LDLr  $-/-$ , havendo diferença entre os grupos alérgicos e controles das duas linhagens estudadas.

O peso da gordura abdominal foi avaliado já que um estudo prévio (MOREIRA, 2006) demonstrou a perda de gordura abdominal devido à alergia alimentar em camundongos C57BL/6. De fato, esses camundongos quando sensibilizados apresentaram redução na razão do peso da gordura abdominal pelo peso corpóreo final quando comparado ao grupo controle. Já camundongos LDLr  $-/-$ , apresentaram menor razão gordura abdominal/ peso corporal do que os camundongos C57BL/6 e a diferença entre quantidade de gordura abdominal e peso corporal não foi notada em camundongos do grupo LDLr $-/-$  OVA+ quando comparado ao grupo controle (Figura 12).



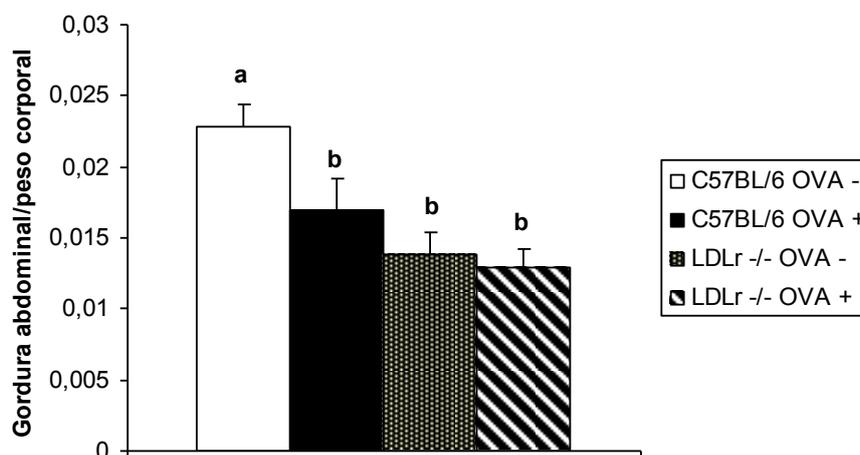
**Figura 10: Razão do consumo líquido da solução de clara de ovo a 20% pelo peso corpóreo.**

Os resultados foram expressos como média da razão do consumo líquido da solução de clara de ovo em mL pelo peso corpóreo em gramas ao término do experimento. C57BL/6 n=12 e LDLr  $-/-$  n=11 a 13. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Letras distintas representam  $p < 0,05$  pelo teste t student. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).



**Figura 11: Peso corporal dos camundongos ao longo das 8 semanas de experimento**

Os resultados foram expressos como média do peso em gramas. C57BL/6 n=12, LDLr -/- n=11 a 13. Os pontos representam a média do grupo do peso corporal. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).

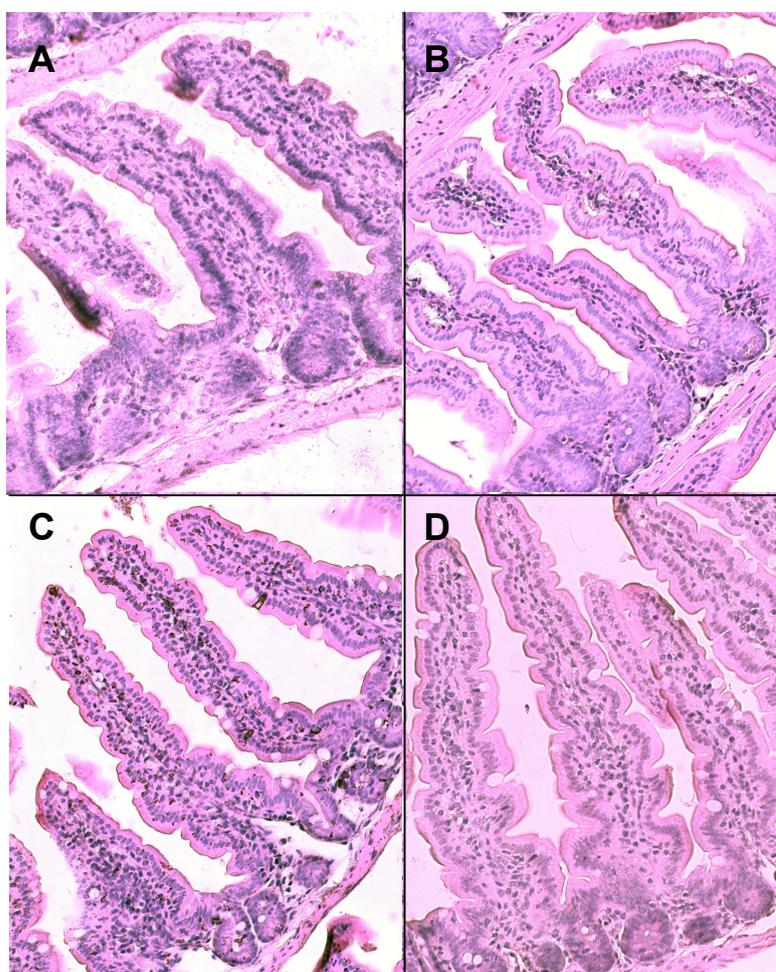


**Figura 12: Razão do peso da gordura abdominal pelo peso corpóreo**

Os resultados foram expressos como média da razão do peso da gordura abdominal em gramas pelo peso corpóreo em gramas ao término do experimento. C57BL/6 n=12, LDLr -/- OVA- n=11 a 13. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Letras distintas representam  $p < 0,05$  pelo teste t student. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).

#### 4.1.3 - Análise histológica do intestino

A análise histológica do intestino revela que em camundongos C57BL/6 e LDLr-/- alérgicos, o intestino mostrou-se íntegro. Os vilos apresentaram altura dentro dos padrões, sem erosão de epitélio, edema de mucosa ou aumento do infiltrado de leucócitos na lâmina própria. A relação vilo/glândula também foi caracterizada como dentro dos padrões normais. A submucosa apresentou-se sem alterações significativas. Não houve evidências de processo degenerativo ou inflamatório, tanto na mucosa como na submucosa. A Figura 13 ilustra a porção do jejuno proximal, região mais susceptível à inflamação devido à absorção de proteínas alergênicas.



**Figura 13: Aspecto histológico do jejuno proximal de camundongos controles e sensibilizados com ovalbumina.**

A- Representativo do grupo C57BL/6 OVA-; B- representativo do grupo C57BL/6 OVA+; C- representativo do grupo LDLr -/- OVA- e D- representativo do grupo LDLr -/- OVA+. Os cortes foram corados com H&E, aumento de 200X. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).

## 4.2 - Avaliação do efeito da alergia alimentar crônica no metabolismo e perfil lipídico em camundongos

### 4.2.1 - Análise do perfil lipídico

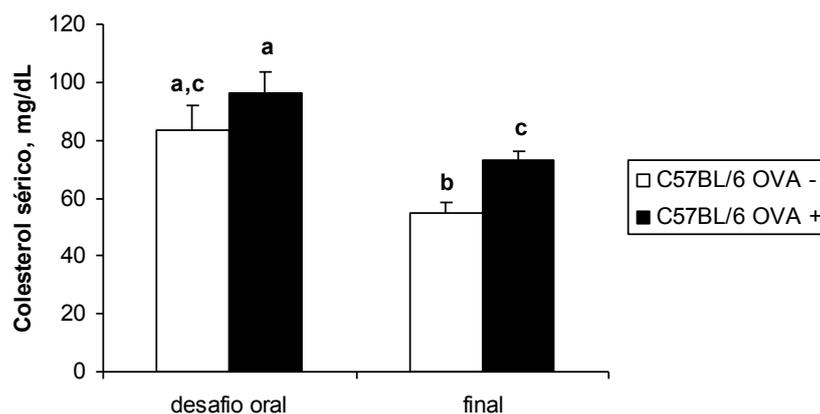
Após a confirmação e caracterização da alergia alimentar nos modelos experimentais, nosso próximo passo foi verificar o efeito da alergia alimentar no metabolismo e perfil lipídico.

As concentrações de colesterol total sérico foram avaliadas no desafio oral (21º dia) e ao término do experimento (56º dia). As frações de lipoproteínas foram determinadas ao final do experimento. Camundongos C57BL/6 sensibilizados com o antígeno apresentaram níveis aumentados de colesterol total sérico após as 8 semanas experimentais (Figura 14) devido ao aumento das frações aterogênicas: VLDL, IDL e LDL (Figura 15B). A fração anti-aterogênica HDL estava diminuída nesses animais alérgicos (Figura 15A).

Já em camundongos deficientes para o receptor de LDL houve redução no colesterol total sérico na última semana experimental (Figura 16) devido à redução nas concentrações de HDL (Figura 17A). As frações aterogênicas não foram alteradas pelo protocolo de indução da alergia alimentar nesses animais como em camundongos selvagens (Figura 17B). No entanto, a relação entre colesterol sérico total/HDLc esteve aumentada em camundongos C57BL/6 e LDLr nocaute, revelando um perfil lipídico pró-aterogênico que constitui fator de risco para as doenças cardiovasculares independente da linhagem de camundongo analisada (Figuras 15 e 17C).

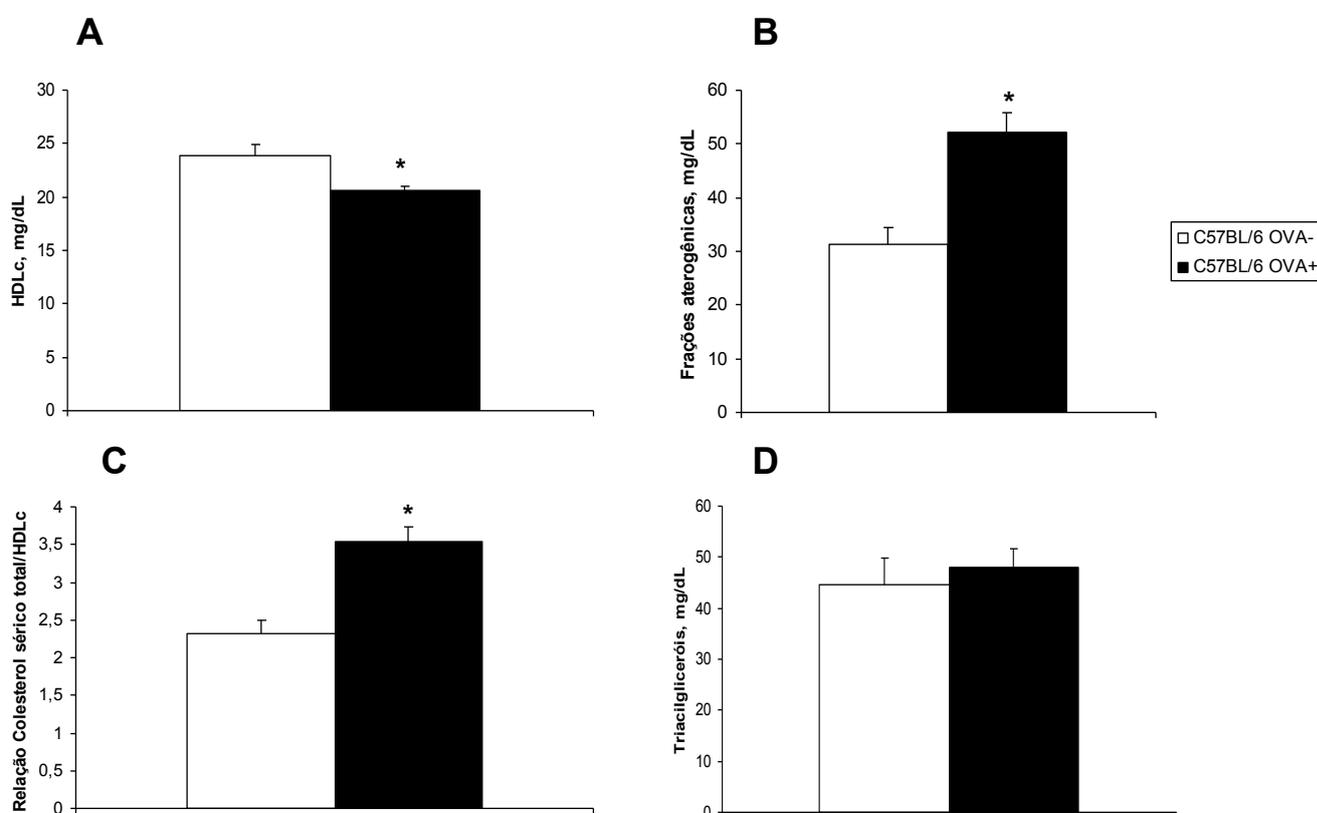
Em camundongos C57BL/6 e em LDLr-/- foi observado diminuição nas concentrações de colesterol sérico do desafio oral para a término do experimento (Figuras 14 e 16).

Os níveis de triacilgliceróis não foram alterados pela indução da alergia alimentar tanto em camundongos C57BL/6 como em camundongos LDLr -/-(Figuras 15 e 17D).



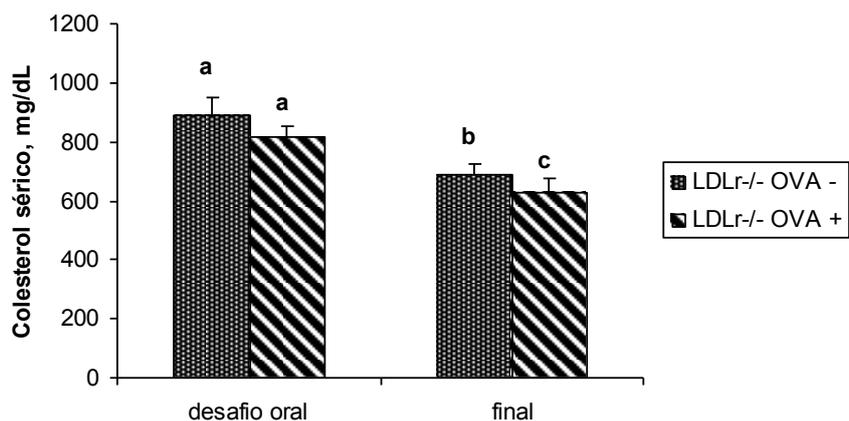
**Figura 14: Colesterol sérico total de camundongos C57BL/6.**

Os resultados foram expressos em mg/dL de colesterol. n=6 para cada grupo. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Letras distintas representam  $p < 0,05$  pelo teste t student. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).



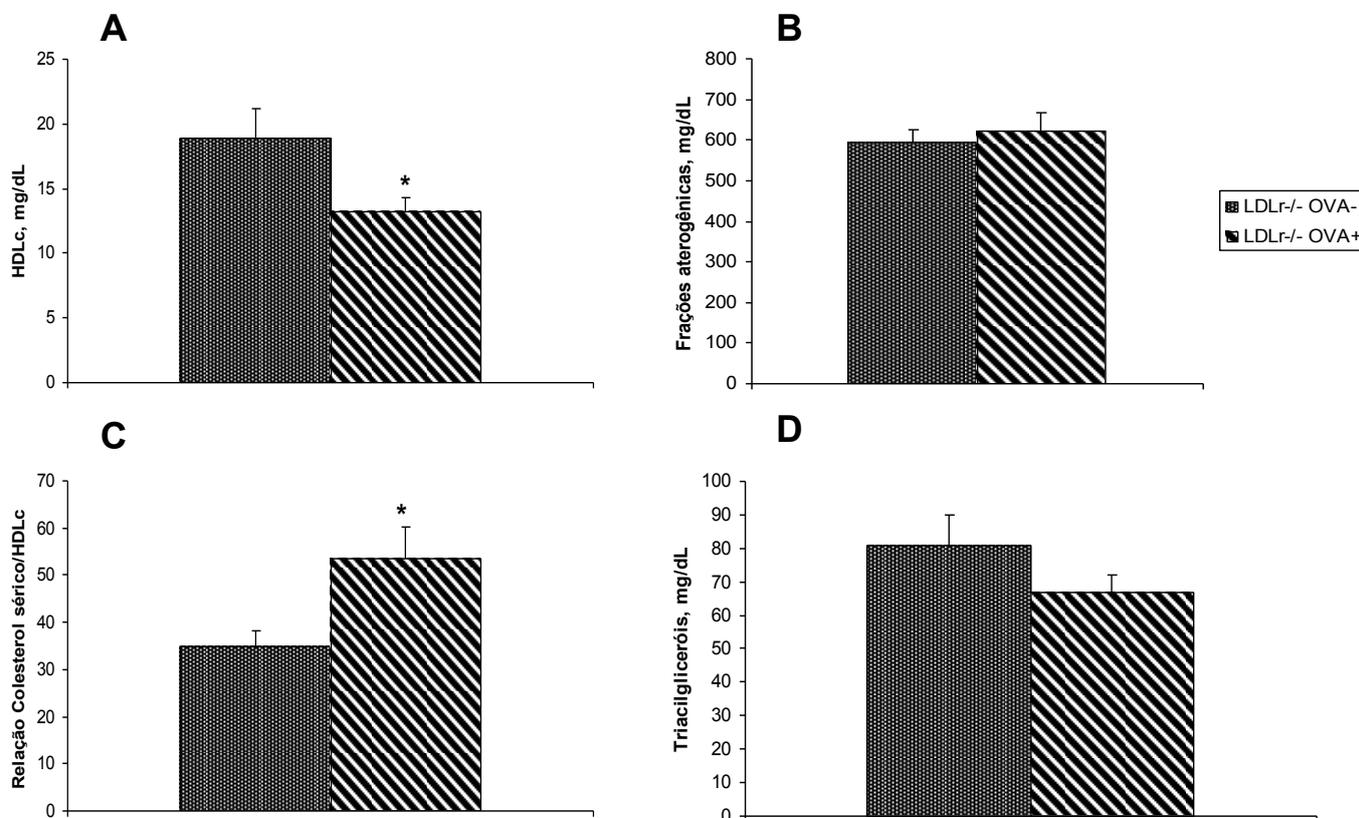
**Figura 15: HDLc, Frações aterogênicas, Relação Colesterol sérico/HDLc e Triacilgliceróis de camundongos C57BL/6.**

Os resultados foram expressos em mg/dL de HDLc (A), de frações aterogênicas VLDL, IDL e LDL (B), da relação colesterol sérico/HDLc (C) e de Triacilgliceróis (D). n=6 para cada grupo. \* $p < 0,05$  pelo teste t student. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo.



**Figura 16: Colesterol sérico total de camundongos LDLr-/-.**

Os resultados foram expressos em mg/dL de colesterol. n=9 a 13. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Letras distintas representam p < 0,05 pelo teste t student. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).



**Figura 17: HDLc, Frações aterogênicas, Relação Colesterol sérico/HDLc e Triacilgliceróis de camundongos LDLr-/-.**

Os resultados foram expressos em mg/dL de HDLc (A), de frações aterogênicas VLDL, IDL e LDL (B), da relação colesterol sérico/HDLc (C) e de Triacilgliceróis (D). n=9 a 13. \*p < 0,05 pelo teste t student. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo.

## 4.2.2 - Análise do metabolismo lipídico

A absorção de lipídeos e de colesterol foi determinada de forma indireta por meio das concentrações de lipídeos totais e de colesterol no fígado, sendo este o principal órgão envolvido no metabolismo lipídico. A sensibilização com o antígeno, não modificou o conteúdo hepático de lipídeos e de colesterol em camundongos C57BL/6 e em LDLr nocaute. Da mesma maneira, foi realizada a dosagem do conteúdo de lipídeos totais e de 3 alfa-OH-esteróides no ceco como forma indireta de mensurar a excreção desses compostos. Não foi observada alteração na concentração de lipídeos e de colesterol em camundongos C57BL/6 e LDLr-/- sensibilizados, apesar da tendência à redução de lipídeos no grupo LDLr-/- OVA+ ( $p=0,07$ )(Tabela 3).

**Tabela 3:** Lipídeos e colesterol do fígado e do ceco.

	C57BL/6		LDLr-/-	
	OVA-	OVA+	OVA-	OVA+
Lipídeos hepáticos <sup>a</sup> (mg/g de fígado)	126±15,57	140,9±8,88	123,63±6,91	123,63±8,87
Colesterol hepático <sup>a</sup> (mg/g de fígado)	6,43±1,05	7,43±1,07	7,09±1,06	6,99±1,15
Lipídeos cecais <sup>b</sup> (mg/g de conteúdo cecal)	39±5,46	38,75±9,53	42,85±10,16	22,5±4,53
3- $\alpha$ -OH esteróides <sup>b</sup> (mg/g de conteúdo cecal)	4,12±0,48	4,54±0,54	5,39±0,8	4,78±0,69

$p > 0,05$  pelo teste t student. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

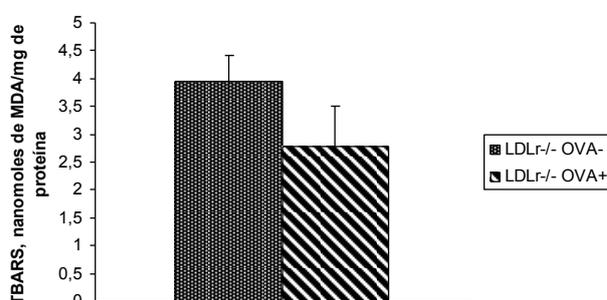
A- C57BL/6 n=10 a 11, LDLr-/- n=11.

B- C57BL/6 n=8 a 10, LDLr-/- n=7 a 8.

### 4.3 - Determinação do efeito da alergia alimentar no estresse oxidativo em camundongos susceptíveis para a aterosclerose.

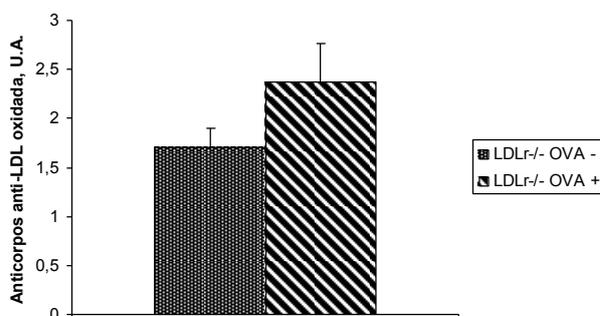
Como o modelo de alergia alimentar induziu a um perfil de dislipidemia, sendo este um fator de risco para a aterosclerose, o estresse oxidativo também foi averiguado uma vez que este propicia a oxidação de LDL e conseqüente aterogênese. A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada no fígado, principal órgão envolvido no metabolismo lipídico. A alergia alimentar não alterou as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado de camundongos deficientes pra o receptor de LDL (Figura 18).

Os anticorpos anti-LDL oxidada foram quantificados no soro dos camundongos susceptíveis para a doença já que a LDL oxidada é o principal antígeno que desencadeia a aterogênese. A alergia alimentar também não causou influência sobre este parâmetro (Figura 19).



**Figura 18: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado de camundongos LDLr-/-.**

Os resultados foram expressos em nanomoles de MDA (malondialdeído) por miligrama de proteína. LDLr-/- n=5 a 6.  $p>0,05$  pelo teste t student. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo.



**Figura 19: Anticorpos anti-LDL oxidada de camundongos LDLr-/-.**

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.) da razão entre a absorbância da LDL oxidada pela LDL nativa. LDLr-/- n=6.  $p>0,05$  pelo teste t student. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo.

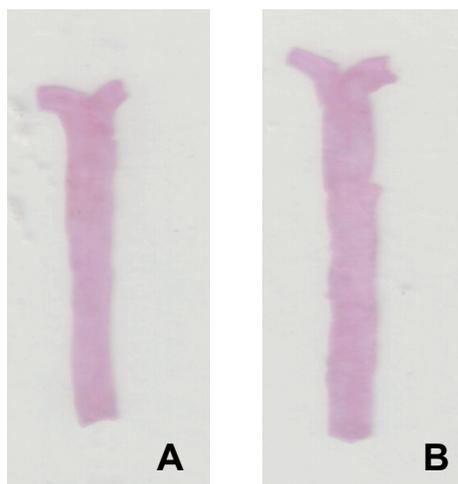
#### 4.4 - Estudo da alergia alimentar na aterogênese em camundongos C57BL/6 e LDLr/-.

##### 4.4.1- Camundongos C57BL/6

Uma vez que a alergia alimentar experimental acarretou um perfil lipídico pró-aterogênico em camundongos C57BL/6 que se alimentaram com dieta contendo colesterol, investigamos se essas alterações no perfil lipídico seriam suficientes para induzir a aterogênese nesses animais que não desenvolvem a doença espontaneamente.

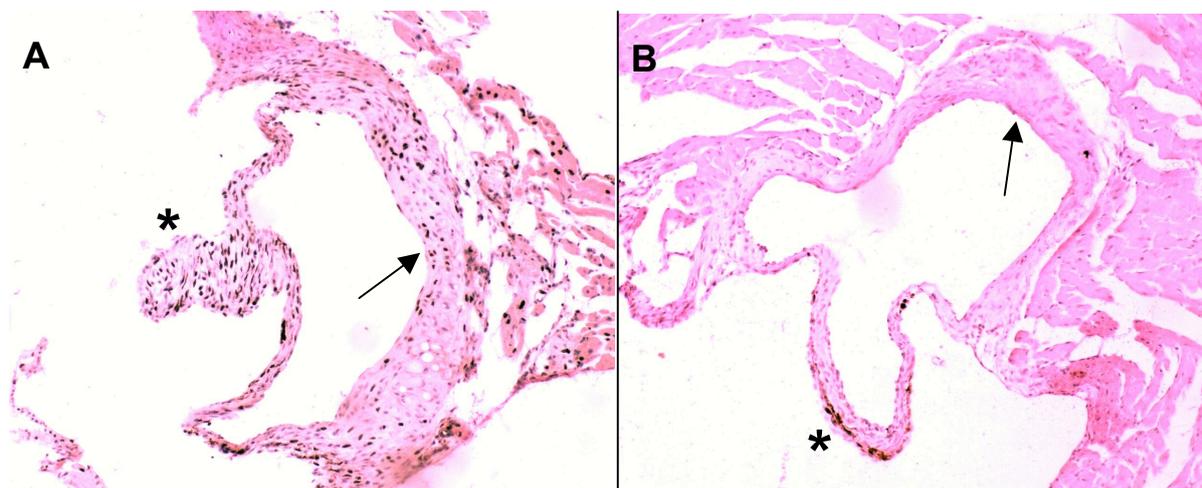
A aorta torácica e abdominal de camundongos C57BL/6 foi submetida à coloração com Sudan IV para lipídios neutros. Apesar do perfil lipídico pró-aterogênico desses animais, não foi detectada a deposição de lipídios nesse local (Figura 20).

A raiz aórtica foi submetida à coloração com hematoxilina-eosina para investigar se haveria formação de lesões ateroscleróticas nesse sítio. Concordando com a deposição lipídica na aorta torácica e abdominal, não foram vistas lesões neste sítio em camundongos selvagens (Figura 21).



**Figura 20: Imagens da superfície interna de aortas torácica e abdominal de camundongos C57BL/6.**

As aortas foram coradas com Sudan IV não sendo notadas áreas de deposição lipídica (ausência de pontos vermelhos). A- aorta representativa do grupo C57BL/6 OVA- e B- aorta representativa do grupo C57BL/6 OVA+.



**Figura 21: Raiz aórtica de camundongos C57BL/6.**

A e B- Aspecto histológico da raiz da aorta de camundongos C57BL/6. A- representativo do grupo C57BL/6 OVA- e B- Representativo do grupo C57BL/6 OVA+. Os cortes foram corados com H&E, aumento de 100X. As setas apontam a parede da artéria com ausência de lesões ateroscleróticas e as válvulas aórticas que são as referências anatômicas estão representadas por asteriscos.

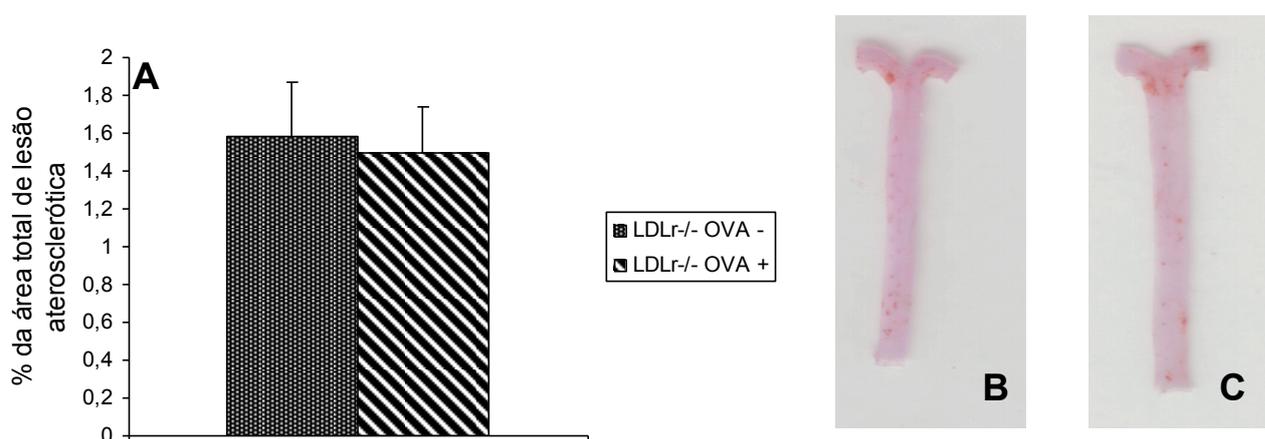
#### 4.4.2 - Camundongos LDLr-/-

Em camundongos susceptíveis para a aterosclerose, avaliamos se alergia alimentar seria capaz de alterar o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Camundongos deficientes para o gene do receptor de LDL foram alimentados com dieta contendo colesterol por 56 dias, sendo então, sacrificados.

Primeiramente, foi analisada a deposição lipídica na aorta torácica e abdominal. A alergia alimentar não exerceu influência sobre a área de lesão aterosclerótica no local (Figura 22). Posteriormente a raiz aórtica foi avaliada, sendo este o primeiro sítio de aterogênese em camundongos. A alergia alimentar também não foi capaz de modificar o desenvolvimento da aterosclerose na região da válvula aórtica (Figura 23 e 26A-D).

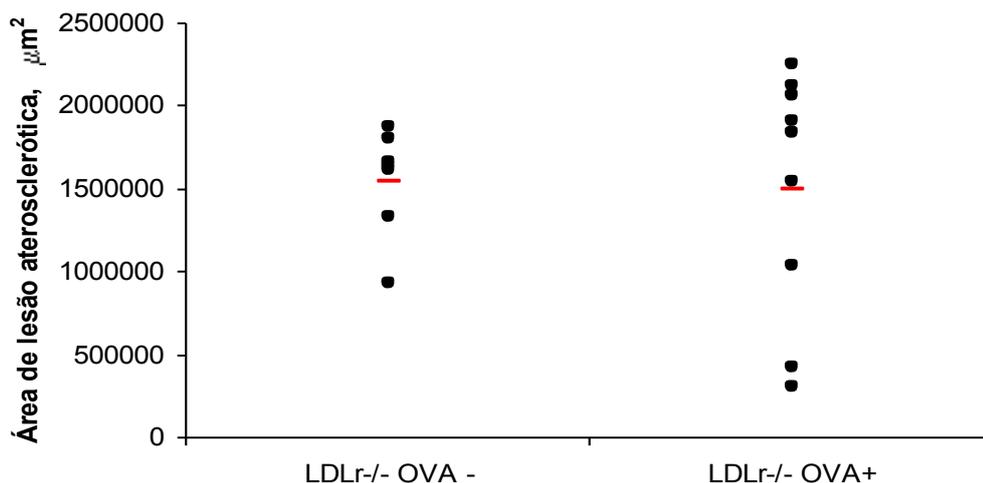
Visto que a alergia alimentar não afetou a área de lesão aterosclerótica, mas reduziu a lipoproteína anti-inflamatória HDL, procedemos à verificação se a indução da alergia alimentar poderia alterar o número de células inflamatórias na raiz aórtica. No entanto, não foi possível observar alterações em animais alérgicos quanto a esse parâmetro (Figuras 24 e 26E-F).

A instabilidade da placa aterosclerótica também foi avaliada por meio da mensuração do conteúdo de colágeno, sendo um indicativo de progressão da lesão aterosclerótica que pode ocasionar a formação de trombos. Não houve diferença estatística entre o percentual da área de colágeno dos grupos controle e com alergia alimentar ( $28 \pm 8\%$  e  $18 \pm 11\%$ ) (Figuras 25 e 26G-H).



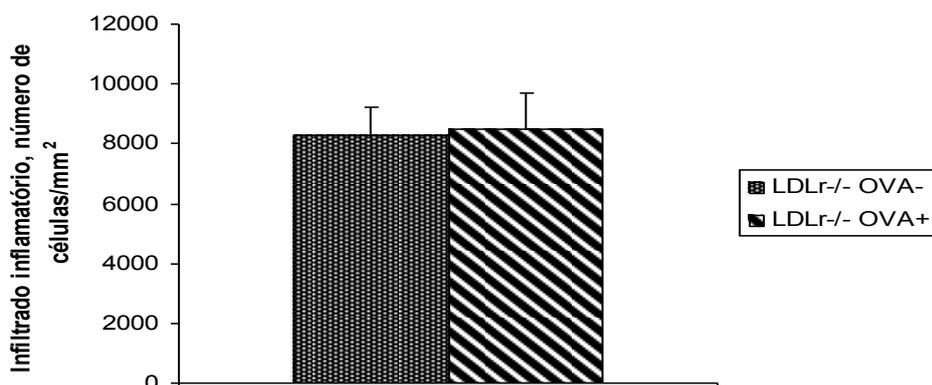
**Figura 22: Lesões ateroscleróticas na aorta torácica e abdominal de camundongos LDLr-/-.**

A- Porcentagem de deposição lipídica em aortas torácica e abdominal. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de deposição lipídica em aortas. LDLr -/- n=11 a 13.  $p>0,05$  pelo teste t student. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina). B e C- Imagens das superfícies internas de aortas torácica e abdominal. As aortas foram coradas com Sudan IV e as áreas de deposição lipídica estão representadas pelos pontos vermelhos. B- aorta representativa do grupo LDLr -/- OVA- e C- aorta representativa do grupo LDLr -/- OVA+.



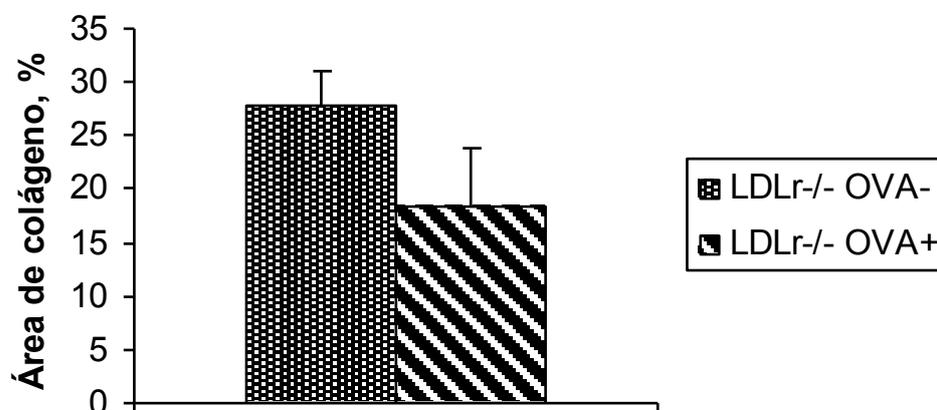
**Figura 23: Lesão aterosclerótica na raiz aórtica de camundongos LDLr-/-.**

Área de lesão aterosclerótica na raiz aórtica. Os resultados foram expressos como média da área da lesão em micrômetros quadrados. LDLr -/- n=7 a 9.  $p>0,05$  pelo teste t student. Linhas horizontais representam a média de cada grupo. Legenda: OVA- (não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).



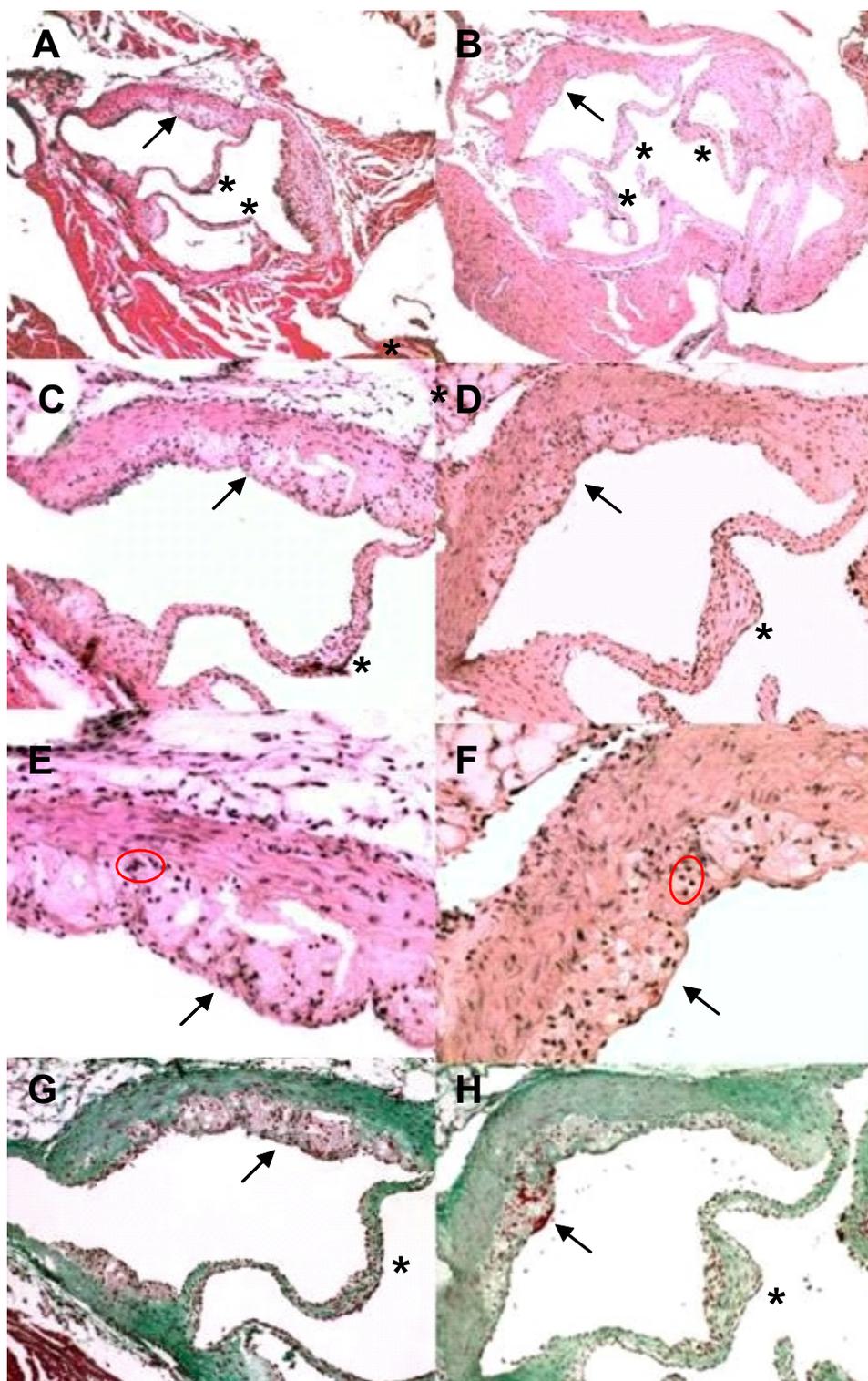
**Figura 24: Infiltrado inflamatório na área de lesão aterosclerótica e musculatura adjacente de camundongos LDLr-/-.**

Os resultados foram expressos como média do número de células por área medida em milímetros quadrados. LDLr -/- n=5.  $p>0,05$  pelo teste t student. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Legenda: OVA-(não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).



**Figura 25: Área de colágeno na raiz aórtica de camundongos LDLr-/- .**

Os resultados foram expressos como média do percentual de colágenona raiz aórtica. LDLr -/- OVA- n=6, LDLr -/- n=5.  $p>0,05$  pelo teste t student. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão de cada grupo. Legenda: OVA-(não sensibilizados) e OVA+ (sensibilizados com ovalbumina).



**Figura 26: Aspecto histológico da raiz aórtica de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.**

A, C, E, G cortes representativos do grupo OVA<sup>-</sup>. B, D, F, H cortes representativos do grupo OVA<sup>+</sup>. A a F cortes corados com H&E. G e H cortes corados com Tricômio de Gômori. A e B aumento de 40X. C, D, G, H aumento de 100X. E e F aumento de 200X. As lesões ateroscleróticas estão apontadas por setas, as válvulas aórticas estão representadas por asteriscos, as células inflamatórias estão circuladas e o colágeno foi corado de verde.

## **5- DISCUSSÃO**

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imunológica adversa às proteínas alimentares sendo uma reação mediada por IgE com predominância de resposta do tipo 2 (IL-4, IL-3, IL-5 e IL-13) (SICHERER e SAMPSON, 2006).

Modelos de alergia alimentar experimental são importantes para o estudo da patofisiologia da doença e dos mecanismos envolvidos na resposta alérgica (UNTERSMAJR e JENSEN-JAROLIM, 2006). A escolha do modelo animal pode afetar o estudo dramaticamente. A predisposição genética é fundamental para uma resposta alérgica efetiva (HELM e BURKS, 2002). Camundongos BALB/c têm sido frequentemente utilizados em modelos de alergia alimentar devido à sua grande produção de IgE (DEARMAN e KIMBER, 2005). Em contrapartida, camundongos C57BL/6 são considerados mais resistentes à indução da sensibilização com o antígeno (KWEON *et al.*, 2000). Este é o primeiro estudo que investiga a indução de alergia alimentar utilizando o modelo de camundongo deficiente para o receptor de LDL, que apresenta como consequência, a susceptibilidade para a aterosclerose.

Primeiramente, comprovamos a indução da alergia alimentar por meio da quantificação das imunoglobulinas IgE e IgG1 anti-OVA. A imunoglobulina IgE é aumentada em pacientes com alergia alimentar, sendo um dos parâmetros mais importantes no diagnóstico da doença (SAMPSON, 1999b). Camundongos sensibilizados apresentaram níveis aumentados de IgE-anti OVA durante as 5 semanas em que foram desafiados oralmente com a solução de clara de ovo. No entanto, os níveis de IgE em camundongos susceptíveis para a aterosclerose reduziram do desafio oral para o término do experimento.

Hipotetizamos que a redução de IgE observada com o passar do tempo experimental pode ter ocorrido devido ao efeito supressor de células T reguladoras. Diferentes subtipos de células T reguladoras podem regular a produção de anticorpos ao agirem em linfócitos B. Um dos mecanismos propostos é por meio de citocinas IL-10 que são produzidas por essas células e contra regulam a produção de anticorpos IgE específicas para o antígeno. Além desse efeito, as células T reguladoras contribuem para o controle da alergia pela supressão de células apresentadoras de antígeno que conduzem à geração de células Th2 efectoras, por meio da supressão de mastócitos, basófilos e eosinófilos e através da supressão direta de células Th2 (AKDIS *et al.*, 2005).

Camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam uma resposta Th1 preponderante já que esses animais desenvolvem aterosclerose e nesta doença há um forte papel de citocinas como

TNF- $\alpha$  (BRANEN *et al.*, 2004) e IFN- $\gamma$  (GUPTA *et al.*, 1997). Com a progressão da lesão aterosclerótica a resposta Th1 é exacerbada. Na tentativa de regular o processo inflamatório que causa dano tecidual, ocorre a indução de células T reguladoras (GUARNER *et al.*, 2006). Células apresentadoras de antígeno (APCs) podem ser condicionadas à indução de células T reguladoras por meio de fatores como lipídeos da parede celular de parasitas (VAN DER KLEIJ *et al.*, 2002) ou por proteínas heat shock de microorganismos (VAN EDEN *et al.*, 2005). Vários antígenos já foram identificados como promotores da aterogênese. Além da LDL oxidada, proteínas heat shock e microorganismos também estão envolvidos no processo aterosclerótico (HANSSON, 2005). Dessa forma, é possível que células T reguladoras tenham controlado o processo alérgico. Células T reguladoras já foram encontradas em lesões ateroscleróticas (MOR *et al.*, 2007) sendo que essas controlam o processo inflamatório (MALLAT *et al.*, 2003).

Além da redução dos níveis de IgE com o passar do tempo experimental, camundongos LDLr-/- também apresentaram menor aversão à solução de clara de ovo do que camundongos C57BL/6. A ligação entre aversão às proteínas alergênicas e níveis aumentados de IgE já foi descrita (BASSO *et al.*, 2003). Neste estudo, o tratamento com anticorpos anti-IgE 7 dias antes do desafio oral preveniu a aversão à ingestão de clara de ovo por camundongos BALB/c sensibilizados com OVA. Assim, é possível que a redução dos níveis de IgE com o passar do tempo experimental tenha contribuído com a menor aversão à solução de clara de ovo a 20% nos camundongos LDLr-/- quando comparado aos selvagens.

O peso corpóreo dos animais foi outro parâmetro avaliado já que camundongos BALB/c submetidos ao mesmo modelo de alergia alimentar apresentam 20% de perda de peso (SALDANHA *et al.*, 2004). Em camundongos C57BL/6, não foi observado emagrecimento tanto no presente estudo como no trabalho desenvolvido anteriormente por Moreira (2006). A perda de peso em camundongos BALB/c parece estar relacionada à prevalência da resposta Th2 descrita para esta linhagem que favorece a indução da alergia alimentar. Como em camundongos C57BL/6 prevalece a resposta Th1 (GORHAM *et al.*, 1996; YAGI *et al.*, 2006), a resposta imunológica frente à indução da alergia é mais branda, sendo notado níveis inferiores de IgE em comparação aos camundongos BALB/c (DOURADO, 2006; MOREIRA, 2006). Os camundongos LDLr-/- também não perderam peso à semelhança de camundongos C57BL/6. Esse resultado era esperado, uma vez que os camundongos C57BL/6 são o fundo genético dos camundongos LDLr-/-.

Esta consideração de que a perda de peso parece estar relacionada a fatores imunológicos dependente de citocinas foi feita já que o emagrecimento não foi associado a um menor consumo de ração (SALDANHA *et al.*, 2004) ou a um desequilíbrio dietético de proteínas (MOREIRA, 2006). Em nosso estudo, foi realizada uma restrição alimentar discreta aos grupos controles já que estes ingeriram mais dieta do que o grupo sensibilizado. Porém, essa restrição não foi suficiente para influenciar no peso corporal dos camundongos.

Apesar da ausência da perda de peso corpóreo, camundongos C57BL/6 apresentam perda de gordura abdominal, fato já confirmado anteriormente (MOREIRA, 2006). No entanto, em camundongos deficientes para o gene do receptor de LDL esta perda de gordura não foi notada. O perfil de citocinas Th1 predominante devido ao desenvolvimento da aterogênese pode ter contido a resposta imunológica Th2 e, conseqüentemente, os sinais clínicos da alergia alimentar foram minimizados nos animais LDLr-/-.

A ausência de perda de gordura abdominal, a menor aversão à solução de clara de ovo e os níveis diminuídos de IgE com o passar do tempo experimental evidenciam que camundongos LDLr/- são mais resistentes à alergia alimentar do que camundongos C57BL/6.

Posteriormente, observamos a morfologia do intestino dos animais já que a alergia alimentar pode ocasionar dano à mucosa intestinal. Sintomas gastrointestinais ocorrem em 50% dos pacientes com a doença. A fase tardia das respostas alérgicas, que ocorre de 2 a 24 horas após o desafio com o antígeno, é caracterizada por infiltração celular no tecido de granulócitos (basófilos e eosinófilos) e linfócitos T. A fase crônica é resultado de repetitivas fases tardias sendo acompanhada pela dilatação das artérias, aumento da permeabilidade vascular, estímulo de nervos sensoriais e dano na função gastrointestinal (BISCHOFF e CROWE, 2005).

O jejuno proximal foi a região escolhida já que nessa porção ocorre absorção dietética de proteínas (FREEMAN *et al.*, 1979) e, conseqüentemente, poderia haver inflamação no local em resposta ao antígeno alimentar. Em camundongos alérgicos C57BL/6 e LDLr/- não foram observadas alterações histológicas evidentes como inflamação ou edema. Saldanha e colaboradores (2004) relataram que em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina, ingerindo solução de clara de ovo durante 3 semanas, as alterações histológicas foram suaves. Apesar do estímulo imunológico

persistente que ocorre em resposta à contínua ingestão do antígeno, mecanismos imunológicos regulatórios na mucosa intestinal preveniram a patologia no local.

Após confirmar e caracterizar o modelo de alergia alimentar em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, investigamos o efeito desse modelo no perfil e metabolismo lipídico. Esta avaliação justifica-se já que no modelo de alergia à ovalbumina foi observado caquexia e anorexia nos camundongos alérgicos (SALDANHA *et al.*, 2004) que podem ser explicadas por alterações metabólicas e imunológicas devido à reação de hipersensibilidade imediata (MOREIRA, 2006).

Camundongos C57BL/6 OVA<sup>+</sup> apresentaram um perfil lipídico pró-aterogênico com aumento do colesterol total e frações aterogênicas ao término do experimento, além da redução da HDL. Já em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> OVA<sup>+</sup> foi notado redução do colesterol total sérico ao final do experimento devido à redução do colesterol em HDL. As frações aterogênicas VLDL, IDL e LDL não foram alteradas pela alergia alimentar nesses animais, porém esses camundongos também apresentaram perfil lipídico pró-aterogênico.

Processos infecciosos e inflamatórios promovem uma variedade de alterações conhecida como resposta de fase aguda. Nesta fase, ocorre um distúrbio característico no metabolismo lipídico com aumento das concentrações de triacilgliceróis séricos e decréscimo na HDL. Mudanças no colesterol total e na LDL também podem ocorrer. Essas alterações têm como finalidade evitar injúria tecidual e aumentar a disponibilidade energética para as células imunológicas envolvidas no processo (ESTEVE *et al.*, 2005).

A redução na HDL observada em camundongos sensibilizados pode ter ocorrido devido ao aumento do metabolismo energético provocado pelo quadro alérgico. Citocinas podem inibir o efluxo de colesterol para as células já que reduzem a expressão do gene ABC1 e aumentam a concentração intracelular de colesterol. Estas alterações podem explicar os baixos níveis de HDL e apo A-I durante respostas inflamatórias (ESTEVE *et al.*, 2005).

Já o aumento das frações aterogênicas dos camundongos C57BL/6 OVA<sup>+</sup> podem ser explicadas em consequência à hidrólise de triacilgliceróis nos adipócitos. Os triacilgliceróis são hidrolizados em ácidos graxos que são reesterificados no fígado e liberados na circulação em VLDLs (RADER, 1995). A redução na gordura abdominal de camundongos C57BL/6 reforça esta hipótese. Em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> não ocorreu aumento de lipoproteínas aterogênicas mas também não houve redução de gordura abdominal.

Em lipólise, é comum ser observado aumento dos níveis séricos de triacilglicerol (RADER, 1995). No entanto, esses níveis não foram alterados em camundongos C57BL/6 alérgicos. Existe a possibilidade dos níveis de ácidos graxos livres séricos estarem aumentados ou de ser a alta na taxa metabólica, com conseqüente consumo de triacilgliceróis, que manteve os níveis semelhantes ao de camundongos controles.

Camundongos deficientes para o receptor de LDL apresentam altos níveis LDL (ISHIBASHI *et al.*, 1993) sendo possível que a redução de lipoproteínas aterogênicas não tenha sido notada devido a estes níveis extremos.

Outra hipótese para explicar as alterações descritas pode estar relacionada com papel da histamina no metabolismo lipídico e aterogênese. A histamina é sintetizada por mastócitos e basófilos circulantes estando envolvida no desenvolvimento da aterosclerose e nas doenças arteriais coronarianas (KOVANEN, 1995). Os mastócitos podem estimular a captação de LDL pelos macrófagos e células musculares levando à formação de células espumosas (KOKKONEN e KOVANEN, 1987). Liao e colaboradores (1997) sugeriram que a regulação de lipoproteínas no plasma poderia ser outro mecanismo pelo qual a histamina influencia no desenvolvimento da aterosclerose. Para testar tal hipótese, ratos Sprague-Dawley receberam injeção intraperitoneal com C48/80, que induz a liberação de histamina endógena, ou com histamina sendo sacrificados 6 horas depois. Houve diminuição de HDL sérica e supressão da expressão do receptor de LDL no fígado que apresenta importante papel na regulação dos níveis séricos de LDL (LIAO *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, a HDL foi reduzida em camundongos C57BL/6 e LDLr/- alérgicos. Existe a possibilidade da redução de HDL ter ocorrido devido à constante liberação de histamina pelos mastócitos. Os mastócitos são células efetoras típicas nas reações alérgicas. Esses apresentam receptores de superfície (FcεRI) e ao se ligarem às várias moléculas de IgE, liberam histamina (PRUSSIN e METCALFE, 2006).

Já as frações aterogênicas VLDL, IDL e LDL aumentaram apenas em camundongos C57BL/6. Como a histamina diminui a expressão do receptor de LDL no fígado (LIAO *et al.*, 1997), os níveis séricos de LDL aumentaram. Este efeito não pôde ser visto em camundongos LDLr/- pois este receptor é ausente nesses animais. Apesar da liberação de histamina nesse modelo de alergia alimentar ainda não ter sido investigada, é sabido que a produção de IgE é constante em resposta ao antígeno administrado oralmente .

O efeito do modelo de alergia alimentar no metabolismo lipídico foi primeiramente investigado por Moreira (2006). A sensibilização com ovalbumina promoveu aumento dos lipídeos no fígado de camundongos C57BL/6 e aumento no colesterol do fígado de camundongos BALB/c e C57BL/6. Em nosso estudo, entretanto, a alergia alimentar não teve efeito nos lipídeos e colesterol do fígado de camundongos C57BL/6 e LDLr-/-. No estudo de Moreira (2006), o desafio oral com a solução de clara de ovo se estendeu por 3 semanas. Já no presente estudo, os camundongos tiveram contato com o antígeno por via oral durante 5 semanas. Além disso, no estudo de Moreira os camundongos receberam dieta comercial para roedores e em nosso estudo foi ofertada dieta AIN93G modificada contendo 1,25% de colesterol. Tempo experimentais e dietas diferentes podem explicar a discordância nos resultados.

A excreção de lipídeos e de colesterol foi mensurada no ceco. Não foram encontradas diferenças entre camundongos C57BL/6 e LDLr/- sensibilizados com os controles. Esse dado corrobora com a ausência de inflamação e edema vistos na análise histológica já que um dano ou aumento da permeabilidade da mucosa poderia causar redução na absorção de lipídeos e, conseqüente, aumento na excreção dos mesmos.

Além da dislipidemia, o estresse oxidativo é outro fator que desencadeia a aterogênese. A LDL nativa não é captada pelos macrófagos, sendo a oxidação da LDL pré-requisito para a captação pelo macrófago e desenvolvimento da placa (GOLDSTEIN *et al.*, 1979).

Com a finalidade de avaliar o efeito do modelo de alergia alimentar sobre outro parâmetro que influencia na aterogênese, mensuramos a peroxidação lipídica no fígado e realizamos a quantificação indireta da oxidação de lipoproteínas LDL. Camundongos LDLr/- sensibilizados não apresentaram diferença nessas análises quando comparado aos controles.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o aumento de colesterol total, LDL colesterol e triacilgliceróis bem como a redução de HDL são fatores de risco de primeira importância para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ROSENSON e TANGNEY, 1998). Paralelamente a fatores de risco tradicionais, a contribuição da inflamação e da resposta imunológica nesse processo tem sido evidenciada nas últimas décadas (ROSS, 1999). Como camundongos C57BL/6 sensibilizados apresentaram perfil lipídico pró-aterogênico e foram alimentados com dieta contendo colesterol durante 8 semanas, investigamos se a alergia alimentar nesses animais seria capaz de promover

aterogênese. As aortas torácica e abdominal foram submetidas à coloração com Sudan IV que cora lipídios neutros. Não foram encontrados pontos de deposição lipídica na aorta de camundongos C57BL/6 sensibilizados com ovalbumina. A raiz aórtica foi outro local avaliado sendo este o principal sítio de ateroma em camundongos (VANDERLAAN *et al.*, 2004). Novamente não foram encontradas placas ateroscleróticas no local.

Thompson (1969) foi o primeiro a conseguir induzir aterosclerose em camundongos C57BL/6. Porém estes foram alimentados com dieta rica com 50% de gordura durante 5 semanas. No presente estudo os camundongos C57BL/6 ingeriram dieta contendo 7% de gordura e 1,25% de colesterol por 8 semanas. Este trabalho demonstra que a quantidade de gordura na dieta deve ser maior para indução da aterogênese.

A sensibilização com ovalbumina foi utilizada como estímulo imunológico para induzir aterogênese (NISHIZONO *et al.*, 1999). Ratos Brown Normay, que não desenvolvem a doença espontaneamente, foram sensibilizados com 500 µg/mL de ovalbumina e 3% de hidróxido de alumínio durante a 1<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas de experimento. Depois de 3 meses da primeira sensibilização com OVA, período em que receberam dieta aterogênica, foi notado um aumento da espessura da camada íntima da aorta ascendente dos animais. Assim é provável que o tempo experimental e um estímulo imunológico mais persistente seja necessário pra induzir aterogênese.

A aterosclerose é uma doença inflamatória progressiva caracterizada por acúmulo de lipídeos e de elementos fibrosos nas grandes artérias (LUSIS, 2000). A doença apresenta intensa atividade imunológica com predominância de citocinas Th1 tanto em modelos animais como também em placas ateroscleróticas humanas (HANSSON e LIBBY, 2006).

Vários trabalhos demonstram o envolvimento de vírus, de bactérias e de protozoários na aterosclerose (FAHDI *et al.*, 2003). Nesses estudos, a infecção acarretou um perfil de resposta pró-inflamatória Th1 que promoveu aumento da placa aterosclerótica.

Somente um estudo envolvendo a infecção com o helminto *Schistosoma mansoni* demonstrou redução no tamanho da lesão aterosclerótica em camundongos Apo E<sup>-/-</sup> possivelmente devido a uma resposta do tipo Th2 promovida pelo parasita (DOENHOFF *et al.*, 2002).

Assim como a resposta imunológica frente ao *S. mansoni*, a alergia alimentar também induz respostas Th2. No entanto, nesse modelo experimental não foi observado

redução na lesão aterosclerótica. Essas diferenças nos resultados podem ser devido a linhagem diferente de animais utilizadas no estudo ou mesmo da diferença nos sítios inflamatórios promovidos pelo *S. mansoni* e pela alergia alimentar.

A alergia alimentar é uma doença inflamatória crônica, assim como a aterosclerose. Porém, as doenças apresentam perfil de citocinas produzido pelas células TCD4<sup>+</sup>, opostos. O modelo experimental de alergia alimentar promoveu um perfil lipídico pró-aterogênico, sendo esse um dos principais fatores de risco para a doença.

Apesar do aumento da lesão aterosclerótica após sensibilização com proteínas já ter sido descrito (MINICK e MURPHY, 1973) essa foi a primeira vez que a sensibilização com proteínas foi utilizada para induzir resposta imunológica a um antígeno administrado por via oral.

No presente estudo, o modelo experimental de alergia alimentar crônica não foi capaz de alterar a área de lesão aterosclerótica em animais LDLr<sup>-/-</sup>, tanto na aorta torácica e abdominal, como na raiz aórtica. A composição da placa também foi avaliada por meio da mensuração do número de células inflamatórias e da deposição de colágeno, parâmetro relacionado com a instabilidade da placa aterosclerótica. Entretanto, esses parâmetros mantiveram-se inalterados pela indução da alergia alimentar em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

É importante ressaltar que os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram resistência à alergia alimentar com o passar do tempo experimental. Assim, a progressão da aterosclerose, com o aumento de citocinas Th1 e possível indução de células T reguladoras, pode ter impedido a influência de eventos associados com a inflamação alérgica crônica promovidos pelas citocinas Th2 na área e composição da lesão aterosclerótica. Além disso, o contínuo contato com o antígeno através do trato oral pode ter promovido uma imunomodulação, fazendo com que a placa aterosclerótica não tenha sua área modificada, já que a inflamação alérgica na mucosa intestinal foi controlada. Estudos envolvendo a infecção com *Toxoplasma gondii* (PORTUGAL *et al.*, 2004) e com *Leishmania major* (FERNANDES, 2006) evidenciaram a importância do processo inflamatório desencadeado pelos parasitas em aumentar as lesões ateroscleróticas em camundongos.

No entanto, surpreendentemente, o processo aterosclerótico foi capaz de melhorar o processo alérgico possivelmente por uma resposta supressora conduzida por células T

reguladoras que tornaram as animais mais resistentes à medida que a placa aterosclerótica se desenvolve.

## **6- SUMÁRIO DOS RESULTADOS**

- 1- Camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alérgicos foram mais resistentes à alergia alimentar com o passar do tempo experimental.
- 2- O modelo de alergia alimentar acarretou um perfil lipídico pró-aterogênico em camundongos C57BL/6 e LDLr<sup>-/-</sup> alérgicos.
- 3- O estresse oxidativo não foi afetado em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> alérgicos.
- 4- A alergia alimentar não promoveu aterogênese em camundongos C57BL/6 e não afetou o desenvolvimento e composição da lesão aterosclerótica em camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

## **7 – CONCLUSÃO**

A alergia alimentar experimental foi capaz de causar um perfil lipídico pró-aterogênico em camundongos C57BL/6 e LDLr<sup>-/-</sup> mas não afetou o desenvolvimento e composição da lesão aterosclerótica em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> já que esses tornam-se resistentes à alergia com o passar do tempo experimental e progressão da lesão aterosclerótica.

## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AKDIS, M., BLASER, K. e AKDIS, C. A. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. J Allergy Clin Immunol, v.116, n.5, Nov, p.961-8; quiz 969. 2005.

ALLAIN, C. C., POON, L. S., CHAN, C. S., RICHMOND, W. e FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem, v.20, n.4, Apr, p.470-5. 1974.

ALVAREZ-LEITE, J. Mecanismos de ação da goma guar sobre o metabolismo do colesterol: ausência de participação da flora microbiana. (Doutorado). Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

\_\_\_\_\_. Lipoproteínas e transporte de lipídios no organismo. In: Química Fisiológica. Rio de Janeiro: Atheneu. 1995. 17-31 p. (Química Fisiológica)

ALVAREZ-LEITE, J. I., OLIVEIRA, D. R. e PELUZIO, M. C. G. Dislipidemias. In: F. Neto (Ed.). Nutrição clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Dislipidemias, p.196-211

ANDERSON, J. A. Milk, eggs and peanuts: food allergies in children. Am Fam Physician, v.56, n.5, Oct 1, p.1365-74. 1997.

BASSO, A. S., PINTO, F. A., RUSSO, M., BRITTO, L. R., DE SA-ROCHA, L. C. e PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. J Neuroimmunol, v.140, n.1-2, Jul, p.69-77. 2003.

BERLINER, J. A., NAVAB, M., FOGELMAN, A. M., FRANK, J. S., DEMER, L. L., EDWARDS, P. A., WATSON, A. D. e LUSIS, A. J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation, v.91, n.9, May 1, p.2488-96. 1995.

BINDER, C. J., CHANG, M. K., SHAW, P. X., MILLER, Y. I., HARTVIGSEN, K., DEWAN, A. e WITZTUM, J. L. Innate and acquired immunity in atherogenesis. Nat Med, v.8, n.11, Nov, p.1218-26. 2002.

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

BLASI, F., DENTI, F., ERBA, M., COSENTINI, R., RACCANELLI, R., RINALDI, A., FAGETTI, L., ESPOSITO, G., RUBERTI, U. e ALLEGRA, L. Detection of Chlamydia pneumoniae but not Helicobacter pylori in atherosclerotic plaques of aortic aneurysms. J Clin Microbiol, v.34, n.11, Nov, p.2766-9. 1996.

BOCK, S. A. A critical evaluation of clinical trials in adverse reactions to foods in children. J Allergy Clin Immunol, v.78, n.1 Pt 2, Jul, p.165-74. 1986.

BOT, I., DE JAGER, S. C., ZERNECKE, A., LINDSTEDT, K. A., VAN BERKEL, T. J., WEBER, C. e BIESSEN, E. A. Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation, v.115, n.19, May 15, p.2516-25. 2007.

- BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. Nutr Rev, v.56, n.1 Pt 2, Jan, p.S5-18. 1998.
- BRANDTZAEG, P. E. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. Ann N Y Acad Sci, v.964, May, p.13-45. 2002.
- BRANEN, L., HOVGAARD, L., NITULESCU, M., BENGTSSON, E., NILSSON, J. e JOVINGE, S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.24, n.11, Nov, p.2137-42. 2004.
- BREITENEDER, H. e MILLS, E. N. Molecular properties of food allergens. J Allergy Clin Immunol, v.115, n.1, Jan, p.14-23; quiz 24. 2005.
- BUEGE, J. A. e AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol, v.52, p.302-10. 1978.
- BUFE, A. The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? Int Arch Allergy Immunol, v.117, n.4, Dec, p.215-9. 1998.
- BUONO, C., BINDER, C. J., STAVRAKIS, G., WITZTUM, J. L., GLIMCHER, L. H. e LICHTMAN, A. H. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.5, Feb 1, p.1596-601. 2005.
- BURKS, A. W., JAMES, J. M., HIEGEL, A., WILSON, G., WHEELER, J. G., JONES, S. M. e ZUERLEIN, N. Atopic dermatitis and food hypersensitivity reactions. J Pediatr, v.132, n.1, Jan, p.132-6. 1998.
- BURNETT, M. S., DURRANI, S., STABILE, E., SAJI, M., LEE, C. W., KINNAIRD, T. D., HOFFMAN, E. P. e EPSTEIN, S. E. Murine cytomegalovirus infection increases aortic expression of proatherosclerotic genes. Circulation, v.109, n.7, Feb 24, p.893-7. 2004.
- BURNETT, M. S., GAYDOS, C. A., MADICO, G. E., GLAD, S. M., PAIGEN, B., QUINN, T. C. e EPSTEIN, S. E. Atherosclerosis in apoE knockout mice infected with multiple pathogens. J Infect Dis, v.183, n.2, Jan 15, p.226-231. 2001.
- CHAMPE. Bioquímica Ilustrada. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. 446 p.
- CHEHADE, M. e MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. J Allergy Clin Immunol, v.115, n.1, Jan, p.3-12; quiz 13. 2005.
- CHUNG, B. H., SEGREST, J. P., RAY, M. J., BRUNZELL, J. D., HOKANSON, J. E., KRAUSS, R. M., BEAUDRIE, K. e CONE, J. T. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. Methods Enzymol, v.128, p.181-209. 1986.
- DANESH, J., KORETH, J., YOUNGMAN, L., COLLINS, R., ARNOLD, J. R., BALARAJAN, Y., MCGEE, J. e ROSKELL, D. Is Helicobacter pylori a factor in coronary atherosclerosis? J Clin Microbiol, v.37, n.5, May, p.1651. 1999.

DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. Am J Med Sci, v.323, n.1, Jan, p.3-10. 2002.

DAUGHERTY, A. e RATERI, D. L. Presence of LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptors in macrophages of atherosclerotic lesions from cholesterol-fed New Zealand and heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Arterioscler Thromb, v.14, n.12, Dec, p.2017-24. 1994.

DAVIES, D. F. Immunological aspects of atherosclerosis. Proc Nutr Soc, v.35, n.3, Dec, p.293-5. 1976.

DAVIES, D. F., DAVIES, J. R. e RICHARDS, M. A. Antibodies to reconstituted dried cow's milk protein in coronary heart disease. J Atheroscler Res, v.9, n.1, Jan-Feb, p.103-7. 1969.

DAVIES, D. F., JOHNSON, A. P., REES, B. W., ELWOOD, P. C. e ABERNETHY, M. Food antibodies and myocardial infarction. Lancet, v.1, n.7865, May 25, p.1012-4. 1974.

DEARMAN, R. J. e KIMBER, I. Characterisation of immune responses to food allergens in mice. Proc Nutr Soc, v.64, n.4, Nov, p.426-33. 2005.

DOENHOFF, M. J., STANLEY, R. G., GRIFFITHS, K. e JACKSON, C. L. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. Parasitology, v.125, n.Pt 5, Nov, p.415-21. 2002.

DOURADO, L. P. Participação das citocinas IL-10, IL-4, IL12 e IFN- gamma na aversão e alergia alimentar induzida à ovalbumina em camundongos. Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 74 p.

EPSTEIN, S. E., ZHOU, Y. F. e ZHU, J. Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. Circulation, v.100, n.4, Jul 27, p.e20-8. 1999.

ERICKSON, R. H. e KIM, Y. S. Digestion and absorption of dietary protein. Annu Rev Med, v.41, p.133-9. 1990.

ESTEVE, E., RICART, W. e FERNANDEZ-REAL, J. M. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. Clin Nutr, v.24, n.1, Feb, p.16-31. 2005.

FAHDI, I. E., GADDAM, V., GARZA, L., ROMEO, F. e MEHTA, J. L. Inflammation, infection, and atherosclerosis. Brain Behav Immun, v.17, n.4, Aug, p.238-44. 2003.

FAO. Proteins: [www.fao.org.br](http://www.fao.org.br).

FAZIO, S., BABAIEV, V. R., MURRAY, A. B., HASTY, A. H., CARTER, K. J., GLEAVES, L. A., ATKINSON, J. B. e LINTON, M. F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.9, Apr 29, p.4647-52. 1997.

- FERNANDES, L. R. Influência da infecção por Leishmania major no perfil lipídico e aterogênese em camundongos deficientes em apoE. Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 73 p.
- FERRARIS, R. P., VILLENAS, S. A. e DIAMOND, J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. Am J Physiol, v.262, n.6 Pt 1, Jun, p.G1047-59. 1992.
- FOLCH, J., LEES, M. e SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, v.226, n.1, May, p.497-509. 1957.
- FOSSATI, P. e PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. Clin Chem, v.28, n.10, Oct, p.2077-80. 1982.
- FREEMAN, H. J., KIM, Y. S. e SLEISENGER, M. H. Protein digestion and absorption in man. Normal mechanisms and protein-energy malnutrition. Am J Med, v.67, n.6, Dec, p.1030-6. 1979.
- FRIEDMAN, A. e WEINER, H. L. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.14, Jul 5, p.6688-92. 1994.
- FULEIHAN, R. L. Allergy, immunology, and related disorders. Curr Opin Pediatr, v.10, n.6, Dec, p.581-3. 1998.
- GENEST, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. J Inherit Metab Dis, v.26, n.2-3, p.267-87. 2003.
- GLASS, C. K. e WITZTUM, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. Cell, v.104, n.4, Feb 23, p.503-16. 2001.
- GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J Lipid Res, v.37, n.4, Apr, p.693-707. 1996.
- GOLDSTEIN, J. L., HO, Y. K., BASU, S. K. e BROWN, M. S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.1, Jan, p.333-7. 1979.
- GORHAM, J. D., GULER, M. L., STEEN, R. G., MACKAY, A. J., DALY, M. J., FREDERICK, K., DIETRICH, W. F. e MURPHY, K. M. Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.22, Oct 29, p.12467-72. 1996.
- GOTTO, A. M., JR., POWNALL, H. J. e HAVEL, R. J. Introduction to the plasma lipoproteins. Methods Enzymol, v.128, p.3-41. 1986.
- GREDMARK, S., BRITT, W. B., XIE, X., LINDBOM, L. e SODERBERG-NAUCLER, C. Human cytomegalovirus induces inhibition of macrophage differentiation by binding to human aminopeptidase N/CD13. J Immunol, v.173, n.8, Oct 15, p.4897-907. 2004.

- GUARNER, F., BOURDET-SICARD, R., BRANDTZAEG, P., GILL, H. S., MCGUIRK, P., VAN EDEN, W., VERSALOVIC, J., WEINSTOCK, J. V. e ROOK, G. A. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, v.3, n.5, May, p.275-84. 2006.
- GUPTA, S., PABLO, A. M., JIANG, X., WANG, N., TALL, A. R. e SCHINDLER, C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. J Clin Invest, v.99, n.11, Jun 1, p.2752-61. 1997.
- HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med, v.352, n.16, Apr 21, p.1685-95. 2005.
- HANSSON, G. K. e LIBBY, P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. Nat Rev Immunol, v.6, n.7, Jul, p.508-19. 2006.
- HELM, R. M. e BURKS, A. W. Animal models of food allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol, v.2, n.6, Dec, p.541-6. 2002.
- HIGGINS, S. C., LAVELLE, E. C., MCCANN, C., KEOGH, B., MCNEELA, E., BYRNE, P., O'GORMAN, B., JARNICKI, A., MCGUIRK, P. e MILLS, K. H. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. J Immunol, v.171, n.6, Sep 15, p.3119-27. 2003.
- HOFKER, M. H., VAN VLIJMEN, B. J. e HAVEKES, L. M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. Atherosclerosis, v.137, n.1, Mar, p.1-11. 1998.
- HSICH, E., ZHOU, Y. F., PAIGEN, B., JOHNSON, T. M., BURNETT, M. S. e EPSTEIN, S. E. Cytomegalovirus infection increases development of atherosclerosis in Apolipoprotein-E knockout mice. Atherosclerosis, v.156, n.1, May, p.23-8. 2001.
- HU, H., PIERCE, G. N. e ZHONG, G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Invest, v.103, n.5, Mar, p.747-53. 1999.
- HUBER, S. A., SAKKINEN, P., DAVID, C., NEWELL, M. K. e TRACY, R. P. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. Circulation, v.103, n.21, May 29, p.2610-6. 2001.
- ISHIBASHI, S., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L., GERARD, R. D., HAMMER, R. E. e HERZ, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest, v.92, n.2, Aug, p.883-93. 1993.
- JEON, H. e BLACKLOW, S. C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. Annu Rev Biochem, v.74, p.535-62. 2005.

- JEZIORSKA, M., MCCOLLUM, C. e WOOLLEY, D. E. Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries. J Pathol, v.182, n.1, May, p.115-22. 1997.
- JOHNSON, J. L., JACKSON, C. L., ANGELINI, G. D. e GEORGE, S. J. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.18, n.11, Nov, p.1707-15. 1998.
- KAARTINEN, M., PENTTILA, A. e KOVANEN, P. T. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. Circulation, v.90, n.4, Oct, p.1669-78. 1994.
- KALAYOGLU, M. V., LIBBY, P. e BYRNE, G. I. Chlamydia pneumoniae as an emerging risk factor in cardiovascular disease. Jama, v.288, n.21, Dec 4, p.2724-31. 2002.
- KARLSSON, M. R., RUGTVEIT, J. e BRANDTZAEG, P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. J Exp Med, v.199, n.12, Jun 21, p.1679-88. 2004.
- KAY, A. B. Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. Br Med Bull, v.56, n.4, p.843-64. 2000.
- KELLEY, J. L., CHI, D. S., ABOU-AUDA, W., SMITH, J. K. e KRISHNASWAMY, G. The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease. Mol Med Today, v.6, n.8, Aug, p.304-8. 2000.
- KNOFLACH, M., KIECHL, S., MAYR, A., WILLEIT, J., POEWE, W. e WICK, G. Allergic rhinitis, asthma, and atherosclerosis in the Bruneck and ARMY studies. Arch Intern Med, v.165, n.21, Nov 28, p.2521-6. 2005.
- KOKKONEN, J. O. e KOVANEN, P. T. Stimulation of mast cells leads to cholesterol accumulation in macrophages in vitro by a mast cell granule-mediated uptake of low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.84, n.8, Apr, p.2287-91. 1987.
- KOVANEN, P. T. Role of mast cells in atherosclerosis. Chem Immunol, v.62, p.132-70. 1995.
- KWEON, M. N., YAMAMOTO, M., KAJIKI, M., TAKAHASHI, I. e KIYONO, H. Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. J Clin Invest, v.106, n.2, Jul, p.199-206. 2000.
- KWON, T. W., KIM, D. K., YE, J. S., LEE, W. J., MOON, M. S., JOO, C. H., LEE, H. e KIM, Y. K. Detection of enterovirus, cytomegalovirus, and Chlamydia pneumoniae in atheromas. J Microbiol, v.42, n.4, Dec, p.299-304. 2004.
- LANGHEINRICH, A. C. e BOHLE, R. M. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. Virchows Arch, v.446, n.2, Feb, p.101-11. 2005.
- LIAO, W., RUDLING, M. e ANGELIN, B. Novel effects of histamine on lipoprotein metabolism: suppression of hepatic low density lipoprotein receptor expression and

reduction of plasma high density lipoprotein cholesterol in the rat. Endocrinology, v.138, n.5, May, p.1863-70. 1997.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.868-74. 2002.

LIBBY, P. e SHI, G. P. Mast cells as mediators and modulators of atherogenesis. Circulation, v.115, n.19, May 15, p.2471-3. 2007.

LINDSTEDT, K. A. e KOVANEN, P. T. Mast cells in vulnerable coronary plaques: potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. Curr Opin Lipidol, v.15, n.5, Oct, p.567-73. 2004.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. Nature, v.407, n.6801, Sep 14, p.233-41. 2000.

MACH, F., SUKHOVA, G. K., MICHETTI, M., LIBBY, P. e MICHETTI, P. Influence of Helicobacter pylori infection during atherogenesis in vivo in mice. Circ Res, v.90, n.1, Jan 11, p.E1-4. 2002.

MACKNESS, M. I. e DURRINGTON, P. N. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. Atherosclerosis, v.115, n.2, Jun, p.243-53. 1995.

MAGEN, E., BORKOW, G., BENTWICH, Z., MISHAL, J. e SCHARF, S. Can worms defend our hearts? Chronic helminthic infections may attenuate the development of cardiovascular diseases. Med Hypotheses, v.64, n.5, p.904-9. 2005.

MALLAT, Z., GOJOVA, A., BRUN, V., ESPOSITO, B., FOURNIER, N., COTTREZ, F., TEDGUI, A. e GROUX, H. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. Circulation, v.108, n.10, Sep 9, p.1232-7. 2003.

MASUCCI-MAGOULAS, L., GOLDBERG, I. J., BISGAIER, C. L., SERAJUDDIN, H., FRANCONI, O. L., BRESLOW, J. L. e TALL, A. R. A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia. Science, v.275, n.5298, Jan 17, p.391-4. 1997.

MCGUIRK, P., MCCANN, C. e MILLS, K. H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. J Exp Med, v.195, n.2, Jan 21, p.221-31. 2002.

MINICK, C. R. e MURPHY, G. E. Experimental induction of atheroarteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. II. Effect of repeatedly injected foreign protein in rabbits fed a lipid-rich, cholesterol-poor diet. Am J Pathol, v.73, n.2, Nov, p.265-300. 1973.

MOR, A., PLANER, D., LUBOSHITS, G., AFEK, A., METZGER, S., CHAJEK-SHAUL, T., KEREN, G. e GEORGE, J. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in

- experimental atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.27, n.4, Apr, p.893-900. 2007.
- MOREIRA, L. F. Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar. Patologia geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 99 p.
- MOUGENOT, N., LESNIK, P., RAMIREZ-GIL, J. F., NATAF, P., DICZFALUSY, U., CHAPMAN, M. J. e LECHAT, P. Effect of the oxidation state of LDL on the modulation of arterial vasomotor response in vitro. Atherosclerosis, v.133, n.2, Sep, p.183-92. 1997.
- MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat Rev Immunol, v.3, n.4, Apr, p.331-41. 2003.
- NICOLETTI, A., CALIGIURI, G. e HANSSON, G. K. Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. J Intern Med, v.247, n.3, Mar, p.397-405. 2000.
- NISHIZONO, S., KUSABA, M., ADAN, Y. e IMAIZUMI, K. Induction of atherosclerosis in Brown Norway rats by immunization with ovalbumin. Biosci Biotechnol Biochem, v.63, n.2, Feb, p.379-83. 1999.
- OHASHI, R., MU, H., YAO, Q. e CHEN, C. Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. Trends Cardiovasc Med, v.14, n.5, Jul, p.187-90. 2004.
- OLIVEIRA, D. R., PORTUGAL, L. R., CARA, D. C., VIEIRA, E. C. e ALVAREZ-LEITE, J. I. Gelatin intake increases the atheroma formation in apoE knock out mice. Atherosclerosis, v.154, n.1, Jan, p.71-7. 2001.
- ONUFRAK, S., ABRAMSON, J. e VACCARINO, V. Adult-onset asthma is associated with increased carotid atherosclerosis among women in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Atherosclerosis, Oct 10. 2006.
- PAIGEN, B., MORROW, A., BRANDON, C., MITCHELL, D. e HOLMES, P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. Atherosclerosis, v.57, n.1, Oct, p.65-73. 1985.
- PAIGEN, B., MORROW, A., HOLMES, P. A., MITCHELL, D. e WILLIAMS, R. A. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis, v.68, n.3, Dec, p.231-40. 1987.
- PALINSKI, W., ORD, V. A., PLUMP, A. S., BRESLOW, J. L., STEINBERG, D. e WITZTUM, J. L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. Arterioscler Thromb, v.14, n.4, Apr, p.605-16. 1994.
- PORTUGAL, L. R., FERNANDES, L. R., CESAR, G. C., SANTIAGO, H. C., OLIVEIRA, D. R., SILVA, N. M., SILVA, A. A., LANNES-VIEIRA, J., ARANTES, R. M., GAZZINELLI, R. T. e ALVAREZ-LEITE, J. I. Infection with *Toxoplasma gondii* increases atherosclerotic lesion in ApoE-deficient mice. Infect Immun, v.72, n.6, Jun, p.3571-6. 2004.

PRIOULT, G. e NAGLER-ANDERSON, C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? Immunol Rev, v.206, Aug, p.204-18. 2005.

PRUSSIN, C. e METCALFE, D. D. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol, v.117, n.2 Suppl Mini-Primer, Feb, p.S450-6. 2006.

RADER, D. J., WILSON, J. M. Gene Therapy for Lipid Disorders. In: Molecular Cardiovascular Medicine. New York: Scientific American. 1995. 97-114 p.

ROSENSON, R. S. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. Atherosclerosis, v.173, n.1, Mar, p.1-12. 2004.

ROSENSON, R. S. e TANGNEY, C. C. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. Jama, v.279, n.20, May 27, p.1643-50. 1998.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med, v.340, n.2, Jan 14, p.115-26. 1999.

SAIKKU, P., LEINONEN, M., MATTILA, K., EKMAN, M. R., NIEMINEN, M. S., MAKELA, P. H., HUTTUNEN, J. K. e VALTONEN, V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet, v.2, n.8618, Oct 29, p.983-6. 1988.

SALDANHA, J. C., GARGIULO, D. L., SILVA, S. S., CARMO-PINTO, F. H., ANDRADE, M. C., ALVAREZ-LEITE, J. I., TEIXEIRA, M. M. e CARA, D. C. 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.

SAMPSON, H. A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. J Allergy Clin Immunol, v.103, n.5 Pt 1, May, p.717-28. 1999a.

\_\_\_\_\_. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. J Allergy Clin Immunol, v.103, n.6, Jun, p.981-9. 1999b.

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. Curr Opin Genet Dev, v.14, n.3, Jun, p.271-9. 2004.

SEGREST, J. P., JONES, M. K., DE LOOF, H., BROUILLETTE, C. G., VENKATACHALAPATHI, Y. V. e ANANTHARAMAIAH, G. M. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. J Lipid Res, v.33, n.2, Feb, p.141-66. 1992.

SICHERER, S. H. Food allergy. Lancet, v.360, n.9334, Aug 31, p.701-10. 2002.

SICHERER, S. H. e SAMPSON, H. A. 9. Food allergy. J Allergy Clin Immunol, v.117, n.2 Suppl Mini-Primer, Feb, p.S470-5. 2006.

- SINGH, R. K., MCMAHON, A. D., PATEL, H., PACKARD, C. J., RATHBONE, B. J. e SAMANI, N. J. Prospective analysis of the association of infection with CagA bearing strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease. Heart, v.88, n.1, Jul, p.43-6. 2002.
- STANIC, A. K., STEIN, C. M., MORGAN, A. C., FAZIO, S., LINTON, M. F., WAKELAND, E. K., OLSEN, N. J. e MAJOR, A. S. Immune dysregulation accelerates atherosclerosis and modulates plaque composition in systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.18, May 2, p.7018-23. 2006.
- SUN, J., SUKHOVA, G. K., WOLTERS, P. J., YANG, M., KITAMOTO, S., LIBBY, P., MACFARLANE, L. A., MALLEEN-ST CLAIR, J. e SHI, G. P. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. Nat Med, v.13, n.6, Jun, p.719-24. 2007.
- SZEKANECZ, Z., KEREKES, G., DER, H., SANDOR, Z., SZABO, Z., VEGVARI, A., SIMKOVICS, E., SOOS, L., SZENTPETERY, A., BESENYEI, T., SZUCS, G., SZANTO, S., TAMASI, L., SZEGEDI, G., SHOENFELD, Y. e SOLTESZ, P. Accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis. Ann N Y Acad Sci, v.1108, Jun, p.349-58. 2007.
- THOMPSON, J. S. Atheromata in an inbred strain of mice. J Atheroscler Res, v.10, n.1, Jul-Aug, p.113-22. 1969.
- UNTERSMAJR, E. e JENSEN-JAROLIM, E. Mechanisms of type I food allergy. Pharmacol Ther, v.112, n.3, Dec, p.787-98. 2006.
- VAN DER KLEIJ, D., LATZ, E., BROUWERS, J. F., KRUIZE, Y. C., SCHMITZ, M., KURT-JONES, E. A., ESPEVIK, T., DE JONG, E. C., KAPSENBERG, M. L., GOLENBOCK, D. T., TIELENS, A. G. e YAZDANBAKHSH, M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. J Biol Chem, v.277, n.50, Dec 13, p.48122-9. 2002.
- VAN EDEN, W., VAN DER ZEE, R. e PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. Nat Rev Immunol, v.5, n.4, Apr, p.318-30. 2005.
- VANDERLAAN, P. A., REARDON, C. A. e GETZ, G. S. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.24, n.1, Jan, p.12-22. 2004.
- VLIEGEN, I., STASSEN, F., GRAULS, G., BLOK, R. e BRUGGEMAN, C. MCMV infection increases early T-lymphocyte influx in atherosclerotic lesions in apoE knockout mice. J Clin Virol, v.25 Suppl 2, Aug, p.S159-71. 2002.
- WHO, W. H. O. Cardiovascular diseases: [www.who.int/cardiovascular\\_diseases](http://www.who.int/cardiovascular_diseases).
- YAGI, J., ARIMURA, Y., TAKATORI, H., NAKAJIMA, H., IWAMOTO, I. e UCHIYAMA, T. Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4+ T cells. Int Immunol, v.18, n.12, Dec, p.1681-90. 2006.

YAZDANBAKHSI, M., KREMSNER, P. G. e VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science, v.296, n.5567, Apr 19, p.490-4. 2002.



Anexo A –

Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – CETEA

COMITÊ DE ÉTICA EM  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - UFMG

Os procedimentos para a experimentação envolvendo os camundongos do estudo foi aprovado pelo CETEA (UFMG, CETEA # 42/2007).

CETEA  
CETEA