



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Luísa Lemos dos Santos

**Novo Modelo Experimental de Alergia  
Alimentar À Proteína do Leite  
 $\beta$ -Lactoglobulina em Camundongos**

Belo Horizonte

2015

Luísa Lemos dos Santos

Dissertação mestrado

**Novo Modelo Experimental de Alergia  
Alimentar À Proteína do Leite  
 $\beta$ -Lactoglobulina em Camundongos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

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

Belo Horizonte

2015

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

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Aprendi que o ensino é impossível e a aprendizagem, inevitável”.*

(Nelson Vaz, um amigo tolerante).

Dedico esse trabalho a todos aqueles que acreditaram que esse sonho um dia se tornaria real,  
em especial, meus pais e meus avós, com todo meu amor.

# AGRADECIMENTOS

---

Essa é a parte mais difícil do trabalho. Curiosamente, ninguém está imune a agradecer todos aqueles que, de forma significativa, tornam nossos dias melhores.

A Deus, em primeiro lugar, pelo presente da vida.

Aos meus pais, Marco Antônio e Dayse, pelo amor incondicional, o incentivo e a alegria de todos os nossos dias.

À minha irmã, Gabriela, pelas lições cotidianas.

Aos meus avós, toda gratidão do mundo por serem os melhores admiradores que eu tenho. Sou bastante grata por todo amor e toda convivência.

À minha orientadora, Ana Faria, por ter permitido que tudo isso acontecesse da forma mais natural possível, por servir sempre de inspiração, apoio e pela paixão e rigor científicos. Por estar presente em todas as dúvidas e apertos! Obrigada pela confiança.

À minha co-orientadora, amiga, “mãe” e professora, Ana Cristina, por todos nossos momentos agradáveis de aprendizagem, pela compaixão, carinho e incentivo sem igual, você sabe tornar uma dissertação bem divertida!

À minha querida Denise Carmona, mais do que uma colaboradora, uma pessoa incrível e amável, obrigada por me receber sempre com um sorriso no rosto, disposta a me auxiliar nos momentos difíceis e a se divertir comigo nas oportunidades alegres.

Ao amigo Nelson Vaz, um “biólogo”, um “estudante de imunologia” que não somente mudou todo meu pensamento imunológico como sua própria percepção imunológica. Obrigada por participar da minha formação e por estar sempre disponível a uma ótima prosa!

Às minhas amigas-irmãs, presentes de Deus: Camila, Ana Luiza, Marina, pela nossa convivência, risadas, saídas, conversas científicas e apertos vividos. Vocês fizeram parte de tudo isso aqui! Obrigada.

À professora Symone Fulgêncio Lima, por ter me apresentado à imunologia, obrigada por ter transformado uma disciplina em uma verdadeira paixão e por ser uma amiga tão presente e tão disponível.

À Cássia, que contribuiu muito para a minha formação científica, tenho muito estima pelas palavras que sempre me deu e pela força diante das dificuldades.

Aos meus tios e tias, vocês sempre têm uma palavra de carinho comigo. Obrigada por participarem da minha pesquisa, serem pessoas maravilhosas e presentes! Amo vocês.

Ao meu adorado amigo Patrick, por ser tão presente e sempre me animar quando preciso, uma amizade sem igual.

Aos amigos de bases e em especial, ao Paulo Alexandre, por todas as ajudas científicas, obrigada por participar do meu projeto em todos seus momentos, do início ao fim e sempre ser acolhedor comigo.

Ao primo Daniel, sempre comigo desde meus primeiros momentos na UFMG, sempre incentivador e um verdadeiro mestre na arte de persistir.

Às primas e primos que sempre me deram apoio.

À Cris, minha segunda mãe, por ser um amor e viver esse momento desde o início, dia a dia.

Aos queridos André e Paulo Benatti, por sempre estarem disponíveis na hora do aperto. E à Paula, uma amiga da pós que virou uma amiga pra tudo! À Samira, por despertar minha sagacidade e desfrutar meus devaneios científicos! À Manettinha, por uma amizade longa e verdadeira, intensa e tão bonita. Você é especial.

Ao Filipe, um incentivador do meu trabalho e da minha vida, por contribuir tanto para que as coisas ao final dessem certo e também pelos inúmeros gráficos e revisões comigo, discussões e apoio, por mostrar que é possível, e talvez, lógico.

À amiga Alline, por ter sido companhia, colo e ouvidos quando muito precisei.

Aos amigos do Lib. (Essa parte é tão difícil quanto a inicial).

Eu gostaria de citar o nome de cada um de vocês e atribuir aqui tudo que vocês já fizeram por mim, mas percebi que essa tarefa seria bastante impossível, então vou tentar ser breve.

À Adna, pelo carinho, os conselhos, às idas ao biotério e às risadas, congressos e emoções vividas!

À Andrezza, por ser uma pessoa efetivamente influente na minha formação, com dicas que valeram muito a pena! Obrigada, viu?

À Bárbara, por ter participado de todos meus experimentos e a discussão de todos meus dados que se transformaram em nossos dados, você agora virou “libiana”.

À Ciça, pelo empenho em me confortar diante das necessidades e bolar experimentos comigo. Você chegou ao final, mas logo estará o começo, não é?

À Dani Reis, a minha mentora da vida prática, a “minha pessoa” e quem sempre esteve do meu lado sem hesitar, me colocando pra frente e sendo minha eterna companhia de almoços! Muito obrigada por estar aqui!

À Danusp (Dani) por experimentos, idas ao biotério e se mostrar disponível.

Ao Caixeta, por ter rascunhado comigo várias vezes projetos que um dia ainda acontecerão e por ser um IC muito dedicado!

À Fran, minha companheira de mestrado, pelas risadinhas que tornam meu dia mais simples e por ter estado comigo nos momentos finais, nossos momentos!

À Gabi, mesmo de longe, participando das minhas estatísticas com opiniões relevantes e disposta a cuidar de layouts – mesmo que em emergências –

Ao Gui, por se mostrar sempre disponível e querer me ajudar, por ter leveza na vida e firmeza nas opiniões, obrigada pelas sugestões!

Aos ICs por darem aquela ajuda nos momentos do aperto: Marcela, Ester, Hortência, Alice, Deborah, Dantas, Núbia!

À Juliana Lima, por ter sido uma pessoa tão carismática e amável e ter contribuído ativamente no projeto do mestrado, sendo solícita sempre!

À Laila, pela diversão, as conversas, os planos e os apertos.

Ao Luiz, meu “caroneiro” querido, pelos palpites científicos, as conversas suaves, ao companheirismo e participação!

À Mari, essa pessoa tão calma e tão confiante diante das situações mais adversas, meu agradecimento e admiração.

Ao Mauro pelas ajudas matemáticas nos apertos, às caronas e as piadas infames.

À Natalia, por ter o melhor abraço que Deus já fez, por ser um porto seguro em meio ao caos e por exigir tanto a excelência em tudo que faz, a toda amizade e afeto, às risadas e bobagens!

À Robertinha, mesmo longe agora, participando ativamente, membro dos projetos de alergia e pessoa tão carinhosa!

Ao Rafa Pires que segundo o Archimedes, deveria ser canonizado! Haha. Agradeço por sempre me ensinar a ter rigor científico, métodos efetivos e por ser um amigo presente nas minhas decisões profissionais. Esse trabalho tem suas ideias, mãos e seu carinho também!

Ao Rafa Rezende, uma inspiração contínua. Mesmo que muitos quilômetros nos separem por agora, eu tenho a certeza de que você participou, vivenciou e esperou que esse trabalho fosse concluído! Obrigada!!! E volta logo!

À Samara, uma grande amiga, que me acompanhou mesmo diante de um árduo fuso horário, que me acolheu logo quando cheguei ao laboratório. Agradeço por estar sempre



disposta a me ensinar não somente as coisas científicas, mas as coisas que eu vivo e por me dar ânimo, motivação e comemorar quando merecemos!

À Sarah, por animar a ir ao bandeijão, pelas conversas com os camundongos – acreditem – por ser cômica e por ter me dado dicas na hora da escrita! Muito obrigada!

À Tati, por me fazer rir e chorar ao mesmo tempo, por ter criticidade aguçada para todas as coisas que fazemos no laboratório e ao mesmo tempo, ser extremamente atenciosa em contribuir!

À Thaís, pelos bate-papos no carro ou fora dele, por me incentivar a ser mais corajosa diante dos meus problemas, por organizar o laboratório quando precisamos e pelas sugestões no trabalho!

Ao pessoal das antigas, que contribuíram bastante logo no início da minha caminhada, especialmente Bernardo, Archimedes, Bárbara, Andrea, Flavinha e Frank!

À Ildinha e Hermes, por manter nosso biotério em funcionamento e por serem pessoas tão acolhedoras e amáveis. À Dona Carminha, por sempre estar de bem com a vida, mantendo nosso laboratório organizado!

Aos funcionários do ICB, em especial Orlando e Celise.

Às queridas Eliane e Val, pelas nossas gargalhadas que contribuíram muito para que o mestrado fosse mais leve.

À Sylvia, companheira das madrugadas, por ser tão aberta a ajudar as pessoas.

À Ariane que, desde o meu seminário, nunca me negou qualquer carinho ou auxílio.

Às meninas do lab do professor Anderson, em especial, Meri e Bianca, por contribuírem comigo na pesquisa. Ao pessoal da Jaqueline, sempre tão presente, aos garotos da Leda!

Aos laboratórios amigos, que nos cedem tanto auxílio e tanto convívio bacana!

Aos colaboradores do nosso projeto, todos eles, por viabilizarem nossos experimentos, em especial à EDETEC, por viabilizar as proteínas usadas!

E a todas as pessoas que não consigo nomear, que me distribuíram “bocados de gentileza” nessa vida.

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1– Representação dos elementos formadores do GALT.....	18
Figura 2- Mecanismos imunológicos da alergia alimentar. ....	22
Figura 3– Desenho experimental do modelo.....	35
Figura 4– Imagem representativa do posicionamento das mamadeiras na gaiola experimental para o teste de preferência alimentar. ....	36
Figura 5 – Níveis de IgE específica no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com BLG por via oral. ....	44
Figura 6– Peso corporal dos camundongos sensibilizados e desafiados com BLG por via oral. ....	45
Figura 7– Perda de peso corpóreo em camundongos alérgicos.....	46
Figura 8– Peso, em gramas, de tecido adiposo perigonadal dos camundongos sensibilizados ou não com BLG. ....	47
Figura 9– Consumo de ração em gramas por camundongos sensibilizados ou não com BLG. ....	48
Figura 10 – Consumo líquido total dos camundongos sensibilizados ou não por BLG .....	49
Figura 11– Consumo líquido dos camundongos ao longo do experimento. ....	50
Figura 12– Número de eosinófilos infiltrados na mucosa do intestino delgado de camundongos sensibilizados ou não com BLG.....	51
Figura 13–Análise morfométrica de vilos e criptas intestinais. ....	53
Figura 14– Imagens de microfotografia na região do vilo intestinal com aumento de linfócitos intraepiteliais. ....	55
Figura 15– Avaliação da produção de muco por células caliciformes.....	56
Figura 16– Concentração de IgA secretória (sIgA) no lavado intestinal dos camundongos.....	57
Figura 17– Produção das citocinas IL-4 e IL-10 nos linfonodos mesentéricos. ....	58
Figura 18– Produção de citocinas no jejuno proximal.....	60
Figura 19–Teste de preferência alimentar e sua relação com a produção de IgE específica no soro. ....	62

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

- Al(OH)<sub>3</sub> – Hidróxido de Alumínio
- ALA – Alfa-Lactoalbumina
- APC – Célula apresentadora de antígeno
- BLG – β-Lactoglobulina
- CFA – Adjuvante Completo de Freund
- ELISA – Ensaio Imunoenzimático indireto
- FAE – Folículo associado ao epitélio
- FcεRI – Receptor de alta afinidade para IgE
- GALT – Tecido linfoide associado ao intestino
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico
- HE – Hematoxilina/Eosina
- IEL – Linfócito intraepitelial
- IFN – Interferon
- Ig – Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- LPLs – Linfócitos da Lamina propria
- MALT – Tecido linfoide associado à mucosa
- mg Miligrama
- MHC II – Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo II
- mL – Mililitros
- MLN – Linfonodo mesentérico
- °C – Graus celsius
- OPD – Ortofenileno-diamino
- OVA – Ovalbumina
- PAF – Fator de agregação de plaquetas
- PAS – Ácido Periódico de Schiff
- PBS – Salina Tamponada
- RPM – Rotações por minuto
- SED – Domo Subepitelial
- sIgA – Imunoglobulina secretória A
- TGF – Fator de transcrição e crescimento

Th – Linfócito T auxiliar

Th2 – Linfócito T auxiliar do tipo 2

V-CAM – *Vascular cell adhesion molecule*

VL4-A – *Very late antigen*

µg – microgramas

µL – microlitro

µm micrômetro

## RESUMO

---

A alergia alimentar é uma resposta imunológica anormal frente aos antígenos ingeridos pela dieta e sua incidência tem aumentado em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Sabe-se que a alergia alimentar ao leite é bastante frequente, principalmente em crianças, afetando cerca de 2,5% delas em seu primeiro ano de vida. Já existem descritos vários modelos para indução de alergia alimentar ao leite de vaca, focando em um dos seus maiores componentes imunogênicos: a proteína  $\beta$ -lactoglobulina (BLG). Porém, esses modelos exigem um tempo longo de execução, implicam no uso de toxina colérica ou intensa manipulação dos animais. Nosso grupo desenvolveu um modelo alimentar de alergia à BLG utilizando um protocolo mais rápido e de simples execução. Camundongos BALB/c foram sensibilizados por via intraperitoneal com o antígeno adsorvido em hidróxido de alumínio em salina e, 14 dias depois, receberam a imunização secundária com antígeno em solução salina. Uma semana após essa imunização, os animais foram desafiados por via oral com solução contendo o antígeno em mamadeiras. Dois tempos experimentais foram testados para o desafio oral: 7 ou 14 dias. Observamos que os camundongos sensibilizados e desafiados oralmente exibiam níveis elevados de IgE específica para o antígeno em ambos os tempos experimentais, perda de peso e redução de tecido adiposo perigonadal. Entretanto, os camundongos não alérgicos mantiveram níveis basais de IgE específicas, mantendo também o peso corporal e do tecido adiposo dentro dos valores obtidos no grupo controle. A alergia alimentar gerou um fenômeno classicamente conhecido como aversão, durante o qual os animais rejeitam a ingestão do antígeno utilizado na sensibilização alérgica (alérgeno). No entanto, quando submetidos ao teste de preferência entre o consumo de solução contendo o antígeno ou outra sem a presença do mesmo, tanto animais não alérgicos quanto alérgicos optaram pela ingestão da solução contendo o alérgeno. Medimos também alguns parâmetros histológicos e demonstramos que houve aumento do infiltrado eosinofílico no jejuno proximal, o mesmo acontecendo com o número de linfócitos intra-epiteliais (IELs). Já a produção de muco não se alterou nesse modelo. Os níveis de IgA secretória estavam elevados nos camundongos alérgicos desafiados por 14 dias. Além disto, os níveis de IL-4 estavam aumentados nos linfonodos mesentéricos e jejuno proximal enquanto que os níveis IL-10 e em TGF- $\beta$  estavam reduzidos no jejuno proximal de animais alérgicos e desafiados. O modelo desenvolvido representa uma ferramenta útil e de fácil execução para estudos em um tipo de alergia alimentar de grande importância clínica.

# ABSTRACT

---

Food allergy is an abnormal immune response against dietary antigens and its incidence has increased in developed and developing countries. It is known that cow's milk allergy is very common. About 2.5% of children are affected in their first year of life. Several models of allergy to cow's milk allergy have been already described. Usually they focus in one of its major immunogenic components: the  $\beta$ -lactoglobulin protein (BLG). These models usually require either a long time to be performed, the use of choleric toxin or intense manipulation of animals. Herein, we report a novel model of food allergy to BLG using an easy and rapid protocol. BALB/c mice were intraperitoneally sensitized with antigen adsorbed into aluminum hydroxide and, 14 days later, they received a second sensitization, with the antigen in saline solution. One week thereafter, animals were orally challenged with a BLG-containing solution. Oral challenged were tested for two periods of time: either 7 or 14 days. We observed that sensitized and orally challenged animals showed high levels of antigen specific IgE at both periods of time. In addition, mice presented weight loss and reduction in adipose tissue. Food allergy generates a classical phenomenon known as aversion, in which animals reject to ingest the antigen to which they were sensitized to. Indeed, allergic mice avoid drinking a BLG-containing solution at a certain extent. However, in a preference test when animals could choose between consuming either a solution containing the allergen or a control solution, both non-allergic and allergic mice choose to drink the BLG-containing solution. We also measured some histological parameters and observed an increase in eosinophils and intra-epithelial lymphocytes in the proximal jejunum. Mucus production was not affected in this model. Levels of secretory IgA were elevated in allergic 14-day-challenged animals when compared to their controls. Levels of IL-4 were increased in mesenteric lymph nodes and proximal jejunum whereas levels of TGF-beta were increased and of IL-10 were decreased in the proximal jejunum of allergic mice. Therefore, we have described a novel model of allergy to cow's milk that may represent a useful in future studies on very prevalent type of food allergy.

# SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1	Mucosa intestinal.....	17
1.2	A Tolerância oral.....	19
1.3	Mecanismos imunológicos da alergia alimentar.....	20
1.4	Alergia alimentar.....	22
1.5	Alergia alimentar ao leite de vaca.....	24
1.6	Modelos experimentais.....	25
1.7	O fenômeno de aversão imunológica.....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1	Animais.....	34
3.2	Indução da Alergia Alimentar.....	34
3.3	Consumo de dieta.....	35
3.4	Consumo de líquido da mamadeira.....	35
3.5	Teste de preferência alimentar.....	36
3.6	Coleta do Soro.....	37
3.7	Avaliação do peso do tecido adiposo.....	37
3.8	Coleta do lavado intestinal.....	37
3.9	Análise histológica do jejuno proximal.....	37
3.10	Inclusão e Coloração lâminas Histológicas - técnica <i>HE</i> ( <i>Hematoxilina-Eosina</i> ).....	37

3.11	ELISA para medida da concentração de citocinas.....	38
3.12	ELISA para IgE sérica anti $\beta$ -lactoglobulina.....	39
3.13	ELISA para sIgA do lavado do Intestino Delgado .....	40
3.14	Contagem de linfócitos intraepiteliais .....	40
3.15	Contagem de eosinófilos.....	41
3.16	Morfometria dos vilos e criptas intestinais .....	41
3.17	Avaliação da produção de muco intestinal.....	41
3.18	Análise Estatística.....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1	Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados por via oral com uma solução contendo esse antígeno se tornaram alérgicos. ....	43
4.2	Os animais sensibilizados e desafiados por via oral apresentaram perda de peso corpóreo. ....	45
4.3	O emagrecimento dos camundongos foi marcado por perda de tecido adiposo.....	46
4.4	Camundongos sensibilizados e desafiados com BLG por via oral apresentaram aversão à ingestão do antígeno. ....	48
4.5	Camundongos alérgicos apresentaram alterações histológicas na mucosa intestinal .....	50
4.5.1	<i>Número de eosinófilos. ....</i>	50
4.5.2	<i>Morfometria dos vilos intestinais .....</i>	52
4.5.3	<i>Contagem de linfócitos intraepiteliais.....</i>	54
4.5.4	<i>Produção de muco por células caliciformes. ....</i>	55
4.6	Camundongos alérgicos apresentaram aumento da sIgA do lavado intestinal após 14 dias de ingestão continuada de antígeno. ....	57
4.7	Avaliação da produção de citocinas nos linfonodos mesentéricos. ....	58
4.8	Avaliação da produção de citocinas no jejuno proximal. ....	59



<b>4.9</b>	<b>Preferência alimentar em camundongos sensibilizados ou não com BLG.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>

---

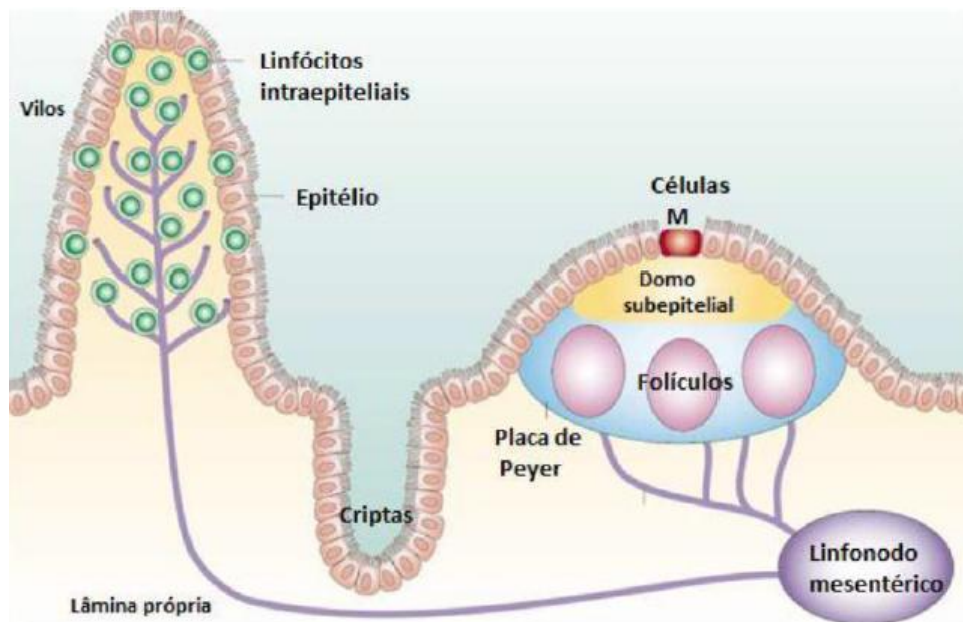
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Mucosa intestinal

As superfícies mucosas do organismo são o principal local de contato com o ambiente externo. De fato, a camada epitelial das membranas mucosas cobre uma área 100 vezes maior que a pele (BRANDTZAEG, 2009). O intestino entra em contato com cerca de 30 kg de proteínas alimentares por ano e absorve de 130 a 190g dessas proteínas diariamente (BRANDTZAEG, 1998). Além dos antígenos dietéticos, a mucosa intestinal é estimulada por cerca de três trilhões de microrganismos que compõem a microbiota intestinal (PRAKASH et al., 2011). Associadas a elas, há um tecido linfoide bastante extenso denominado tecido linfoide associado à mucosa ou MALT (do inglês *Mucosa-associated lymphoid tissue*) (TURNER, 2009).

Devido a essa exposição constante, é necessária uma fina regulação das atividades do sistema imune e do tecido linfoide presente na mucosa intestinal para desenvolver uma resposta inflamatória rápida e controlada contra patógenos, mas também manter a homeostase intestinal em condições fisiológicas. Para isso, o intestino possui mecanismos inflamatórios que limitam o acesso de substâncias prejudiciais ao organismo: enzimas digestivas pancreáticas, epitélio intestinal e a microbiota endógena. Um mecanismo que age em conjunto com essas atividades protetoras é o tecido linfoide associado ao intestino, conhecido como GALT (do inglês *Gut-associated lymphoid tissue*). Ele desempenha um importante papel na manutenção da homeostase intestinal (MOWAT, 2003).

O GALT é dividido estruturalmente em dois compartimentos: a) GALT organizado, composto por folículos linfoides isolados, Placas de Peyer e linfonodos mesentéricos; b) GALT difuso que consiste de populações de linfócitos intercalados entre as células epiteliais (linfócitos intraepiteliais, IELs) ou na lamina própria da mucosa intestinal (linfócitos da lamina própria, LPLs) (MOWAT, 2003). A figura 1 esquematiza essa divisão.



**Figura 1– Representação dos elementos formadores do GALT.**

O tecido linfoide organizado, formado pelas placas de Peyer e pelos linfonodos mesentéricos, está envolvido em atividades de indução de tolerância e imunidade, enquanto que os locais efetores (tecido linfoide difuso), formado pelos linfócitos intraepiteliais e células da lâmina própria, são dispersos por toda a extensão da mucosa. Tanto as placas de Peyer quanto os vilos da lâmina própria são drenados por vasos linfáticos aferentes que chegam até os linfonodos mesentéricos. Imediatamente abaixo do epitélio, está localizado o domo subepitelial (SED) das placas de Peyer. Adaptado de Mowat, 2003.

As placas de Peyer são agregados macroscópicos encontrados na submucosa ao longo do intestino delgado, elas contêm numerosos folículos compostos por células B expressando IgM, que são precursoras de células B produtoras de IgA. A ativação dessas células B e o processo de troca de isotipo que tornam essas células capazes de produzir IgA ocorrem nos centros germinativos desses folículos. Uma monocamada de células (FAE, *do inglês follicle-associated epithelium*) separa o tecido linfoide do lúmen intestinal e essa camada (FAE) se diferencia do epitélio por ter níveis menores de enzimas digestivas e a borda em escova menos pronunciada. A FAE é constituída por a) uma coluna de células epiteliais, b) células M, que são enterócitos especializados na captura de antígenos luminiais; c) os linfócitos intraepiteliais; d) as células secretoras de muco, denominadas células caliciformes; e) as células de Paneth (produtoras de peptídeos anti-microbianos), f) células enteroendócrinas (produtoras de fatores endócrinos importantes na renovação do epitélio) (MOWAT, 2003). As

células caliciformes são capazes de secretar substâncias chamadas de mucinas que constituem o gel hidratado presente na mucosa, contribuindo para a prevenção do contato direto de grandes partículas com a camada de células epiteliais (JOHANSSON et al, 2008). Os linfonodos mesentéricos são os maiores linfonodos do corpo e devido às suas características anatômicas, provavelmente interconectam vias de recirculação periférica e da mucosa (MOWAT, 2003).

Apesar da constante estimulação no ambiente intestinal, o organismo não reage de forma inflamatória e progressiva aos antígenos naturais, como aqueles presentes na dieta e microbiota, sendo que a resposta desencadeada a esses antígenos é regulada, não inflamatória e mantém a homeostase intestinal (MOWAT, 2003). Quando um antígeno proteico é ingerido, o mesmo é tratado por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado, porém, alguns antígenos podem ser parcialmente degradados ou ainda escapar do processo digestivo e ser absorvidos de forma intacta (WAKABAYASHI et al, 2006). A administração oral de antígeno pode levar a fenômenos como: a) resposta local e não inflamatória envolvendo IgA secretória (sIgA) na mucosa; b) resposta sistêmica com geração de imunoglobulinas (Ig's) séricas e imunidade mediada por célula em raros momentos e geralmente na presença de infecção ou de adjuvantes ou c) um estado de tolerância imunológica sistêmica e/ou local, denominada tolerância oral (FARIA e WEINER, 2005).

## 1.2 A Tolerância oral

Fisiologicamente, o contato antigênico pela mucosa intestinal resulta na produção de IgA secretória (sIgA) (CEBRA et al, 1977) e na indução de tolerância oral (VAZ et al, 1977). A sIgA é uma subclasse não inflamatória de imunoglobulina presente em todas as secreções mucosas e é responsável pela exclusão de microrganismos patogênicos sem a geração de respostas inflamatórias nesse processo (MACPHERSON et al, 2008). A tolerância oral é um fenômeno conhecido desde 1909 quando Besredka demonstrou que porquinhos da Índia alimentados previamente com uma ração contendo leite não poderiam ser imunizados contra proteínas lácteas (FARIA e WEINER, 2005).

O estado de tolerância oral tem algumas consequências no organismo, em termos de reatividade imunológica: a redução da produção de imunoglobulinas de diferentes isotipos (VAZ et al, 1977; NGAN e KIND, 1978), das reações de hipersensibilidade tardia (MOWAT, et al 1982) e da produção de várias citocinas (WEINER, 1994).

Provavelmente a tolerância oral contribui para a homeostase da mucosa intestinal apesar dessa mucosa abrigar uma alta frequência de linfócitos ativados (FARIA e WEINER, 2005). De maneira geral, os indivíduos são tolerantes a proteínas da dieta e à própria microbiota. Esse fenômeno já foi bem descrito tanto para animais experimentais quanto para humanos (MESTECKY et al, 1996; ANDRADE et al 2006; ROUND et al, 2010). Entretanto, a falha em estabelecer a tolerância oral ou a quebra de um estado de tolerância já existente podem provocar a indução de reações de hipersensibilidade aos antígenos da dieta culminando em um processo conhecido como alergia alimentar (SAURER e MUELLER, 2009).

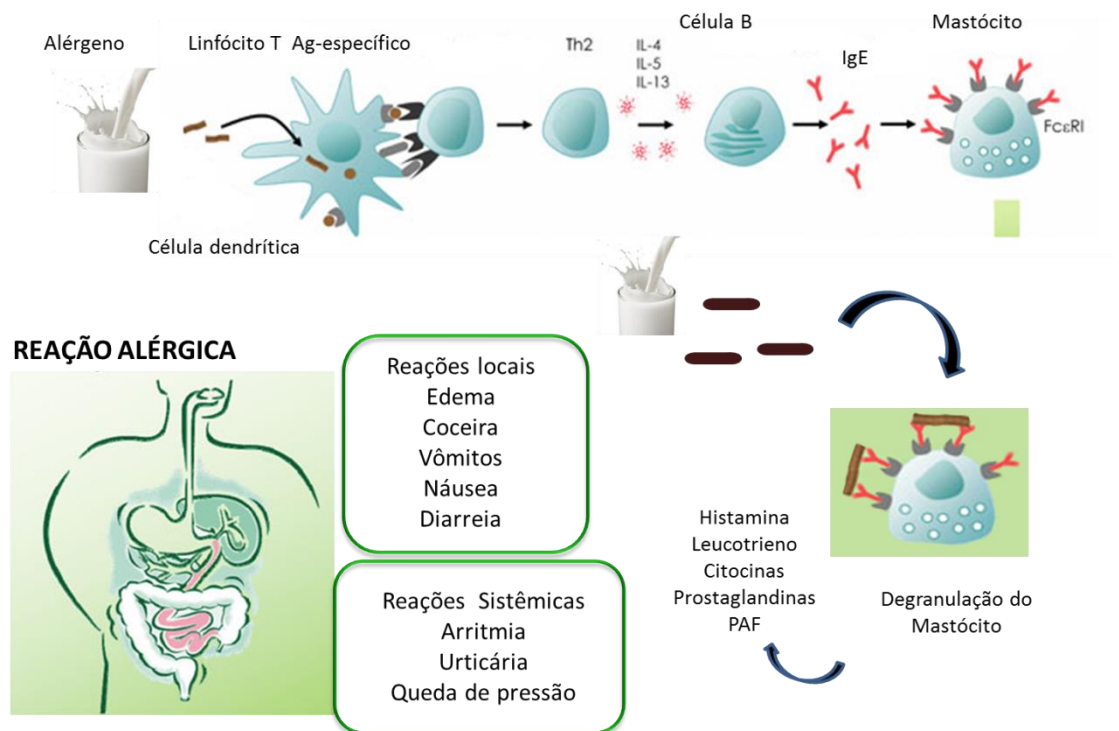
### **1.3 Mecanismos imunológicos da alergia alimentar**

Em adultos, aproximadamente 2% dos antígenos alimentares ingeridos são absorvidos de forma intacta pelo organismo (HUSBY,1987). Esta absorção permite com que essas moléculas antigênicas sejam apresentadas a linfócitos T helper (Th) através das células apresentadoras de antígeno (APC). Esse processo gera a produção de citocinas liberadas por linfócitos Th, tais como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, que ativam linfócitos B específicos para os alérgenos. Sob a influência de IL-4, principalmente produzida por linfócitos Th2, células B trocam de isotipo e produzem anticorpos IgE (BACHARIER e GEHA 2000). As moléculas de IgE específica para o alérgeno produzidas pelas células B caem na circulação e podem se ligar a receptores FcεRI expressos na membrana de mastócitos e basófilos, fenômeno chamado de sensibilização (HOLGATE e POLOSA, 2008). Em um momento posterior à exposição ao antígeno, por exemplo um segundo contato do indivíduo já sensibilizado com o mesmo antígeno, esse poderá se ligar ao complexo FcεRI – IgE na membrana de mastócitos espalhados pelo tecido conjuntivo de diferentes órgãos, iniciando uma reação celular de liberação de vários mediadores inflamatórios, fenômeno chamado de degranulação dos mastócitos (BISCHOFF e CROWE, 2005).

A degranulação dos mastócitos leva a liberação de mediadores pré-formados (histamina, serotonina), mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos) e, posteriormente, citocinas. Esse conjunto de reações citadas ocorrem na fase imediata da alergia (SENGOKU et al, 2001). A ligação da histamina ao endotélio gera contração celular e, como consequência, o extravasamento do plasma para os tecidos. Outras consequências da

liberação desse mediador incluem a estimulação de células endoteliais a sintetizarem relaxantes vasculares para as células dos músculos lisos, provocando vasodilatação. Por outro lado, há também o efeito histamínico de constrição da musculatura lisa no intestino, podendo contribuir para o aumento dos movimentos peristálticos, associados à ingestão do alérgeno (AKDIS e BLASER, 2003). Dentre os mediadores lipídicos, as prostaglandinas, em especial a prostaglandina D<sub>2</sub>, são importantes, pois elas atuam em células de musculatura lisa e sustentam a vasodilatação iniciada pela histamina. Além disso, elas promovem a quimiotaxia de neutrófilos em sítios inflamatórios (BINGHAM e AUSTEN, 2000).

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

**SENSIBILIZAÇÃO**

Adaptado de: <http://ucfa.nl/food-allergy/mechanisms/>

**Figura 2- Mecanismos imunológicos da alergia alimentar.**

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

#### 1.4 Alergia alimentar

Proteínas são fundamentais para a obtenção de um balanço positivo de nitrogênio e a aquisição de aminoácidos essenciais pela nutrição (YOUNG e PELLETT, 1987). Essas proteínas são assimiladas de maneira eficiente através da ação de proteases gástricas, pancreáticas e do intestino delgado, resultando principalmente na sua redução em aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos que são facilmente absorvidos pelas células

epiteliais intestinais. A quebra dessas proteínas muitas vezes resulta na perda dos principais epítopos imunogênicos (ERICKSON e KIM, 1990). Produtos da proteólise e proteínas inteiras que escapam do processo de digestão são envolvidos em diferentes processos que podem induzir a tolerância oral bem como desencadear respostas imunes alérgicas em indivíduos suscetíveis (CHEHADE e MAYER, 2005).

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta imune anormal frente aos antígenos introduzidos no organismo por meio da alimentação. Indivíduos que apresentam suscetibilidade genética a desenvolver reatividade alérgica (atopia) a esses antígenos podem sofrer distúrbios desencadeados após a ingestão de determinados alimentos (SICHERER e SAMPSON, 2008; 2010). Nesses indivíduos, as alergias alimentares estão relacionadas com a presença de anticorpos séricos específicos (principalmente da classe IgE) para tais antígenos (THIJS et al, 2010).

Os antígenos desencadeadores de reações alérgicas, também chamados de alérgenos, são em geral proteínas ambientais comuns. Os alimentos que causam reações imunológicas contêm macromoléculas com propriedades semelhantes: geralmente apresentam baixo peso molecular, são glicosilados e de alta solubilidade em fluidos corporais. Tais características provavelmente conferem proteção aos antígenos frente à desnaturação e à degradação no trato gastrointestinal dos indivíduos suscetíveis e permitem sua absorção de forma intacta, embora ainda não se saiba porquê alguns alimentos podem ser mais alergênicos do que outros (HELM et al, 2002). Relativamente, poucos alimentos são os responsáveis pela maioria das reações alérgicas. Esses alimentos incluem: leite, ovo, amendoim, castanhas, peixes e frutos do mar (SEIBOLD, 2005). De todos esses alimentos, a alergia a proteína do leite de vaca é a mais frequente (DELGADO et al., 2010).

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



e eosinófilos (XU et al, 2000). Embora não haja, no momento, testes genéticos diagnósticos disponíveis para identificar indivíduos com risco de alergia alimentar, a história familiar de atopia, incluindo a própria alergia alimentar, ainda consiste no melhor indicativo indireto de risco para seu desenvolvimento (KJELLMAN, 1977; ZEIGER, 2003; WANG e SAMPSON 2006).

A alergia alimentar é mais comum em crianças. É estimada uma prevalência de 6% em crianças menores de três anos e uma taxa de 3,5% em adultos e estes valores parecem estar aumentando, embora a etiologia exata para esse fato não seja totalmente esclarecida (STRACHAN, 1989 ; SICHERER et al 2010). O sistema imunológico imaturo dos neonatos e lactentes jovens favorece a sensibilização ao alérgeno (EIGENMANN, 2009) Nesta fase da vida, a barreira intestinal é ainda imatura e mais permeável, tornando o epitélio mais suscetível à penetração dos mais variados antígenos. A produção de IgA secretória (sIgA) é diminuída, o que favorece a penetração de alérgenos e consequentemente a ocorrência da alergia alimentar (GARSIDE et al., 2004). A importância da sIgA na mucosa é demonstrada em pacientes com deficiência na produção desse anticorpo, havendo entre eles uma maior prevalência de alergias alimentares (MOWAT et al., 2004).

Em crianças, as alergias alimentares estão relacionadas a deficiências nutricionais que podem interferir no crescimento, desenvolvimento neurológico e cardiovascular (ALDAMIZ-ESCHEVARRIA et al., 2008; NOIRMARK e COX, 2008). Outro fator relevante do ponto de vista nutricional é a frequente utilização de restrição alimentar como medida preventiva das reações alérgicas (SICHERER e SAMPSON, 2010). Pacientes alérgicos podem presenciar dermatite atópica, angioedema, rinite, dor, diarreia entre outros (SICHERER, 2002).

O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na alergia é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essa doença. Esse é um objetivo extremamente relevante já que a incidência de alergias é crescente em todo o mundo e uma vez que elas interferem com a qualidade de vida dos pacientes acometidos.

## **1.5 Alergia alimentar ao leite de vaca**

A alergia alimentar ao leite de vaca afeta cerca de 2,5% de crianças em seu primeiro ano de vida e é a alergia alimentar mais comum e precoce nessa fase de vida (SICHERER e

SAMPSON, 2010) podendo apresentar sintomas considerados relativamente brandos ou até ameaçadores à vida das crianças (WOOD et al, 2013). Um estudo realizado no Brasil, concluiu que a incidência de alergia às proteínas do leite de vaca é de 2,2% e a prevalência é de 5,7% (SPOLIDORO, 2005). A maioria das crianças após os três anos de idade, deixa de ser alérgica ao leite de vaca. Outras desordens alérgicas, tais como asma alérgica, eczema atópico e alergia a ovos, passam a ser mais frequentes nesses indivíduos (SAARINEN et al., 2005).

O leite de vaca contém duas principais fontes proteicas: as caseínas (30g/L) e as proteínas do soro do leite (5g/L). As caseínas consistem principalmente de:  $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\kappa$ - e  $\beta$ -caseína, enquanto as proteínas derivadas do soro do leite, conhecidas como “*Whey protein*” são:  $\alpha$ -lactoalbumina, albumina bovina sérica, imunoglobulinas séricas, lactoferrina e a  $\beta$ -lactoglobulina (MONACI et.al, 2006). Estudos realizados com crianças vêm demonstrando que, dentre essas proteínas, a  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) é considerada a mais imunogênica e também a mais frequente dentre as proteínas do soro do leite. Cinquenta por cento ou mais das proteínas do soro de leite são compostas por BLG (BAHNA, 2002; RUITER et al 2007, WAL, 2002).

Embora isolada há algumas décadas, as funções da  $\beta$ -lactoglobulina ainda são desconhecidas. Algumas características descritas dessa molécula incluem sua capacidade de ligação ao cálcio, ao zinco e a algumas moléculas hidrofóbicas (WALZEN et al, 2001). Entretanto, Wit e seus colaboradores, em 1998, atribuíram a essa proteína a capacidade de transportar a provitamina A. De acordo com o autor, a BLG é estável frente aos ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, o que a torna um resistente carreador de retinol (provitamina A) da vaca para seu filhote. Contudo, essa função biológica não parece ser importante para humanos, o que talvez explique o fato do leite humano não conter  $\beta$ -lactoglobulina, permanecendo ainda desconhecida, se é que ela existe, a proteína do leite humano com função equivalente (WIT et al, 1998).

## 1.6 Modelos experimentais

Os modelos animais são ferramentas poderosas para ajudar a responder algumas das difíceis questões envolvidas no desenvolvimento da alergia alimentar. As pesquisas em humanos são limitadas por questões éticas e a chance de se gerar uma reação anafilática fatal no indivíduo estudado é preocupante (BOCK; MUNOZ-FURLONG; SAMPSON, 2001).

Esses fatos têm estimulado o interesse no uso de modelos animais para prever possíveis gatilhos da alergia e identificar quais são os mecanismos que envolvem as vias alérgicas, bem como propor novos tratamentos terapêuticos.

Camundongos são os animais predominantemente utilizados no estudo de várias doenças, devido a seu tamanho relativamente pequeno, ao fato de serem animais prolíficos de ciclo reprodutivo rápido, fáceis de serem acondicionados, de permitirem a manipulação genética e apresentarem um sistema imune muito semelhante ao humano em vários aspectos (ALDEMIR; BARS; HEROUET-GUICHENEY, 2009; MEEUSEN et al, 2009).

O uso de camundongos na pesquisa por muitas décadas levou ao contínuo desenvolvimento de ferramentas moleculares que permitiram melhor compreensão dos fenômenos investigados. A caracterização da biologia, imunologia e genética dos camundongos já é bem estabelecida. Todo esse conhecimento fez com que as espécies murinas se tornassem bons modelos para estudar alergia alimentar. Várias linhagens já foram utilizadas nesses estudos, incluindo C3H/HeJ, BALB/c, C57BL/6 e DBA/2 (MCCLAIN e BANNON, 2006).

Uma das maiores barreiras envolvendo modelos murinos no estudo da alergia alimentar é a forte tendência do sistema imune dos animais escolhidos desenvolver tolerância oral aos antígenos ingeridos (THANG et al, 2011; BAILON et al, 2012). Para evitar esse fato, as pesquisas têm se concentrado em certas linhagens que mais rapidamente desenvolvem uma resposta imune do tipo Th2 (ou seja, indutora de alergia), a saber: C3H/HeJ (LI et al, 1999; LI et al, 2000; MORAFO et al, 2003) e BALB/c (MORAFO et al 2003, THANG et al, 2011; BAILON et al, 2012, GONIPETA et al, 2010)

Muitas são as vias de sensibilização alérgica, incluindo as vias oral, nasal, intraperitoneal, intragástrica e subcutânea (DUNKIN; BERIN; MAYER, 2011). Também deve-se salientar que a presença de adjuvantes no estabelecimento do modelo é importante e provoca modificações no sistema imunológico. Na ausência de adjuvantes, a resposta normal a antígenos alimentares está associada à tolerância nas mucosas e não em alergenidade (CHEN et al, 1995; van WIJK e KNIPPELS, 2007). Isso foi demonstrado quando níveis de IgE estavam mais altos em um modelo de alergia alimentar quando usaram hidróxido de alumínio como adjuvante, porém, os níveis de IgG1 não foram diferentes quando o adjuvante era ou não usado (SILVA et al, 2006).

A toxina colérica (CT) é um adjuvante de mucosas comumente utilizado para induzir respostas Th2 e também a secreção de IL-4 em modelos murinos (MARINARO et al, 1995). Porém, o uso de toxina colérica como adjuvante apresenta limitações uma vez que ela é considerada muito tóxica para humanos ainda que esforços estejam sendo feitos para que sua atividade adjuvante seja isolada do seu potencial tóxico. Esse efeito tóxico também pode contribuir para o desencadeamento da reação inflamatória vista nesses modelos. Sendo assim, esta é uma limitação do uso de toxina colérica como adjuvante, pois esta conduz a um perfil inflamatório devido à sua capacidade tóxica e não ao desencadeamento do processo alérgico. Também a toxina colérica conduz a (i) um aumento da permeabilidade intestinal de forma exacerbada (ii) captação elevada de antígeno, (iii) a apresentação antigênica desses antígenos de forma mais acelerada (iv) a troca de isotipo de células B, que passam a produzir IgA além de interferir no perfil de citocinas produzidas e proliferação de células T (HOLMGREN et al, 2003). Portanto, esse adjuvante conduz a um processo inflamatório exacerbado que não se assemelha à inflamação alérgica observada em humanos.

Embora as reações alérgicas (anafilaxia) às proteínas do leite sejam conhecidas desde os trabalhos pioneiros de Besredka em 1909, o estabelecimento de modelos experimentais para se estudar sistematicamente o fenômeno é muito recente.

No ano de 1999, Li e colaboradores (LI et al, 1999) desenvolveram técnicas para induzir hipersensibilidade mediada por IgE em camundongos C3H/HeJ de três semanas de idade de forma a produzir um modelo para o estudo das alergias. Os animais eram sensibilizados por via intragástrica com proteínas de leite e toxina colérica como adjuvante, recebendo reforços com o antígeno solúvel semanalmente por cinco semanas. Esse trabalho foi um dos pioneiros no estudo de alergia às proteínas do leite de vaca que gerou hipersensibilidade sistêmica por meio de sensibilização oral e subsequente desafio. Seis semanas após a primeira sensibilização, os níveis de IgE antígeno-específica foram significativamente maiores. Esses animais, ao serem desafiados intragastricamente com o alérgeno, desenvolviam anafilaxia sistêmica, com reações acompanhadas de sintomas respiratórios. Os níveis de histamina aumentaram nos animais sensibilizados e desafiados. Esse modelo também mostrou que as citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5) estavam aumentadas no baço dos animais alérgicos sendo que não foi possível detectar IFN-gama. Esses achados confirmaram a associação entre a alergia alimentar às proteínas do leite de vaca e as respostas do tipo Th2 (LI et al, 1999). Apesar do modelo experimental ter promovido aspectos

cl clinicamente relevantes das inflamações alérgicas, nota-se a intensa manipulação dos camundongos além do longo período experimental.

Um outro estudo posterior, publicado por Morafo e colaboradores (MORAFO et al, 2003) investigou a suscetibilidade de diferentes linhagens à alergia alimentar, seguindo o protocolo desenvolvido por Li e colaboradores (LI et al, 1999). A pesquisa focou em duas linhagens: C3H/HeJ e BALB/c que eram sensibilizados por via intragástrica a proteínas do leite de vaca e proteínas de amendoim, utilizando a toxina colérica como adjuvante. O fato interessante foi que, mesmo a linhagem BALB/c sendo rotineiramente utilizada como modelo para alergia alimentar por meio de sensibilização sistêmica intraperitoneal, os animais não desenvolveram hipersensibilidade nesse estudo, enquanto que os camundongos C3H/HeJ reagiram aos dois antígenos. Os níveis de IgE específica para proteínas do leite de vaca, durante o desafio na sexta semana estavam elevados nos camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados, porém, apenas um pouco acima dos níveis encontrados em animais não manipulados. Reações anafiláticas foram observadas em camundongos C3H/HeJ os quais apresentam níveis séricos altos de histamina. No entanto, camundongos BALB/c não apresentaram tais reações.

Outros estudos mostraram com sucesso a sensibilização a proteínas do leite por via intraperitoneal (THANG et al, 2011; BAILON et al, 2012). A rota mais efetiva para sensibilização depende da linhagem de camundongos que é utilizada e deve ser levada em consideração ao se estabelecer um modelo de alergia alimentar.

Um trabalho publicado por Dunkin e colaboradores (DUNKIN; BERIN; MAYER, 2011) avaliou o impacto dos alérgenos do leite por diferentes rotas de sensibilização na presença ou não da toxina colérica como adjuvante. Camundongos C3H/HeJ com três semanas foram expostos à alfa-lactoalbumina (ALA) pelas vias intragástrica, intranasal, subcutânea ou sublingual. Embora a sensibilização tenha ocorrido com sucesso por todas as vias escolhidas, a via subcutânea foi a responsável por produzir a maior resposta de IgE dentre todas as outras vias. Um fato interessante observado foi que a presença da toxina colérica foi um fator mais significativo para o sucesso da sensibilização que a via utilizada, uma vez que na ausência da toxina colérica como adjuvante não houve sensibilização.

Adel-Patient e colaboradores, em 2005 (ADEL-PATIENT et al, 2005), utilizaram um modelo experimental para estudo das proteínas do leite. O protocolo utilizou camundongos BALB/c na idade de seis semanas que eram sensibilizados com administração de BLG

emulsificada em Adjuvante Completo de Freund (CFA). Já em 2011, o trabalho do mesmo grupo de pesquisa, publicado por Adel-Patient e colaboradores (ADEL-PATIENT et al, 2011), estabeleceu uma metodologia diferente da publicada anteriormente: o modelo utilizado foi realizado com animais BALB/cJ que recebiam múltiplas gavagens (dias 1-3) e (8-10) com algumas doses de BLG em forma nativa (purificada) ou hidrolisada. Esses camundongos eram posteriormente submetidos à imunização intraperitoneal com BLG em hidróxido de alumínio como adjuvante e 14-18 dias após a primeira imunização, os animais recebiam o reforço antigênico utilizando, novamente, hidróxido de alumínio. O objetivo do grupo, ao fornecer um tratamento prévio com a proteína por via oral (gavagem) e posteriormente desafiá-los, era verificar se haveria diferenças imunológicas nos camundongos que permitissem torná-los tolerantes à proteína. Os resultados mostraram que foi possível desenvolver tolerância por meio de gavagem com a proteína em forma nativa, uma vez que os animais não tratados previamente tinham níveis altos de IgE específica para BLG, enquanto que os camundongos que receberam as gavagens prévias, tiveram níveis mais baixos desse anticorpo. Esses modelos experimentais são importantes, ainda que haja uma manipulação exacerbada dos animais e, como pode ser observado, utilizam diferentes vias de sensibilização e tipos de adjuvantes.

Da mesma forma que as proteínas do soro do leite são consideradas fortes alérgenos, as proteínas do amendoim tem alta alergenicidade e a incidência de alergia alimentar ao amendoim está crescente tanto em crianças quanto em adultos no Reino Unido e nos Estados Unidos (SICHERER, MUNOZ-FURLONG, SAMPSON, 2003; KAGAN et al, 2003). Esse fato é oportuno para que, cada vez mais, novos modelos de alergia alimentar ao amendoim sejam desenvolvidos. Em 1995, Gerlinde Teixeira, realizou um trabalho mostrando que camundongos alimentados previamente com amendoim ou castanha de caju e, posteriormente, imunizados com as proteínas desses dois elementos, tornaram-se tolerantes, produzindo baixos títulos de anticorpos séricos, porém, quando expostos novamente às mesmas proteínas não apresentaram alterações histológicas no trato gastrointestinal. Contudo, quando os camundongos eram imunizados sem antes receber, por via oral, a amendoim ou castanha de caju, os animais se tornavam imunes e, quando submetidos sequencialmente a uma dieta contendo as proteínas alergênicas, reações inflamatórias crônicas do intestino eram observadas (Teixeira, 1995).

Li e colaboradores (2000), utilizando diferentes doses de proteínas de amendoim ou castanhas em camundongos C3H/HeJ por via intragástrica e a toxina colérica como adjuvante, mostraram que esses alérgenos induziram IgEs específicas para os antígenos e que a dose mais baixa (5mg) foi mais eficaz do que a outra dose (25mg) de induzir os sinais clínicos (LI et al, 2000), mostrando que, não somente a via, mas a dose da proteína antigênica também é relevante.

O grupo de Stephan Strobel, sob primeira autoria de Jessica Strid (STRID et al, 2004) publicou um trabalho interessante e inovador visando comparar a reatividade imunológica das proteínas ovalbumina (OVA) e proteína do amendoim. Camundongos BALB/c recebiam o antígeno por meio de gavagem em dose única, variando de acordo com o peso corpóreo do animal. Observou-se que as proteínas do amendoim quando administradas por via oral em baixas doses promoviam sensibilização enquanto a OVA conduzia ao desencadeamento de tolerância oral. Portanto, o trabalho revelou a capacidade imunogênica das proteínas do amendoim além da necessidade de utilização de baixas doses do alérgeno para promoção da reatividade imunológica.

Já o grupo de Berin e colaboradores (2006), utilizou duas linhagens: a C3H/HeJ e BALB/c, ofertando dois antígenos diferentes para cada linhagem. Os camundongos C3H/HeJ recebiam extrato de proteínas de amendoim enquanto os animais BALB/c recebiam BLG. Esse modelo utilizou a via intragástrica e a toxina colérica como adjuvante. Os animais que receberam os extratos de proteína de amendoim tiveram reações anafiláticas, porém, esse modelo não se mostrou eficaz para a BLG em camundongos BALB/c (BERIN et al, 2006). Outras vias também foram exploradas para esses antígenos. Fischer e seus colaboradores, no ano de 2005, utilizaram a via nasal para sensibilizar animais da linhagem C57BL/6 juntamente com a toxina colérica e foi observado aumento de IgE específica para o alérgeno (amendoim), aumento de IL-17 e IgG (FISCHER, et al 2005). Porém, nem todos os estudos utilizaram os benefícios dos adjuvantes. Em 2009, Parvataneni e colaboradores publicaram um trabalho interessante e inovador. Utilizando camundongos BALB/c, os autores desenvolveram um modelo de alergia alimentar à castanha de caju, utilizando sensibilização transdérmica dos animais, sem o uso de adjuvantes. Ao serem desafiados oralmente, os animais mostraram sinais de anafilaxia e hipotermia, com a produção esplênica de IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas do tipo Th2 (PARVATANENI et al, 2009).

Saldanha e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo crônico de alergia alimentar mediada por IgE em camundongos BALB/c sensibilizados com OVA. Os animais eram sensibilizados subcutaneamente com a proteína adsorvida em hidróxido de alumínio como adjuvante. Duas semanas depois, os mesmos animais recebiam reforço subcutâneo para uma semana depois serem desafiados oralmente com solução de OVA em mamadeira. Esse trabalho mostrou que os camundongos sensibilizados tinham níveis elevados de IgE anti-OVA quando comparados ao grupo não sensibilizado, perda de peso, aumento de eosinófilos, muco produzido por células caliciformes e mastócitos (SALDANHA et al, 2004). Nesse trabalho, os autores confirmaram o fenômeno de aversão ao antígeno, como foi mostrado por Cara e colaboradores, no ano de 1994 (CARA et al, 1994).

Em 2014, Batista e colaboradores, baseados no modelo de Saldanha (2014), publicaram um trabalho em que camundongos BALB/c eram imunizados com OVA adsorvida em hidróxido de alumínio, por via subcutânea. Posteriormente, esses animais recebiam o reforço da imunização com OVA diluída em salina e eram desafiados porém, diferente do modelo do mesmo grupo (SALDANHA et al, 2004), os animais recebiam OVA na dieta (ração) por um período de 7, 14 ou 21 dias. Observou-se que a ingestão prolongada de antígeno gerou consequências imunológicas nos animais: os níveis de IgE específicas para OVA eram menores nos animais que ingeriram antígeno por mais tempo quando comparado àqueles que receberam apenas 7 dias e de desafio oral.

Portanto, o desenvolvimento de um modelo experimental de alergia alimentar é complexo e depende da linhagem de camundongos, da dose e natureza do antígeno, das vias de administração desses como também do adjuvante utilizado. Protocolos variados estão descritos na literatura cada um deles focando em um dos aspectos citados. Ainda que hajam modelos murinos descritos torna-se necessário o aprimoramento desses para que tenhamos modelos que sejam mais similares ao desencadeamento da doença alérgica em humanos.

### **1.7 O fenômeno de aversão imunológica**

No ano de 1994, Cara e colaboradores publicaram um trabalho mostrando, pela primeira vez, que animais sensibilizados com OVA apresentando níveis altos de IgE específica no soro, evitavam o consumo de soluções que continham esse antígeno, ainda que essa solução tivesse concentrações de sacarina para se tornar mais palatável. O protocolo utilizado para avaliar o comportamento dos animais consistia em disponibilizar duas



---

mamadeiras para um teste de preferência. Animais controle ou sensibilizados para OVA recebiam água em uma mamadeira e uma solução de OVA adocicada em outra durante 24 horas sem que houvesse condicionamento prévio com os animais em relação às soluções. Mesmo sendo a solução contendo OVA adocicada mais palatável, animais sensibilizados evitavam seu consumo, fenômeno descrito como “aversão antigênica” (CARA et al, 1994). Evidências mais recentes também sugerem que a alergia alimentar influencia o comportamento dos indivíduos e é capaz de alterar funções cerebrais. Um exemplo foi a demonstração de que animais sensibilizados e aversivos ao antígeno apresentavam níveis elevados de ansiedade e aumento na atividade neuronal em áreas do cérebro relacionadas com a percepção emocional (BASSO et al, 2003).

O objetivo deste estudo foi estabelecer um modelo murino de alergia alimentar à proteína beta-lactoglobulina (um dos componentes alergênicos do leite) com as características já descritas na literatura como típicas da alergia alimentar. Acreditamos que esse modelo pode auxiliar em estudos futuros dos mecanismos da alergia e também nas possibilidades terapêuticas para essa doença.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver um novo modelo experimental de alergia alimentar à  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) e avaliar o desenvolvimento de possíveis alterações imunológicas em camundongos.

### **2.2 Objetivos específicos**

1- Caracterizar o modelo de alergia alimentar à BLG por meio da avaliação do peso corpóreo e gordura perigonadal, análise histológica e da mensuração de IgE específica.

2- Investigar as alterações inflamatórias na mucosa intestinal tais como: número de eosinófilos e de linfócitos intraepiteliais, relação vilo/cripta e produção de muco.

3- Averiguar se existem alterações em mecanismos regulatórios da mucosa intestinal como a produção de IgA secretória e o perfil de citocinas.

4- Investigar o fenômeno da aversão ao antígeno ingerido.

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

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

#### 3.2 Indução da Alergia Alimentar

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

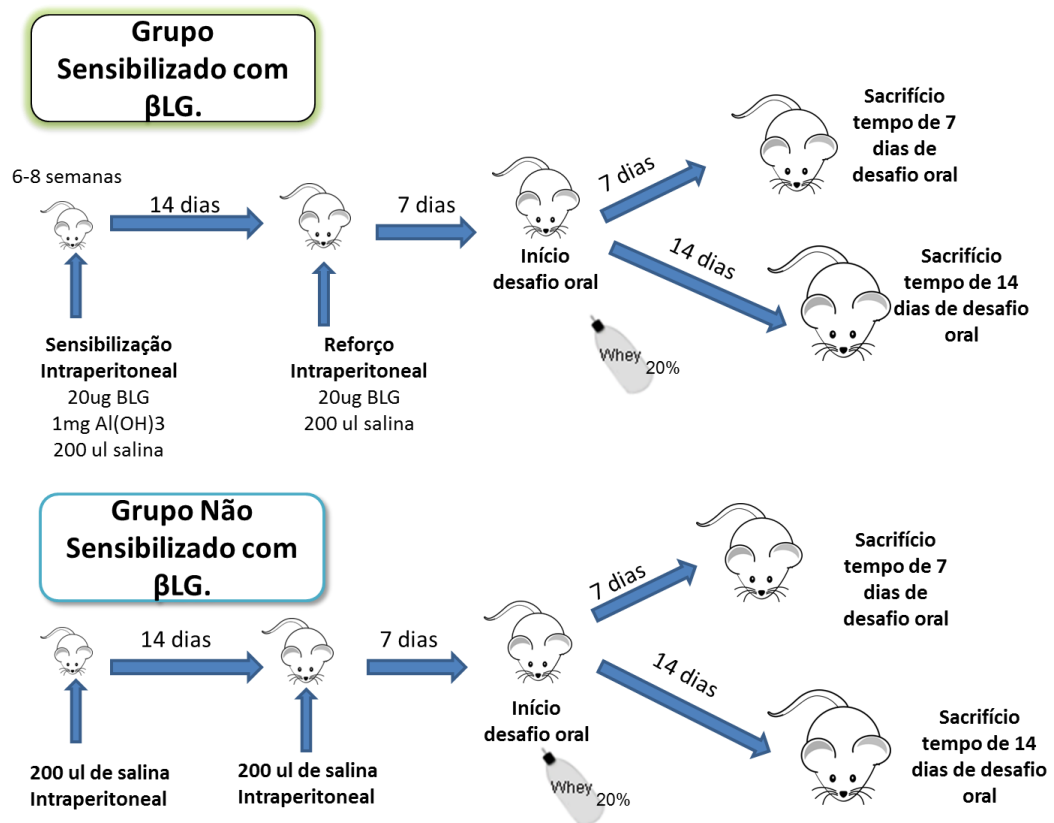


Figura 3– Desenho experimental do modelo.

### 3.3 Consumo de dieta

O consumo de dieta comercial (Purina, São Paulo, SP) foi mensurado por meio da verificação do peso da sobra de dieta na gaiola e do peso de dieta ofertada anteriormente. Assim, a partir da quantidade de dieta consumida pelos animais da gaiola, foi feita a média de consumo de cada grupo de animais.

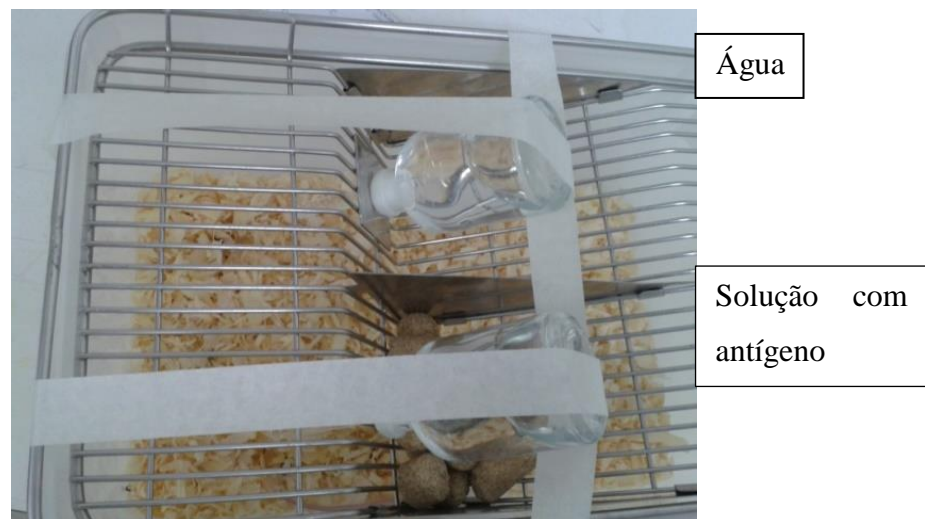
### 3.4 Consumo de líquido da mamadeira

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

### 3.5 Teste de preferência alimentar

Para verificar se os animais apresentavam alguma preferência ao consumo de BLG em detrimento de água, realizamos um teste de preferência alimentar. Três dias antes do teste ocorrer, os animais foram separados individualmente em gaiolas convencionais do biotério para que pudessem se acostumar ao novo ambiente. Nesse mesmo dia, duas mamadeiras idênticas, transparentes, com bicos de vidro e contendo água foram colocadas para cada animal, de forma que ele pudesse optar entre as mamadeiras. O objetivo foi, novamente, ambientá-los na nova situação. No dia do teste de preferência alimentar, foram colocadas duas mamadeiras por gaiola: uma contendo a solução antigênica e a outra apenas água. Foram mensuradas as quantidades de líquido ingerido de 4 em 4 horas durante um período de 24 h, que se deu no primeiro dia de desafio oral.

A cada mensuração, em provetas, as mamadeiras eram novamente preenchidas com o líquido, porém, trocava-se a posição das mesmas, para evitar o condicionamento pela localização delas na gaiola.



**Figura 4– Imagem representativa do posicionamento das mamadeiras na gaiola experimental para o teste de preferência alimentar.**

As mamadeiras eram trocadas de posição a cada 4 horas e media-se o consumo do animal durante esse período, totalizando 24 horas, sendo 6 medidas ao longo do experimento. Os animais foram mantidos individualmente separados durante este teste.

### 3.6 Coleta do Soro

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

### 3.7 Avaliação do peso do tecido adiposo

Durante a necropsia, foi retirado e pesado o tecido adiposo perigonadal e imediatamente pesado em balança de alta precisão.

### 3.8 Coleta do lavado intestinal

O conteúdo do intestino delgado foi coletado logo após a retirada do mesmo para a dosagem de IgA secretória (sIgA). Uma perfusão de 10ml de salina tamponada (PBS) 1x gelada utilizando seringa e agulha por uma das extremidades do intestino foi realizada e o lavado intestinal era coletado em tubos Falcon de 15ml pela outra extremidade. Após a coleta, o conteúdo foi centrifugado a 4 °C, na velocidade de 1200 RPM por 20 minutos. O sobrenadante era coletado e utilizado no mesmo dia para a dosagem de sIgA.

### 3.9 Análise histológica do jejuno proximal

Amostras do jejuno proximal de todos os grupos foram fixadas em formalina e processadas para análise histológica. Uma lâmina representativa de cada grupo, corada com hematoxilina e eosina (HE), foi fotografada utilizando-se uma câmera digital (Moticam 2500, China) acoplada a um microscópio óptico (Olympus Optical Co., Japan)

### 3.10 Inclusão e Coloração lâminas Histológicas - técnica *HE* (*Hematoxilina-Eosina*).

Cada amostra contendo o jejuno proximal foi colocada em cassetes, previamente identificados, e estes foram colocados em soluções de álcool obedecendo os referidos tempos e concentrações (Álcool 70% V/V - 30 min/ Álcool 80% V/V - 30 min Álcool L 90% V/V -

30 min). Após a imersão nos três alcoóis, os cassetes foram imersos em uma solução de álcool etílico absoluto que foi colocada em dois diferentes compartimentos. (ABSOLUTO I - 30 min/ ABSOLUTO II- 30 min). Após a imersão em álcool etílico absoluto, os cassetes foram imersos em xilol, também separados em dois diferentes compartimentos (XILOL I – 30 min/ XILOL II – 30 min). Após a imersão em xilol, os cassetes foram finalmente imersos em parafina líquida acondicionada em estufa 60°C. Deve-se observar os tempos e os 2 diferentes compartimentos. (PARAFINA I - 30 min / PARAFINA II - 30 min). Ao final deste processo, os cassetes foram abertos, os jejunos proximais e tecidos adiposos retirados e colocados em parafina em forma própria para secagem final e formação de blocos de parafina contendo os órgãos em questão. Acondicionou-se os blocos por 24 h para secagem. Após este período, os blocos foram desenformados e mantidos em freezer. Os blocos de parafina, contendo os tecidos incluídos, foram seccionados pela navalha de aço do micrótomo, obtendo-se geralmente cortes de 6 µm de espessura.

A coloração foi então realizada por meio da técnica HE, conforme descrito por Lev e Spicer (LEV e SPICER, 1964).

As análises histológicas dos órgãos foram feitas utilizando um processador de imagens acoplado a um microscópio óptico, como já descrito.

### **3.11 ELISA para medida da concentração de citocinas**

Para determinar a presença de citocinas nos órgãos de interesse foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA. As placas de 96 poços (Nunc-Immuno Plates MaxiSorp) foram sensibilizadas com 50 µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra IL-4, IL-10 e TGF-β e diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina Tween e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-caseína, por, no mínimo, 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com salina Tween. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes, assim como o padrão (do qual foi realizada diluição seriada) e as placas foram incubadas *overnight* a 4 °C.

No terceiro dia, as placas foram novamente lavadas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com 100 µL/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para IL-4, IL-10 e TGF-β (BD Pharmingen) marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/mL. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina

conjugada à peroxidase (100  $\mu\text{L}$ /poço) (Southern Biotechnology) foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2  $\mu\text{L mL}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 0,4 mg  $\text{mL}^{-1}$  de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20  $\mu\text{L}$ /poço de uma solução de ácido sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a 2 N. A absorbância ( $\lambda = 492 \text{ nm}$ ) de cada poço foi obtida pelo leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). Os valores das absorbâncias foram convertidos em ng/mL baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes, utilizadas como padrão.

### 3.12 ELISA para IgE sérica anti $\beta$ -lactoglobulina

A quantificação da produção de IgE específica para BLG foi realizada pelo método ELISA. As placas foram incubadas com solução (50 $\mu\text{L}$ /poço) contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongos 0,5 mg  $\text{mL}^{-1}$  (Southern Biotechnology) e diluídos (1:250) em tampão carbonato pH = 9,6 por, no mínimo, 18 horas a 4 °C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% *m/V* caseína por uma hora a temperatura ambiente (200  $\mu\text{L}$ /poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05% *V/V* Tween-20 por duas vezes.

O soro dos animais (50  $\mu\text{L}$  soro) foi incubado por 2 h em temperatura ambiente no escuro. Na seqüência, as placas foram novamente lavadas e realizou-se a incubação com BLG + Biotina (1mg/ml), sendo 50  $\mu\text{L}$  por poço por 1h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas por cinco vezes com solução salina-0,05% *V/V* Tween-20 e incubadas com estreptavidina ligada a peroxidase (Sigma), 50 $\mu\text{L}$ /poço na concentração de 1:10000, por 1 hora em temperatura ambiente; Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feito através da incubação com 4 mg de OPD, 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluídos em 10 mL de tampão citrato pH 5,0 a 100  $\mu\text{L}$ /poço. A reação foi paralisada pela adição de 20  $\mu\text{L}$ /poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. A leitura realizada em leitor de ELISA automático, em comprimento de onda de 492 nm.

A reação de ELISA descrita acima teve como controle positivo (padrão), soro de animal imunizado. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.



### 3.13 ELISA para sIgA do lavado do Intestino Delgado

Os títulos de anticorpos no muco foram medidos por ELISA. As placas (Nunc-Immuno Plates MaxiSorp) foram incubadas com solução (100µl/poço) contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  (Southern Biotechnology) e diluídos (1:2000) em tampão carbonato pH 9,6 por, no mínimo, 18 horas a 4 °C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 µl/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05% Tween por duas vezes.

O sobrenadante do muco foi diluído 1:80. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (1:2) sobrenadante das fezes em PBS-0,25% caseína, e as placas foram incubadas durante uma hora a temperatura ambiente. Na seqüência, as placas foram novamente lavadas, cinco vezes. Anticorpos IgA de camundongo conjugados com biotina 0,5mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:10000) em PBS-0,25% caseína foram adicionados aos poços (100 µL/poço). As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37 °C. A seguir, foram lavadas e adicionou-se uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (*Sigma*) em um diluição 1:10000 (100 µl/poço) em PBS-0,25% caseína durante uma hora a temperatura ambiente. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feita através da incubação com 4mg de OPD (Sigma), 2µL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluídos em 10 mL de tampão citrato 100 µl/poço, A reação foi parada pela adição de 20 µL/poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N.

A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), em comprimento de onda de 492 nm.

Essa reação de ELISA acima descrita teve como controle positivo (padrão), anticorpo purificados IgA ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) de camundongo (Southern Biotechnology) em uma diluição 1:10 em PBS-0,25% caseína. PBS-0,25% caseína foi utilizado como controle negativo.

### 3.14 Contagem de linfócitos intraepiteliais

O epitélio intestinal foi examinado em lâminas histológicas coradas com H.E em aumento de 20X em microscópio óptico. Os IEL foram identificados pela sua localização característica: basal em relação aos núcleos dos enterócitos e por apresentarem pequeno halo claro de citoplasma ao redor de seu denso núcleo esférico e regular. Para cada fragmento, foram contadas 500 células epiteliais, não incluindo células caliciformes, segundo a descrição

de Ferguson e Murray (1971). O número final de IEL foi expresso em relação a 100 células epiteliais.

### **3.15 Contagem de eosinófilos**

A contagem dos eosinófilos infiltrados na mucosa do jejuno proximal foi realizada foi realizada através da coloração dos cortes histológicos por Hematoxilina – Eosina (HE). O número de eosinófilos infiltrados foi contado ao microscópio óptico (40X) em 10 campos aleatórios. O resultado foi expresso como a média dos eosinófilos do grupo.

### **3.16 Morfometria dos vilos e criptas intestinais**

Imagens das lâminas histológicas dos vilos intestinais coradas com HE foram capturadas a partir do microscópio Olympus BX41 (Olympus, Center Valley, PA, USA) em aumento de 4x. Os vilos foram medidos, bem como as criptas, através de lamínula milimetrada. O resultado foi apresentado pela relação entre os tamanhos de vilos e cripta, sendo a média de cinco animais.

### **3.17 Avaliação da produção de muco intestinal**

A avaliação da presença de muco intestinal foi feita através do método de coloração por PAS (Reativo de Schiff). Neste método, os cortes foram desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados em PAS durante 10 minutos ou mais, até que atingissem uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes foram evidenciadas em um tom rosa escuro.

As lâminas foram montadas e as imagens das porções do intestino delgado foram capturadas em um aumento de 10X. As imagens foram analisadas com a utilização do programa ImageJ®. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total com muco. O resultado foi expresso em  $\mu\text{m}^2\text{PAS}/\text{campo}$ .

---

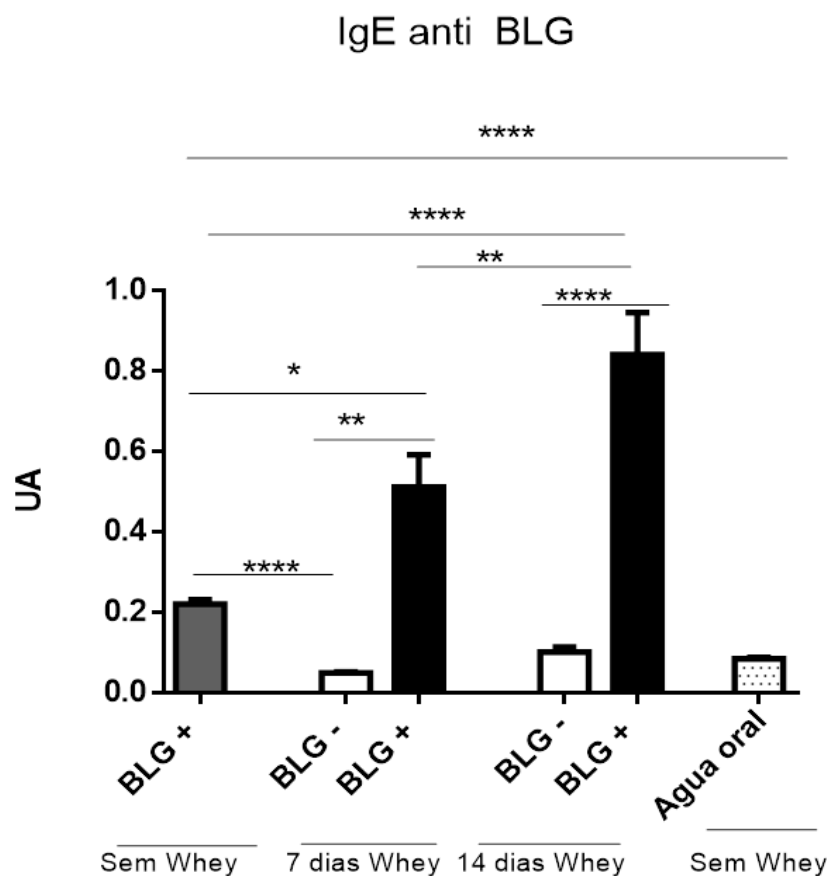
### 3.18 Análise Estatística

A significância estatística dos dados obtidos para os grupos foi analisada por meio da utilização do teste de variância ANOVA, com utilização do pós-teste de Tukey, a fim de comparar os grupos experimentais. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . O programa utilizado para fazer os testes foi o GraphPad Prism® versão 6.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados por via oral com uma solução contendo esse antígeno se tornaram alérgicos.**

Os camundongos BALB/c, ao serem submetidos ao protocolo de sensibilização intraperitoneal com a solução contendo antígeno adsorvido em adjuvante e salina, se tornam alérgicos após o desafio oral com *Whey* a 20% (contendo BLG). Os níveis de IgE específicas para a BLG estavam elevados nos animais que foram previamente sensibilizados e posteriormente desafiados, porém, em animais não sensibilizados e expostos à mesma solução, os níveis de IgE não se mostraram elevados em nenhum dos tempos experimentais, durante desafio oral de 7 ou 14 dias. (Figura 5). O grupo que foi sensibilizado e recebeu água durante todo o experimento, ou seja, não desafiado oralmente, apresentou IgE específica para BLG em níveis maiores do que os animais não sensibilizados, porém, esses níveis ainda foram significativamente menores quando comparados aos animais sensibilizados e desafiados com o mesmo antígeno. Observamos também que os animais que eram sensibilizados e desafiados oralmente por 14 dias apresentavam níveis maiores de IgE quando comparados aos animais que consumiram o antígeno por 7 dias, mostrando que a ingestão contínua da solução contendo BLG por períodos mais prolongados foi capaz de aumentar a IgE específica.

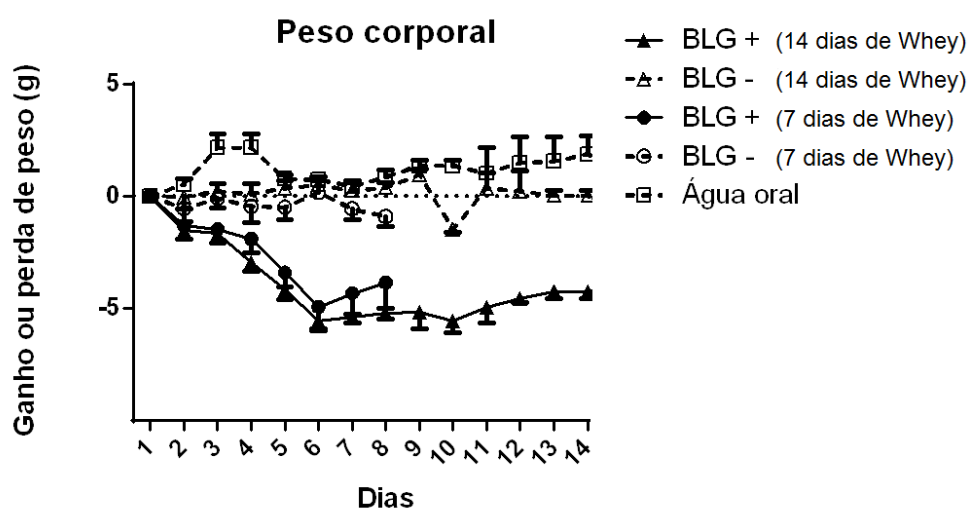


**Figura 5 – Níveis de IgE específica no soro de camundongos sensibilizados e desafiados com BLG por via oral.**

Camundongos BALB/c foram imunizados i.p. com 20ug de BLG + 1mg de Al(OH)<sub>3</sub>, 14 dias depois receberam imunização secundária: 20ug de BLG + 200 ul de salina e foram desafiados 7 dias depois da imunização secundária com solução contendo 20% de *Whey* como única fonte de líquido por 7 ou 14 dias. Os níveis de IgE anti-BLG no soro dos animais foram medidos por ELISA 24 horas depois do final do desafio oral. O grupo controle água consistiu de animais não manipulados. As barras representam a média + erro padrão da média (e.p.m). (n= 8) da absorvância obtida em soro total (sem diluir) e expressa em unidades arbitrárias. \*\*\*\*p<0,0001; \*\*\*p= 0,0003; \*\*p 0,0013; \* p =0,0087. Os resultados representam a soma de dois experimentos independentes.

#### 4.2 Os animais sensibilizados e desafiados por via oral apresentaram perda de peso corpóreo.

Um dos parâmetros clínicos alterado durante o desenvolvimento da alergia alimentar em modelos animais é o peso corpóreo (SALDANHA et al, 2004). Assim, o peso dos animais foi avaliado diariamente. Camundongos sensibilizados com BLG e desafiados posteriormente com *Whey* (contendo BLG) perderam peso. Ao final do desafio oral, os grupos que receberam 7 dias de desafio oral tiveram aproximadamente 20% do seu peso diminuído, o que representava cerca de 5 gramas (Figura 6). Com 14 dias da ingestão continuada do antígeno, os camundongos mantiveram a perda de peso corpóreo observada após 7 dias da ingestão do antígeno. Os animais que não foram sensibilizados e receberam somente o desafio oral não perderam peso. Tampouco foi observada perda de peso nos animais que ingeriam apenas água durante todo o período experimental.



**Figura 6– Peso corporal dos camundongos sensibilizados e desafiados com BLG por via oral.**

Camundongos BALB/c sensibilizados (BLG+) foram desafiados com uma solução de *Whey* a 20% durante 7 ou 14 dias e foram pesados diariamente durante o desafio oral. Os animais não sensibilizados (BLG-) receberam a solução de *Whey* a 20% durante o desafio oral por 7 ou 14 dias e também tiveram seu peso aferido diariamente. O grupo controle água consistiu de animais não manipulados que não receberam solução antigênica, também pesados. Os resultados foram expressos em gramas, com n de 6 animais por grupo.

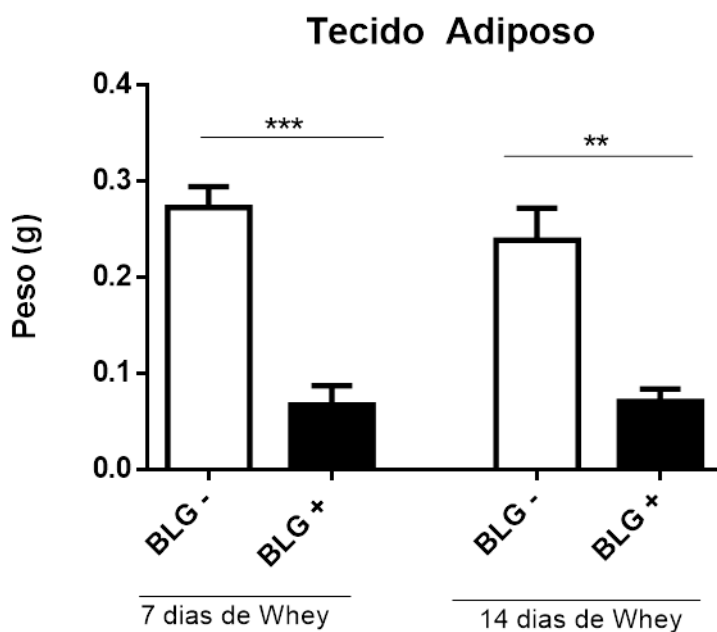


**Figura 7– Perda de peso corpóreo em camundongos alérgicos.**

- (a) Imagem representativa de um camundongo do grupo experimental não alérgico (BLG-).  
(b) Imagem representativa de um camundongo do grupo experimental alérgico (BLG+).

#### **4.3 O emagrecimento dos camundongos foi marcado por perda de tecido adiposo.**

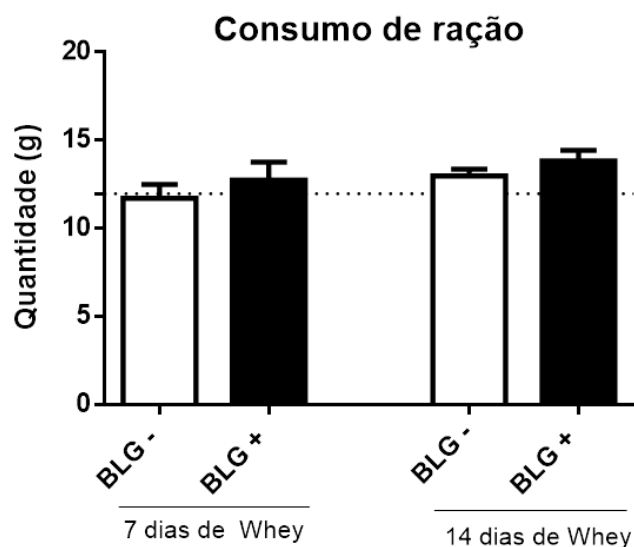
O emagrecimento observado nos camundongos alérgicos, no modelo proposto por Saldanha em 2004, se devia principalmente à perda de tecido adiposo (SALDANHA et al, 2004). Dessa forma, verificamos se esse padrão iria se repetir em nosso modelo de alergia alimentar à  $\beta$ - lactoglobulina. Após a necropsia, o tecido adiposo perigonadal foi pesado. A perda desse tecido em camundongos alérgicos foi significativamente maior quando comparada aos animais dos grupos controle, que não foram sensibilizados, após de 7 ou 14 dias de desafio oral (Figura 8). Esse emagrecimento não estava correlacionado à diminuição da ingesta de dieta comercial pelos animais, uma vez que a média desse consumo diário dos mesmos se manteve semelhante durante todo o experimento (Figura 9).



**Figura 8–** Peso, em gramas, de tecido adiposo perigonadal dos camundongos sensibilizados ou não com BLG.

Após a necropsia, os animais sensibilizados ou não, tiveram o tecido perigonadal removido e imediatamente pesados. Os resultados foram expressos através da média + e.p.m., do peso dos tecidos, somando-se dois experimentos independentes, “n” total de 6 camundongos. \*\*\*p <0,0003; \*\*p=0,0012



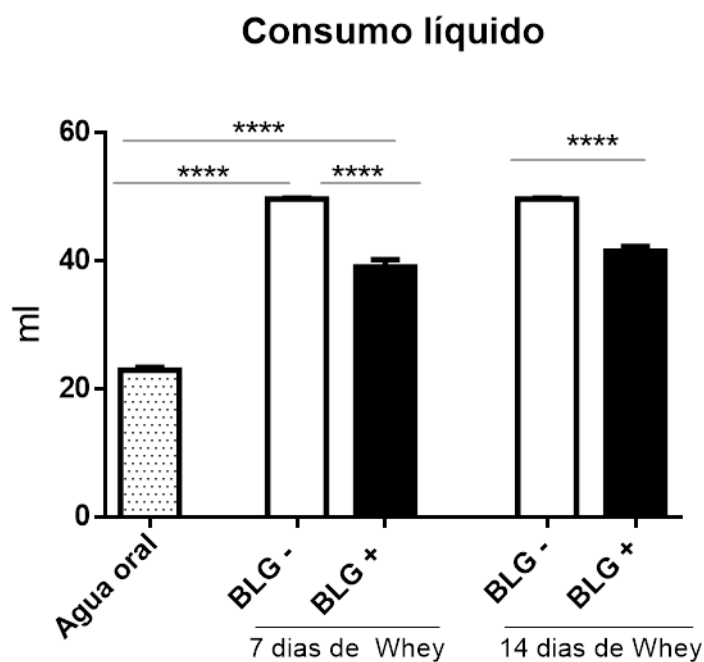


**Figura 9– Consumo de ração em gramas por camundongos sensibilizados ou não com BLG.**

Medimos o consumo de ração comercial ingerida por grupo de camundongos BALB/c sensibilizados ou não, diariamente, durante o desafio oral por 7 ou 14 dias. Os resultados foram expressos através da média + e.p.m da quantidade, em gramas, de ração, somando-se dois experimentos independentes, com “n” de 6 camundongos.

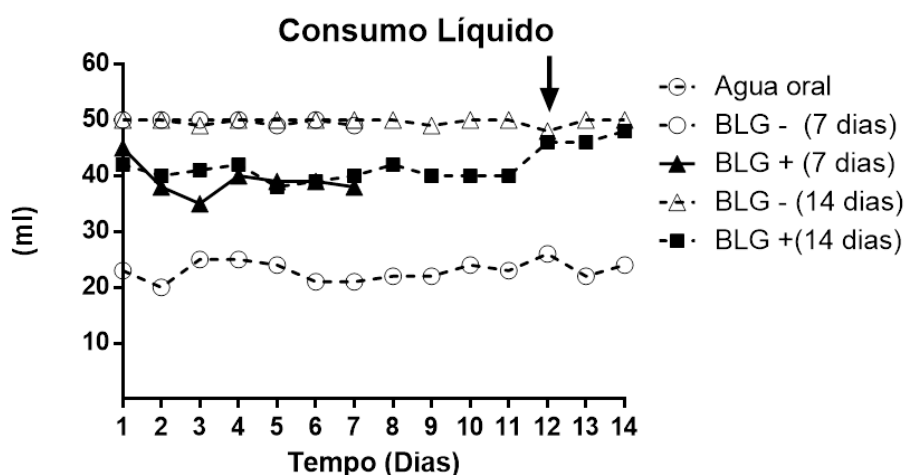
#### **4.4 Camundongos sensibilizados e desafiados com BLG por via oral apresentaram aversão à ingestão do antígeno.**

O fenômeno de aversão ocorre quando os animais evitam consumir soluções ou dietas contendo o antígeno para o qual são alérgicos (CARA et al, 1994). Para aferir se os animais do nosso modelo apresentavam aversão ao consumo de BLG, avaliamos diariamente o consumo da solução contendo a BLG fornecida em mamadeiras. Após 7 ou 14 dias de desafio oral, os camundongos controle não sensibilizados consumiam níveis elevados da solução contendo o antígeno, o mesmo acontecendo com os animais alérgicos, embora tenha ocorrido diferença significativa no consumo desses dois grupos. Quando comparados ao grupo controle não sensibilizado que ingeriu apenas água, observamos que os animais alérgicos consumiram menos líquido que os não alérgicos. Ainda assim, esse consumo foi muito maior do que aquele observado para os camundongos controle que ingeriram água (Figura 10). A partir do 12º dia, os animais sensibilizados e não sensibilizados consumiram a mesma quantidade de líquido.



**Figura 10 – Consumo líquido total dos camundongos sensibilizados ou não por BLG**

Os camundongos BALB/c não sensibilizados (BLG-) e os sensibilizados (BLG+) foram desafiados oralmente com uma solução contendo *Whey* a 20% durante 7 ou 14 dias. Diariamente, nesses dois tempos experimentais, a quantidade de líquido consumida por grupo era aferida. Os resultados foram expressos em média de consumo (em ml) + e.p.m., por grupo de 5 animais ao final dos tempos experimentais de 7 ou 14 dias de desafio oral. O grupo água oral representa animais não manipulados como controle do consumo líquido em geral. \*\*\*\*p <0,0001.



**Figura 11– Consumo líquido dos camundongos ao longo do experimento.**

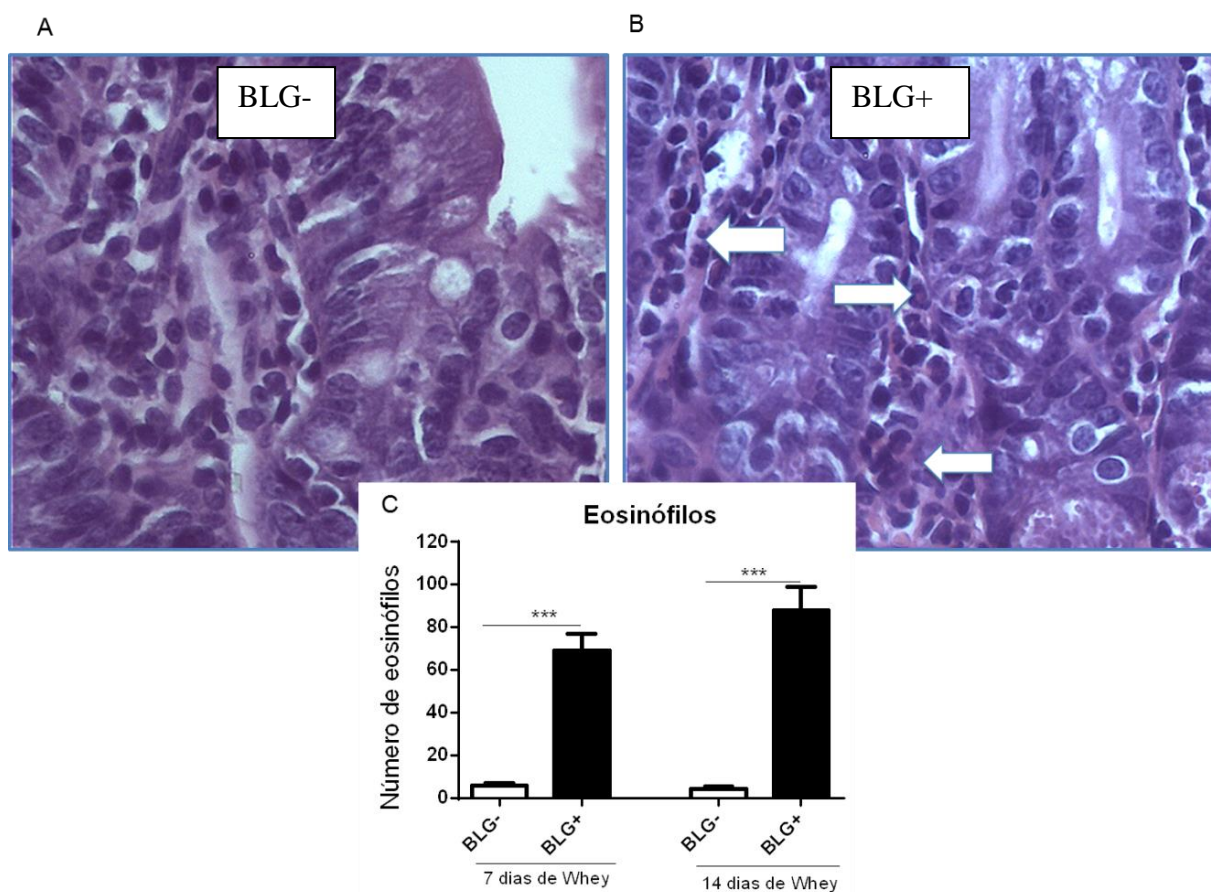
Os camundongos BALB/c não sensibilizados (BLG-) e os sensibilizados (BLG+) foram desafiados oralmente com uma solução contendo *Whey* a 20% durante 7 ou 14 dias. Diariamente, nesses dois tempos experimentais, a quantidade de líquido consumida por grupo era mensurada. Os resultados foram expressos em média de consumo (em ml) + e.p.m., por grupo de 5 animais ao longo dos tempos experimentais de 7 ou 14 dias de desafio oral. O grupo água oral representa animais não manipulados como controle do consumo líquido em geral ao longo dos dias.

## 4.5 Camundongos alérgicos apresentaram alterações histológicas na mucosa intestinal

### 4.5.1 Número de eosinófilos.

A presença do infiltrado eosinofílico é considerada um dos achados mais característicos da alergia alimentar (SAMPSON et al, 2005). Para verificar se isso poderia ser validado em nosso modelo, realizamos uma contagem de eosinófilos na mucosa do intestino delgado em campos aleatórios das lâminas histológicas coradas por HE no aumento de 40x. Após 7 ou 14 dias de desafio oral, os camundongos alérgicos possuíam número de eosinófilos mais elevados que os animais controle não sensibilizados. A ingestão de antígeno por um

período mais longo (14 dias) não alterou ainda mais o número de eosinófilos nos animais alérgicos (Figura 12).

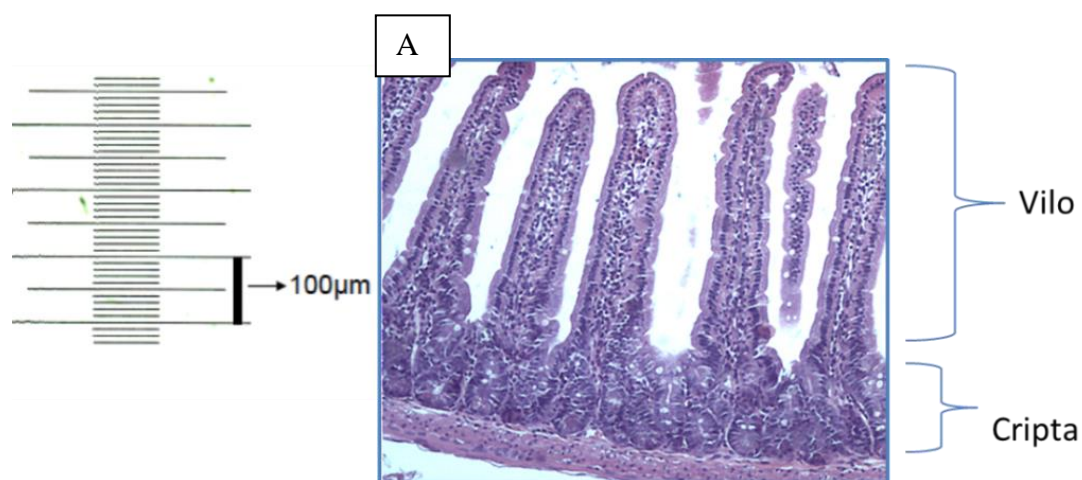


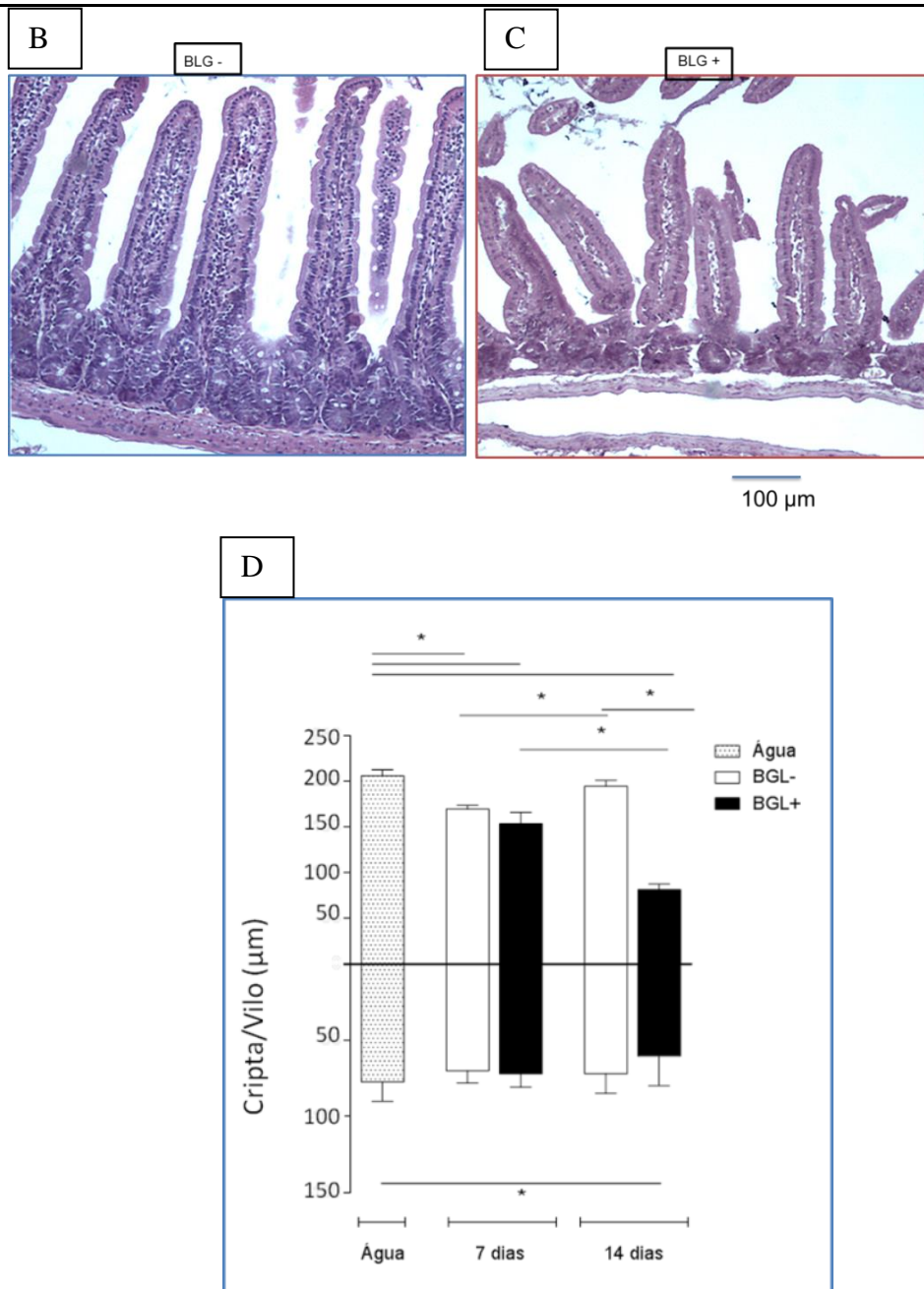
**Figura 12– Número de eosinófilos infiltrados na mucosa do intestino delgado de camundongos sensibilizados ou não com BLG.**

Camundongos BALB/c que foram sensibilizados (BLG+) ou não (BLG-), receberam solução de *Whey* a 20% contendo BLG por 7 ou 14 dias de desafio oral. Logo após esse desafio, os animais foram eutanasiados e tiveram o jejuno proximal coletado. Lâminas histológicas foram realizadas, coradas em H.E para visualização dos eosinófilos infiltrados na mucosa. Essas células foram contadas ao microscópio óptico (40x) em 10 campos aleatórios. O resultado foi expresso como a média dos eosinófilos de cada grupo + e.p.m. \*\*\*  $p < 0,0001$ . Em (A), imagem fotográfica da lâmina histológica de um camundongo não sensibilizado e em (B), sensibilizados. Ambas as imagens em aumento de 20x.

#### 4.5.2 Morfometria dos vilos intestinais

Existe uma relação entre o tamanho dos vilos e criptas dos animais no que se relaciona a danos teciduais secundários à inflamação (SERRA e JANI, 2006). Dessa forma, verificamos se essa medida estava alterada em nosso modelo. Os vilos intestinais foram medidos por meio do software ImageJ e a média do tamanho de cinquenta vilos e cinquenta criptas por animal foi determinada em  $\mu\text{m}$ . Camundongos sensibilizados (BLG+) e desafiados oralmente por 14 dias com a solução de *Whey* tiveram seus vilos encurtados em relação aos animais controles (BLG-) no mesmo tempo experimental. Também houve diferença entre os animais sensibilizados (BLG+) em ambos os tempos experimentais. A ingestão contínua de antígeno foi capaz de promover maior encurtamento do vilo nesses camundongos sensibilizados. A ingestão da solução de *Whey* alterou o tamanho dos vilos dos animais não sensibilizados (BLG-) em relação a animais não manipulados que receberam apenas água no tempo experimental de 7 dias.



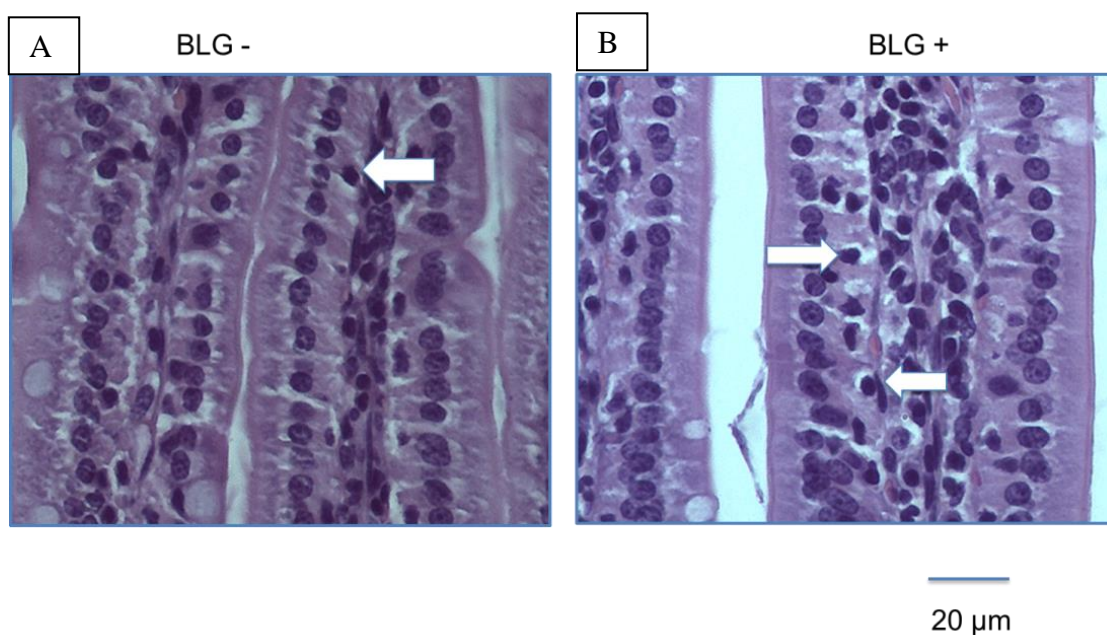


**Figura 13–Análise morfométrica de vilos e criptas intestinais.**

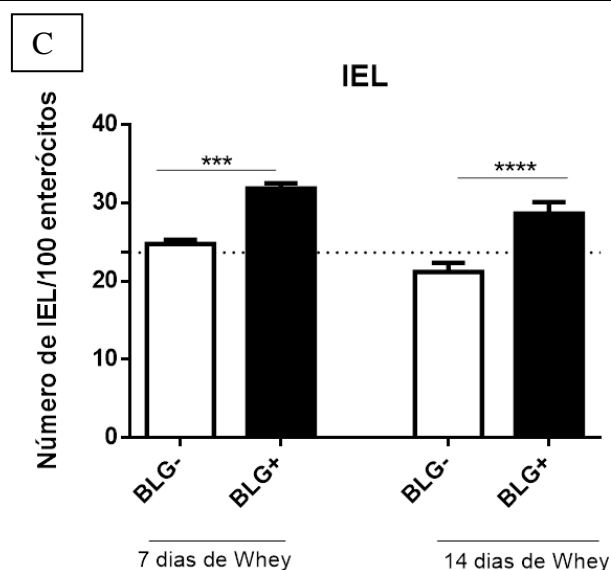
Em (A), um esquema ilustrando o vilos e a cripta de um camundongo aleatório, para melhor visualização do parâmetro com uma régua milimetrada em μm. Em (B) a imagem ilustrativa (4x) da arquitetura intestinal de camundongos não sensibilizados (BLG-). Em (C), imagem ilustrativa (4x) de animais sensibilizados (BLG+) Em (D) a relação vilos/cripta em μm. A parte superior do gráfico representa os vilos e a parte inferior, as criptas. As barras pretas são animais sensibilizados (BLG+) e as barras brancas são animais não sensibilizados (BLG-). Resultados expressos pela média de 50 vilos e 50 criptas + e.p.m, escolhidos aleatoriamente em um “N” de 5 animais. \*p<0,05

#### 4.5.3 Contagem de linfócitos intraepiteliais.

Os linfócitos intraepiteliais (IELs) constituem uma das principais populações de células T no intestino delgado (KUNISAWA e KYIONO, 2005) e essa população celular pode participar de respostas imunes inflamatórias e também no processo de indução da tolerância oral, por meio da secreção de algumas citocinas e ainda, produzem fatores de crescimento importantes para renovação epitelial e danos teciduais (KUNISAWA e TAKAHASHI, et al, 2007). Dessa forma, mensuramos a quantidade de IEL no intestino de camundongos sensibilizados e não sensibilizados. Os animais alérgicos tiveram números maiores de linfócitos intraepiteliais quando comparados aos animais não alérgicos (Figura 14).







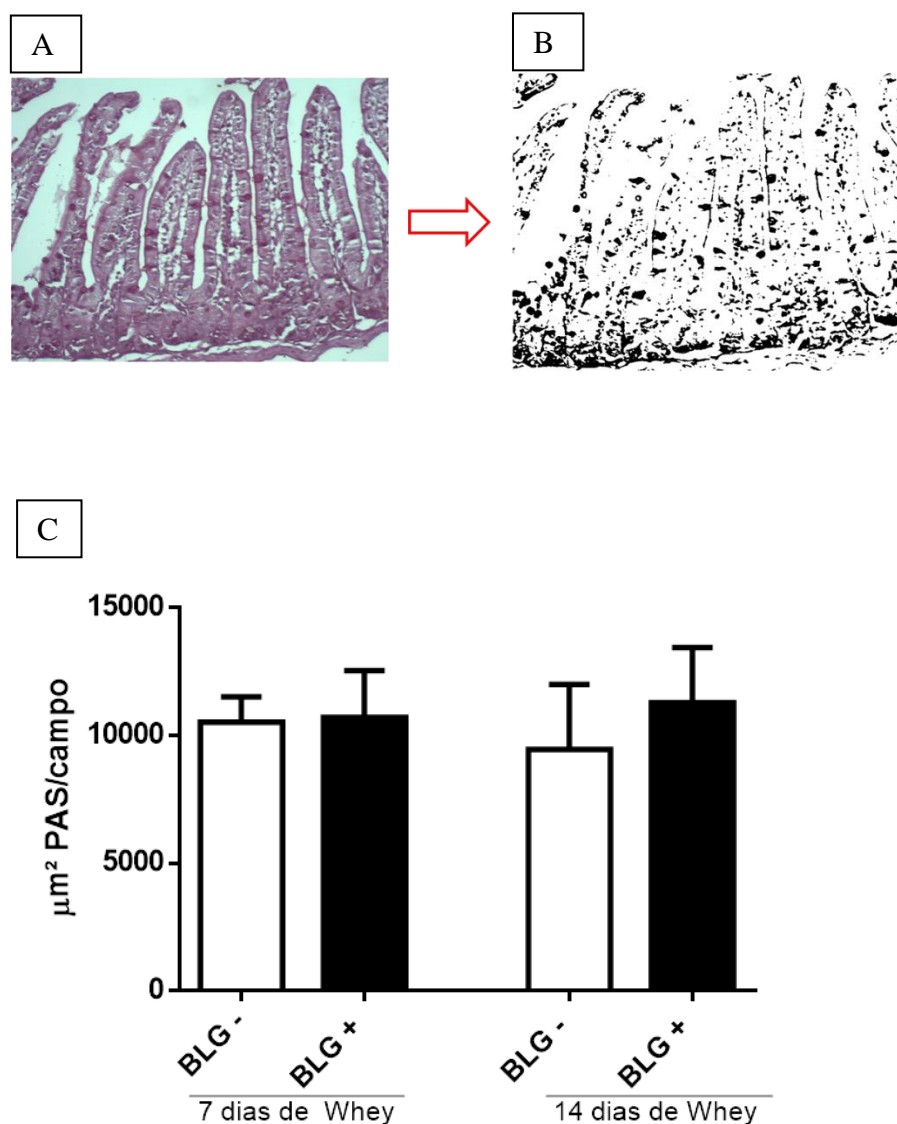
**Figura 14– Imagens de microfotografia na região do vilo intestinal com aumento de linfócitos intraepiteliais.**

Em (A), histologia em HE de linfócito intraepitelial (seta) no jejuno proximal, aumento de 20x, em camundongos não sensibilizados (BLG-). Em (B), imagem comparativa, em aumento de 20x, mostrando os IEL em camundongos sensibilizados (BLG+). Em (C), o gráfico correlacionando o número de IEL a cada 100 enterócitos contados no jejuno proximal desses animais. Esses resultados foram expressos em média por grupo + e.p.m, com “n” de 5 animais e 9 campos aleatórios contados na lâmina histológica. \*\*\*p = 0,001

#### 4.5.4 Produção de muco por células caliciformes.

Foi medida a produção de muco por células caliciformes da mucosa intestinal (em lâminas histológicas coradas por PAS) por meio da análise das imagens em software *ImageJ*. Os animais não apresentaram diferença na produção de muco sendo eles alérgicos, controle não sensibilizados ou não manipulados.





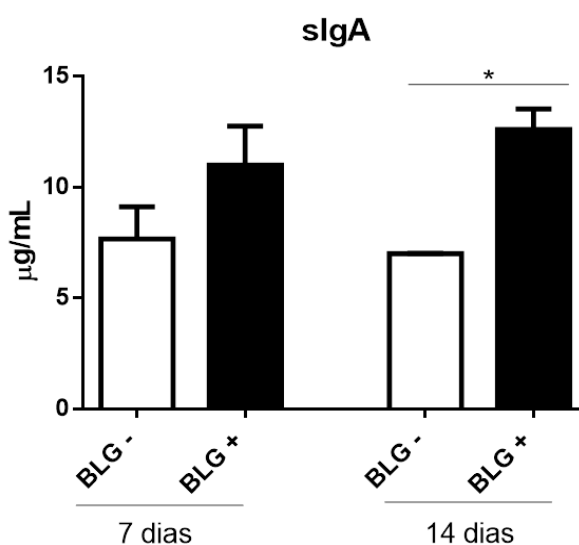
**Figura 15– Avaliação da produção de muco por células caliciformes.**

Camundongos sensibilizados (BLG+) e os não sensibilizados (BLG-) foram desafiados oralmente com uma solução contendo *Whey* a 20%. Após o desafio oral, foi realizada necropsia nos animais e o jejuno proximal foi coletado para fabricação de lâminas histológicas. Em (A), fotografia de lâmina histológica de um camundongo BALB/c corada em PAS, aumento de 10x. Em (B), a mesma imagem em “A”, porém, binarizada no programa ImageJ para quantificação de PAS. Em (C), os resultados obtidos em  $\mu\text{m}^2$  de área de PAS por campo de cada grupo + e.p.m de animais sensibilizados (BLG+) e não sensibilizados (BLG-), sendo o “n” amostral de cinco camundongos por grupo, totalizando 15 imagens analisadas (três por animal).

#### 4.6 Camundongos alérgicos apresentaram aumento da sIgA do lavado intestinal após 14 dias de ingestão continuada de antígeno.

A produção local de IgA ocorre fisiologicamente e a sIgA é capaz de reduzir a penetração de antígenos através da mucosa, oferecendo um mecanismo protetor, junto a outras funções, como a neutralização de toxinas e a tentativa de bloquear a aderência de bactérias ao epitélio (SCHMUCKER et al, 2003).

Medimos a produção dessa imunoglobulina no lavado intestinal dos camundongos após 7 ou 14 dias de desafio oral. Houve aumento de sIgA nos camundongos que foram sensibilizados com BLG e posteriormente desafiados durante 14 dias em relação ao seu controle não sensibilizado no mesmo tempo experimental. Os grupos que consumiram 7 dias da solução contendo o antígeno, em desafio oral, não apresentaram alterações nos níveis dessa imunoglobulina.

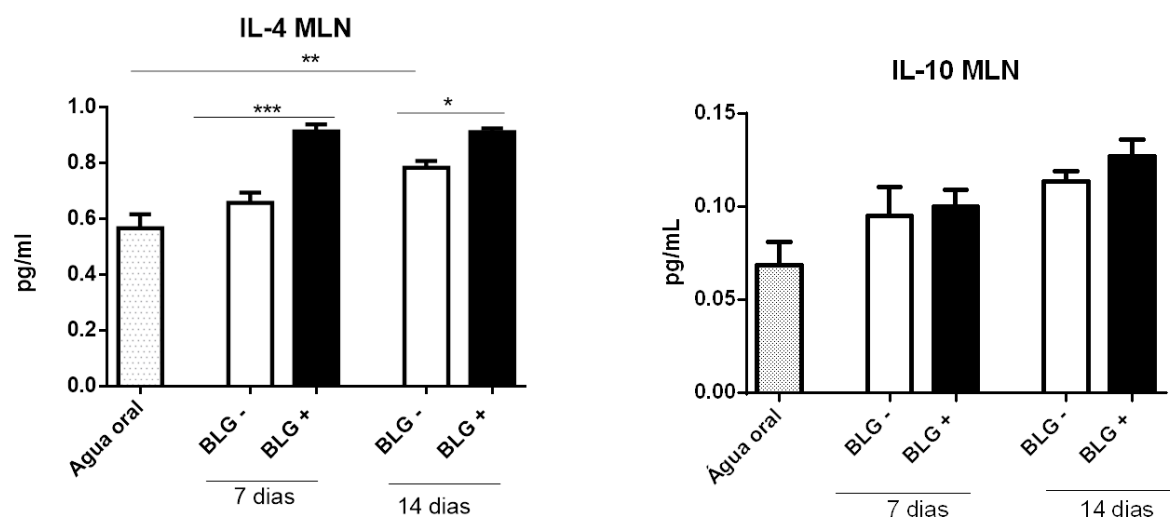


**Figura 16– Concentração de IgA secretória (sIgA) no lavado intestinal dos camundongos.**

Animais sensibilizados (BLG+) e não sensibilizados (BLG-), desafiados por 7 ou 14 dias, tiveram seus intestinos delgados lavados com PBS após necropsia e foi quantificada por ELISA a produção de sIgA. Os resultados foram expressos pela média de cada grupo de camundongos em µg/ml, com “N” de 4 animais por grupo,  $p = 0,0155$ . (Teste t).

#### 4.7 Avaliação da produção de citocinas nos linfonodos mesentéricos.

Os linfonodos mesentéricos são um dos sítios de indução de resposta imunológica (MOWAT, 2003). Mensuramos, nesses órgãos, a produção de duas citocinas: IL-4 e IL-10. A citocina IL-4 estava aumentada nos animais sensibilizados (BLG+) e desafiados oralmente com a solução de *Whey* em ambos os tempos de desafio oral, 7 ou 14 dias, em relação aos seus controles não sensibilizados (BLG-). Porém, esse aumento foi mais expressivo nos camundongos que receberam 7 dias de desafio oral. Curiosamente, somente a ingestão de *Whey* pelo grupo não sensibilizado (BLG-) por 14 dias foi capaz de aumentar os níveis de IL-4. Contudo, os níveis da outra citocina mensurada, IL-10, não se mostraram diferentes entre nenhum grupo durante todos os tempos experimentais de desafios orais.

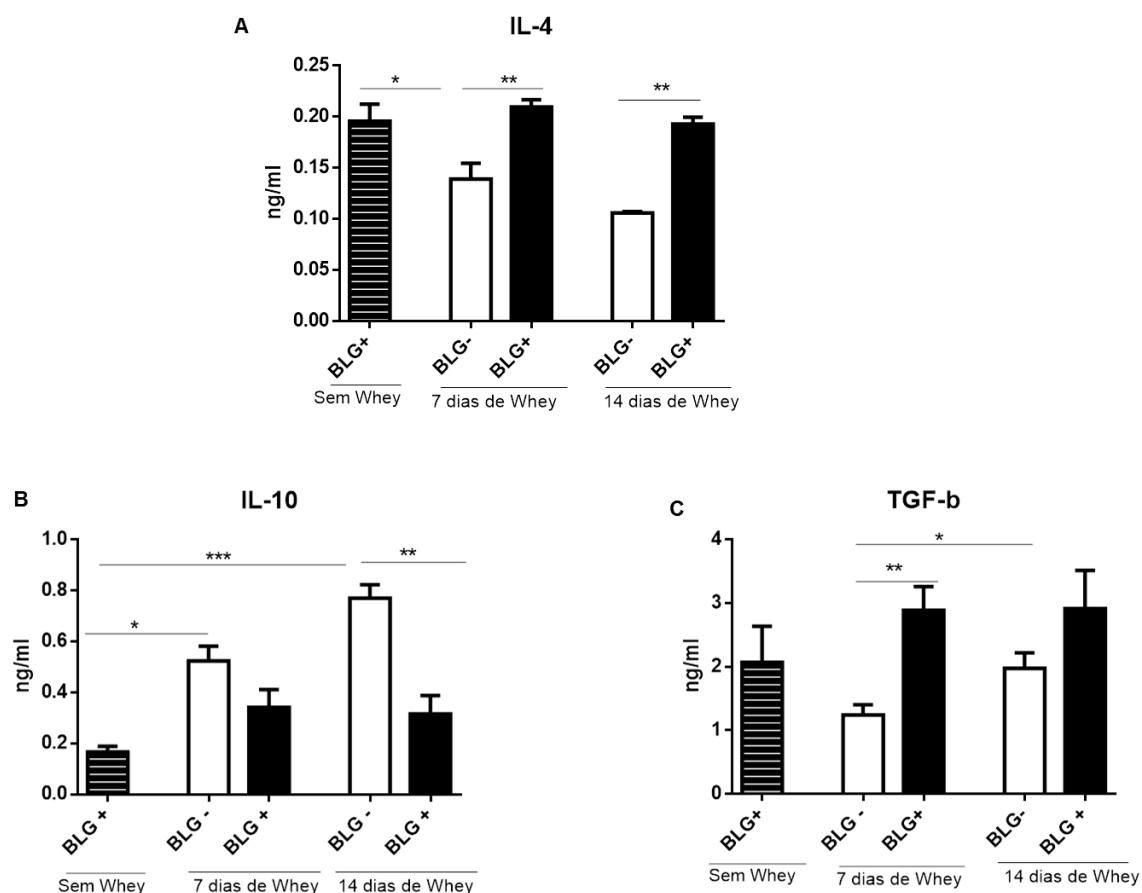


**Figura 17– Produção das citocinas IL-4 e IL-10 nos linfonodos mesentéricos.**

(A) Camundongos sensibilizados (BLG+) e não sensibilizados (BLG-) foram desafiados oralmente com uma solução contendo *Whey* a 20% nos tempos experimentais de 7 ou 14 dias e animais controles não manipulados ingeriram apenas água durante todo o experimento. Os níveis de IL-4 foram medidos através de ELISA, com os resultados expressos em pg/ml + e.p.m por grupo de animais, sendo o “n” de 4 camundongos por grupo. \*\*\*p = 0,004; \*\*p=0,019; \* (B) Submetidos ao mesmo protocolo, os camundongos tiveram seus níveis de IL-10 mensurados por meio de ELISA, com os resultados expressos em pg/ml + e.p.m por grupo de animais, sendo o “n” de 4 camundongos por grupo.

#### 4.8 Avaliação da produção de citocinas no jejuno proximal.

No modelo de alergia alimentar, o jejuno proximal é uma porção do intestino delgado afetada (SALDANHA et al, 2004). Analisamos assim, a presença de possíveis alterações na produção de citocinas nessa região. Foram medidas três citocinas consideradas importantes em nosso modelo: IL-4 (pró-inflamatória nesse modelo), IL-10 e TGF- $\beta$  (ambas anti-inflamatórias nesse contexto). A produção de IL-4 foi maior nos camundongos sensibilizados e desafiados por via oral quando comparada aos camundongos controle não sensibilizados após 7 ou 14 dias de desafio oral. Já os níveis de IL-10 foram menores nos camundongos alérgicos após 14 dias de desafio oral quando comparados aos animais não alérgicos. Porém, depois de 7 dias de desafio oral, essa diferença não existiu. O desafio oral por 7 dias com *Whey* promoveu aumento de TGF- $\beta$ . Contudo, o mesmo não foi observado durante 14 dias de ingestão de antígenos em animais sensibilizados. No entanto, em animais não sensibilizados foi observado aumento de TGF- $\beta$  quando receberam *Whey* por 14 dias.



**Figura 18– Produção de citocinas no jejuno proximal.**

Em (A), camundongos sensibilizados (BLG+) e não sensibilizados (BLG-) foram submetidos ao desafio oral em dois tempos experimentais: 7 ou 14 dias e seus níveis de IL-4 no jejuno proximal foram medidos através de ELISA. Também houve o grupo que foi sensibilizado (BLG+), porém, não desafiado oralmente com o antígeno (BLG+ sem *Whey*). Os resultados foram expressos em ng/ml + e.p.m por grupo, sendo o “n” de 4 camundongos, \*\* $p = 0,0012$ ; \* $p = 0,0256$ . Em (B), o mesmo protocolo de sensibilização foi seguido, sendo os mesmos animais anteriormente (em A) e os níveis de IL-10 foram medidos através de ELISA. Os resultados foram expressos em ng/ml + e.p.m por grupo, sendo o “n” de 4 camundongos, \*\*\* $p=0,0001$ ; \*\* $p=0,0012$ ; \* $p=0,0123$ . Em (C), os mesmos protocolos foram realizados e a citocina TGF- $\beta$  foi mensurada, também, por meio de ELISA. Os resultados foram expressos em ng/ml + e.p.m por grupo, sendo o “n” de 4 camundongos, \*\* $p=0,0067$ ; \* $p=0,0475$ .

#### 4.9 Preferência alimentar em camundongos sensibilizados ou não com BLG.

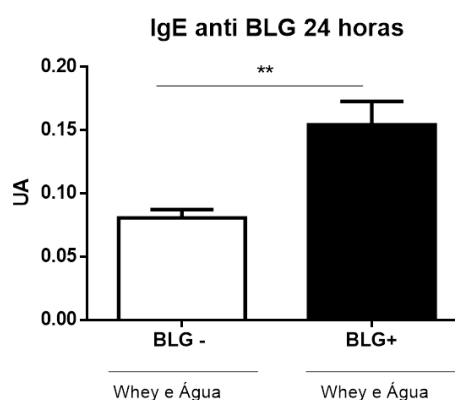
A entrada de moléculas no organismo pela via oral pode ter várias repercussões. Um estudo realizado por Cara e colaboradores (CARA et al, 1994) mostrou que alterações no sistema imune desencadeadas pela alergia alimentar interferem com o comportamento do animal afetando sua preferência alimentar. Nesse estudo, frente à possibilidade de ingerir ou não o antígeno OVA, os camundongos sensibilizados preferiam não consumir o antígeno. O consumo de água por esses animais foi maior quando comparado ao consumo da solução contendo OVA. Em nosso trabalho, procuramos avaliar se esse fenômeno ocorreria de forma semelhante. Demonstramos que os camundongos sensibilizados apresentaram o fenômeno de aversão à ingestão de solução contendo o antígeno (BLG) quando comparados aos animais não sensibilizados. No entanto, todos camundongos aos quais foi oferecida uma solução contendo BLG consumiram um volume maior de líquido do que aqueles que receberam água (Figura 10).

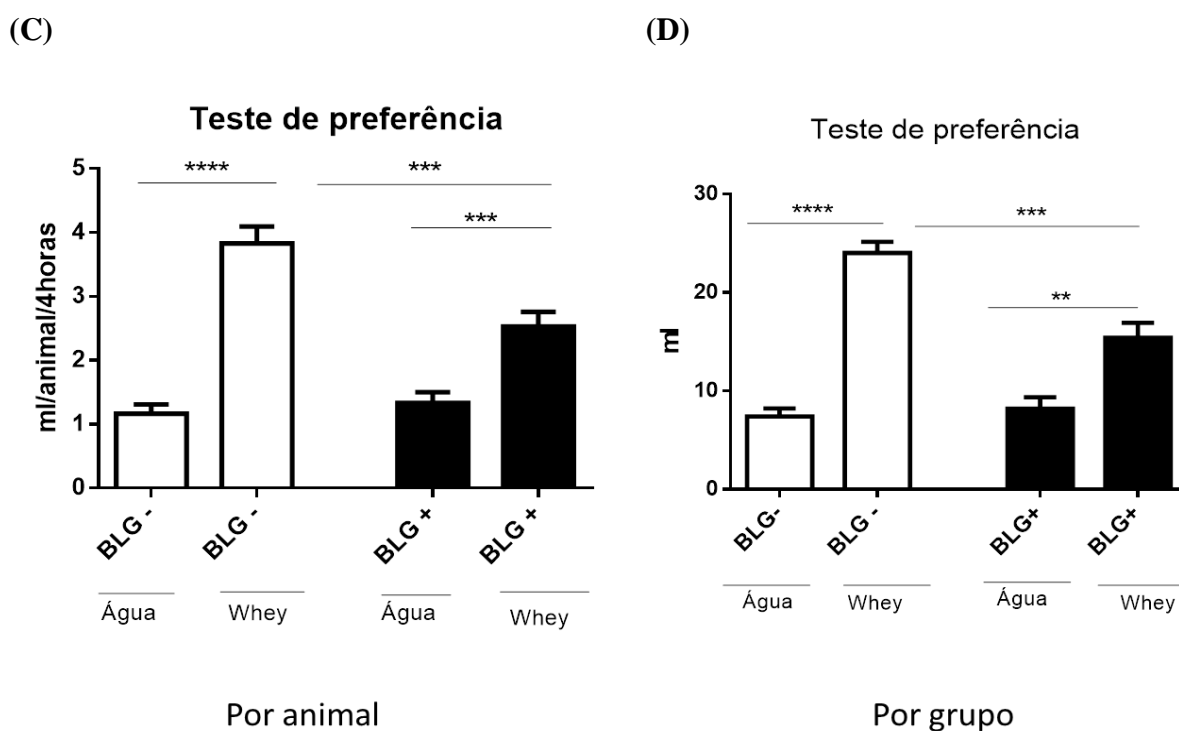
O teste de aversão, no entanto, não mede adequadamente a preferência já que os animais não têm escolha. Avaliamos, então, em um contexto diferente onde duas mamadeiras contendo água ou solução com BLG foram ofertadas aos camundongos e o consumo dos dois líquidos foi avaliado. Observamos que, diante da possibilidade de escolher entre ingerir uma solução contendo o antígeno (água + BLG) ou apenas água, os animais, mesmo alérgicos, optaram por consumir a solução contendo o antígeno durante todas as 24 horas em que esse consumo foi avaliado.

(A)



(B)





**Figura 19–Teste de preferência alimentar e sua relação com a produção de IgE específica no soro.**

(A) Imagem esquemática de duas mamadeiras idênticas, criadas para o teste de preferência. Em uma delas, colocou-se a solução contendo o antígeno (*Whey* 20% em água) e em outra, apenas água. Em (B) os níveis de IgE anti BLG após 24 horas do teste de preferência alimentar realizados por ELISA. Os resultados foram expressos em UA + e.p.m, sendo  $p = 0,0061$  (C) Consumo de água ou *Whey* por camundongo (ml) a cada 4 horas. Animais sensibilizados (BLG+) e não sensibilizados (BLG-) foram colocados em gaiolas individualizadas e receberam duas mamadeiras como opção de fonte líquida : uma contendo a solução de *Whey* a 20% e outra, apenas água. Propositamente, as mamadeiras eram trocadas a cada 4 horas para mensuração do líquido ingerido e também tinham sua posição invertida entre si, para não haver influência da localização das mesmas no comportamento alimentar. Os resultados foram expressos pela média de consumo de cada animal, a cada 4 horas + e.p.m, sendo o “n” de 5 camundongos não sensibilizados (BLG-) e 5 animais sensibilizados (BLG+). Em (D), a ingestão de líquido por grupo de camundongos durante as 24 horas iniciais de desafio oral. Os animais não sensibilizados (BLG-) e os sensibilizados (BLG+) tinham opção de ingerir uma solução contendo *Whey* a 20% ou água, em mamadeiras idênticas. Os resultados expressos em (ml) são a média do total de líquido ingerido por grupo + e.p.m após as 6 mensurações (24 horas de experimento) com “N” de 5 animais não sensibilizados (BLG-) e 5 animais sensibilizados (BLG+). \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p = 0,004$ .

---

## 5 DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores do nosso grupo relataram que camundongos submetidos à indução de alergia alimentar apresentam uma significativa perda de peso corporal após a ingestão contínua e restrita do antígeno em solução (SALDANHA et al., 2004) e esse processo era acompanhado por uma perda de tecido adiposo. Recentemente, Batista e colaboradores demonstraram que a ingestão prolongada do antígeno utilizado para a sensibilização alérgica na dieta por quatorze dias consecutivos era capaz de levar à diminuição da IgE específica para o antígeno (OVA) aos níveis de um animal sensibilizado e não desafiado. Essa redução dos níveis séricos de IgE promovida pela ingestão prolongada do alérgeno também promovia a recuperação parcial do peso desses animais (BATISTA et al, 2014).

Em nosso trabalho, camundongos sensibilizados com BLG e desafiados oralmente se tornaram alérgicos, apresentando elevada produção de IgE específica para o antígeno após 7 ou 14 dias de desafio oral. Ocorreu também nesses animais perda de peso sem que houvesse recuperação do mesmo. A tolerância oral, conforme já citado, se relaciona com a supressão celular e humoral de uma resposta imune específica (FARIA e WEINER, 2006) ou à estabilização da mesma em níveis que podem ser baixos ou até altos (VERDOLIN, 2001). No trabalho de Batista e colaboradores (2014), os animais que tiveram baixos títulos de anticorpos IgE específicos após a ingestão prolongada do alérgeno foram chamados animais dessensibilizados (BATISTA et al, 2014). No presente trabalho, o modelo de alergia alimentar à BLG demonstrou que, ao contrário do fenômeno recentemente publicado por Batista e colaboradores (2014), a ingestão durante 14 dias da solução contendo o antígeno torna os animais mais alérgicos, elevando significativamente os títulos de IgE específica quando comparados ao grupo que recebeu o antígeno por 7 dias. Nossa hipótese é que existem diferenças na capacidade imunogênica da OVA e da BLG sendo que esta última é capaz de gerar uma reação alérgica mais potente (maiores níveis de IgE). Além disto, existem diferenças estruturais importantes entre as duas moléculas com relação à glicosilação. A OVA, mas não a BLG, apresenta um número grande de resíduos de manose, o que a torna um bom ligante de receptores de manose em células dendríticas (HUNTINGTON e STEIN, 2001). Esses receptores podem ser especialmente envolvidos na indução de vias tolerogênicas nessas células enquanto que outros receptores (utilizados na captação da BLG) podem ser menos tolerogênicos.



O trabalho publicado por Saldanha e colaboradores (2004) mostrou que os animais sensibilizados intraperitonealmente e desafiados por via oral perdiam peso após uma semana de ingestão do antígeno de forma contínua (SALDANHA et al, 2004). De forma semelhante, em nosso modelo, os animais sensibilizados e desafiados apresentaram perda de peso durante o desafio oral em ambos os tempos de desafio, 7 ou 14 dias. Os animais não sensibilizados, por sua vez, não perdiam peso, o que nos permitiu inferir que a perda de peso se relaciona ao *status* inflamatório do animal alérgico. Além disto, o consumo de dieta foi igual entre os grupos sensibilizados ou não. Essa perda de peso foi observada também por Dourado e colaboradores (2011) em um modelo de alergia alimentar à OVA em que os animais eram cronicamente submetidos à ingestão do antígeno incorporado à dieta (DOURADO et al, 2011).

Em diversas doenças crônicas, tais como câncer, artrite e doenças inflamatórias intestinais, a perda de peso é observada (SAINI et al., 2006; GRANADO et al 2009; SHAMIR, 2009) e essa condição pode estar relacionada ao aumento da demanda energética envolvida na resposta inflamatória que prioriza substratos para gerar energia para as células participantes do processo inflamatório. Esse fenômeno envolve, de forma especial, a mobilização de lípidos armazenados no tecido adiposo (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005; ESTEVE et al., 2005). Isto explica o fato da perda de peso nos animais alérgicos, no nosso modelo, ser paralela a uma perda de tecido adiposo.

Estudos anteriores mostraram que disponibilizando água ou uma solução de clara de ovo adocicada como opções para beber, camundongos sensibilizados com OVA apresentavam aversão à ingestão da solução com clara de ovo, fato que não acontecia nos animais controles, não sensibilizados (CARA et al, 1994). Esse comportamento aversivo apresenta componentes imunológicos, uma vez que ele pode ser transferido para animais não sensibilizados por meio de células de baço de animais sensibilizados (CARA et al, 1997) e, adicionalmente, foi demonstrado que a aversão ao antígeno se relacionava a elevados níveis de IgE, pois ao administrar anticorpos anti-IgE, o fenômeno da aversão era abolido (BASSO et al, 2003). Como esperado, durante o desafio oral, os animais sensibilizados com BLG ingeriram menores quantidades de líquido quando comparados aos não sensibilizados (controles) durante a maior parte do experimento. No entanto, nos últimos dois dias de desafio oral por tempo prolongado (período entre o 12º e 14º dia), o consumo líquido de antígeno entre os animais sensibilizados e não sensibilizados se igualou enquanto que os níveis de IgE

específica para a BLG foram maiores no tempo de 14 dias quando comparados ao tempo de 7 dias de desafio oral. Dessa forma, em nosso modelo, possivelmente os níveis de IgE específicos não estão diretamente relacionados à aversão. Ou, alternativamente, ocorreu um fenômeno mais importante que a aversão relacionado à preferência dos animais pela solução contendo a proteína BLG. Essa última hipótese nos levou a conduzir um experimento de preferência alimentar em que os animais poderiam escolher entre beber uma solução contendo o antígeno ou consumir água durante o primeiro dia de desafio oral. Durante todas as 24 horas de mensuração, os animais sensibilizados preferiam beber o líquido contendo a proteína BLG à água. Com mencionamos anteriormente, esse fato é interessante uma vez que esses mesmos animais apresentaram níveis de IgE aumentados em relação aos não sensibilizados, mostrando que, para esse antígeno, a presença de IgE tampouco interfere na escolha de qual solução beber. A preferência ocorre precocemente, pois desde o início do experimento, os animais optaram por consumir quantidades maiores da solução contendo o antígeno, ainda que alérgicos.

Os eosinófilos são granulócitos derivados da medula óssea que, em condições saudáveis, estão espalhados na lâmina própria da mucosa gástrica e intestinal. Entretanto, em pacientes com alergia alimentar, a distribuição, o número, a morfologia e também o comportamento funcional dessas células estão alterados (MISHRA et al, 1999; SCHWAB et al, 2003). Em camundongos BALB/c, uma alteração da mucosa intestinal decorrente da alergia alimentar é o aumento do infiltrado de eosinófilos durante todo período de ingestão do antígeno (SALDANHA et al., 2004). Em doenças alérgicas crônicas, os eosinófilos são ativados pela IL-5 e atraídos por quimiocinas para o local da inflamação. Essas células são responsáveis pela fase tardia da reação alérgica, produzindo peroxidase eosinofílica, que é tóxica ao epitélio (CARA et al., 2000). Em nosso trabalho, observamos o aumento do infiltrado eosinofílico do jejuno proximal em ambos os tempos de desafio oral, durante 7 ou 14 dias. Essas células existem em abundância nos infiltrados inflamatórios da fase tardia de reações alérgicas e contribuem para muitos dos processos patológicos em doenças alérgicas (LUKACS, 2001). Em nosso modelo, provavelmente os eosinófilos foram atraídos aos sítios inflamatórios, uma vez que essa população está presente em grande quantidade nos animais alérgicos a BLG quando comparados aos animais controle não sensibilizados.

Uma vez que, pela análise histológica, houve uma mudança significativa no tecido devido a esse aumento observado de eosinófilos, procuramos por outros parâmetros que

pudessem corroborar a inflamação microscópica. Mensuramos uma relação entre o vilão do intestino e a cripta do mesmo, o número de linfócitos intraepiteliais presentes e a produção de muco. Geralmente, os vilões intestinais são especializados na digestão e absorção dos nutrientes e são formados por enterócitos absorptivos, células caliciformes (produtoras de muco), células de Paneth e células enteroendócrinas (NEUTRA et al 2001).

Alguns trabalhos já demonstraram que os vilões intestinais sofrem alteração dependendo do conteúdo antigênico a que são expostos. Em 2003, nosso grupo relatou um estudo em que camundongos C57BL/6 alimentados desde o desmame com dieta na qual as proteínas inteiras foram substituídas por aminoácidos (não imunogênicos) quando adultos apresentavam vilões mais alongados quando comparados a animais convencionais, fato semelhante ao que é retratado em animais isentos de microbiota e em neonatos (MENEZES, et al 2003).

Observamos alterações na relação entre o tamanho dos vilões e criptas intestinais dos camundongos. Verificamos que os animais não sensibilizados que receberam apenas água durante todo o experimento apresentavam vilões mais alongados quando comparados aos animais sensibilizados ou não e que recebiam o desafio oral, mostrando que as proteínas do soro do leite por si só já causaram alguma alteração na relação vilão/cripta em ambos tempos de desafio, por 7 ou 14 dias. Os animais alérgicos, por sua vez, exibiram encurtamento nos vilões quando comparados aos seus controles não sensibilizados, fato observado apenas com a exposição contínua do antígeno por via oral por um período prolongado (14 dias). Esses dados estão de acordo com o que retrata a literatura: a atrofia ou encurtamento nos vilões é uma reação não específica da mucosa intestinal às mais variadas injúrias inclusive às inflamatórias (FERGUNSON e MURRAY, 1971). Possivelmente, o consumo das proteínas do soro de leite foi capaz de causar modificações morfológicas nesses vilões e sua redução de tamanho. Nos animais alérgicos apresentavam uma redução mais acentuada quando comparados aos não sensibilizados que consumiram água ou o antígeno.

Outro parâmetro analisado foi o número de linfócitos intraepiteliais (IELs) em relação ao número de enterócitos. Os IELs residem entre a superfície basolateral das células epiteliais intestinais e representam uma população de células T importantes no intestino delgado (KUNISAWA e KYIONO, 2005). Sabe-se que os IELs estão sob influência da dieta e da microbiota (SMITH e NAGLER-ANDERSON, 2005). De fato, o número de linfócitos intraepiteliais pode ser aferido a cada 100 enterócitos de um vilão (FERGUNSON e

MURRAY, 1971). Nosso trabalho mostrou que, em ambos os tempos de desafio oral, por 7 ou 14 dias, o número de IEL foi maior em animais alérgicos. Provavelmente esse fato se dá pelo estímulo inflamatório local ao recrutamento de linfócitos para esse compartimento do intestino.

A produção de muco por células caliciformes foi outro parâmetro analisado em nosso trabalho. Todos os grupos, sensibilizados ou não, mantiveram sua produção de muco independentemente dos outros efeitos relatados no modelo de alergia. Esse fato é contrário ao que foi descrito por Saldanha e colaboradores (2004). Camundongos alérgicos à OVA possuíam níveis elevados de muco quando comparados a seus controles não alérgicos (SALDANHA et al, 2004).

Como já citado, a IgA secretória (sIgA) é uma subclasse não inflamatória de anticorpo presente em todas as secreções mucosas, representando um mecanismo de exclusão de microrganismos patogênicos sem que haja uma resposta inflamatória atuante (MACPHERSON et al, 2008). Nosso trabalho mostrou que a produção de sIgA estava elevada em animais alérgicos submetidos a 14 dias de desafio oral com o antígeno. Sendo a sIgA um anticorpo envolvido na exclusão imunes, seus níveis mais elevados nesse período de desafio em que há um tempo mais persistente de injúria tecidual indica que ela pode cumprir um papel protetor talvez reduzindo a entrada da proteína alergênica.

Em 2004, Frossard e colaboradores realizaram um estudo em que animais sensibilizados com BLG por meio de múltiplas gavagens apresentavam níveis de IL-4 nos linfonodos mesentéricos maiores quando comparados aos animais controle (FROSSARD et al, 2004). Um achado semelhante foi descrito em outro modelo de alergia alimentar à tropomiosina de camarão: os animais sensibilizados apresentavam aumento de IL-4 no jejuno (CAPOBIANCO et al, 2008). Dessa forma, níveis elevados dessa citocina já foram demonstrados em doenças alérgicas. Ao avaliarmos a produção dessa citocina tanto nos linfonodos mesentéricos quanto no jejuno proximal dos camundongos, em ambos os tempos experimentais, os níveis locais de IL-4 foram maior nos animais sensibilizados quando comparados aos seus controles não sensibilizados, demonstrando a importância dessa citocina em nosso modelo experimental de alergia alimentar. De fato, a IL-4 é bastante importante em fenômenos alérgicos, pois contribui para a produção de IgE, para o aumento da adesão dos eosinófilos às células endoteliais vasculares e promove sua infiltração nos sítios inflamatórios

por meio da regulação de marcadores de superfície de eosinófilos (VL4-A, por exemplo) e do endotélio (VCAM-1) (TEIXEIRA et al, 2005).

A IL-10 é uma inibidora da produção de citocinas pelas células Th1, através da sua ação em células dendríticas e macrófagos, o que resulta na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, da expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias (HAWRYLOWICZ e O´GARRA, 2005). Em nosso trabalho, medimos os níveis de IL-10 nos linfonodos mesentéricos e no jejuno proximal. Observamos redução de sua produção no jejuno tempo de 14 dias de desafio oral nos animais sensibilizados quando comparados aos animais controles não sensibilizados. Também foi interessante notar que o grupo que recebeu o protocolo de sensibilização e não foi sensibilizado, também manteve níveis baixos de IL-10 quando comparados aos animais que não passaram pelo processo da sensibilização. Assim, a sensibilização dos animais com o uso de adjuvante alterou a produção da IL-10. Sabe-se que essa citocina é importante na manutenção da homeostase da mucosa intestinal, pois camundongos geneticamente deficientes para IL-10 desenvolvem colite de forma espontânea (KUHN et al., 1993) Em nosso trabalho, ficou evidenciado que a exposição contínua ao antígeno interfere nos níveis de IL-10. Por outro lado, no jejuno proximal, a citocina TGF- $\beta$ , também conhecida como anti-inflamatória, estava elevada nos animais sensibilizados e desafiados oralmente no período de 7 dias. A sensibilização por si só não alterou os níveis de TGF- $\beta$ . A produção aumentada dessa citocina pode ocorrer como um mecanismo de compensação pela baixa produção de outra citocina, a IL-10, uma vez que TGF-  $\beta$  é uma citocina envolvida em múltiplas funções, que incluem inibição da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência de algumas populações assim como reparo de tecidos (MASSAGUE, 1990).

## 6 CONCLUSÃO

Relatamos, nesse trabalho, um novo modelo de alergia alimentar à proteína do leite  $\beta$ -lactoglobulina no qual os animais perderam peso, apresentaram elevados níveis de IgE e alterações histológicas compatíveis com inflamação alérgica na mucosa do intestino delgado. Nesse modelo, os animais sensibilizados apresentaram também aversão parcial à ingestão do antígeno, visto que, embora consumam menos antígeno quando comparado aos seus controles, o nível desse consumo ainda é elevado. Frente à possibilidade de escolher entre ingerir a solução contendo antígeno ou apenas água, animais sensibilizados previamente e os não sensibilizados optaram por consumir o antígeno, um fato que precisa ser melhor investigado uma vez que leva em consideração mecanismos comportamentais e imunológicos que estão intimamente relacionados.

O modelo apresentado pode ser útil para estudos futuros sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de alergia alimentar às proteínas do leite, e apresenta algumas vantagens com relação aos outros: ele reproduz todas as características anteriormente descritas como típicas da alergia alimentar, é de rápida execução, menos invasivo para os camundongos e requer pouca manipulação desses animais. Sendo assim, consideramos esse novo modelo uma ferramenta poderosa não somente para o estudo da alergia alimentar às proteínas de leite mas também pode ser usado como um modelo em que estratégias experimentais de tratamento da alergia alimentar às proteínas do leite possam ser utilizadas.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEL-PATIENT, K et al. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine b-lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin Exp Allergy*, v.35 p. 539–546, 2005.

ADEL-PATIENT, K. et al. Oral tolerance and Treg cells are induced in BALB/c mice after gavage with bovine b-lactoglobulin. *Allergy*, v 66, p.1312–1321, 2011.

ALDAMIZ-ECHEVARRIA, L. et al. Fatty acid deficiency profile in children with food allergy managed with elimination diets. *Acta Paediatr*, v. 97, p. 1572-1576, 2008.

ALDEMIR, H.; BARS, R.; HEROUET-GUICHENEY, C. Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. *Reg Toxicol Pharmacol*, v. 54, n. 3, suppl, p. S52–S57, 2009.

ANDRADE, M. C. et al. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol*, v. 146, p. 312–322, 2006.

BAHNA, S.L., Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol*,(6 Suppl 1): p. 56-60, 2002

BAILON, M. et al. A shorter and more specific oral sensitization-based experiment model of food allergy in mice. *J Immunol Meth*, v. 381, n. 1-2, p. 41–49, 2012.

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

BATISTA, N.V et al. Prolonged ingestion of ovalbumin diet by sensitized mice improves the metabolic consequences induced by experimental food allergy. *Clin Exp Immunol*, 178(3). p. 416-427, 2014.

BERGMANN, R. L. et al. Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clin Exp Allergy*, v. 27, p. 752–60, 1997.

BERIN, M.C et al. Role of TLR4 in allergic sensitization to food proteins in mice. *Allergy*, vol. 61, n. 1, p. 64–71, 2006.

BISCHOFF S; CROWE, S.E. Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology*, v.128, p.1089-1113, 2005.

BOCK, S. A.; MUOZ-FURLONG, A.; SAMPSON, H. A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol*, v. 107, n. 1, p. 191–193, 2001.

BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev*, v. 56, n. 1, Jan, p. S5-18, 1998.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effect or functions. *Scand J Immunol*, v. 70, n. 6, p. 505-15, Dec, 2009.

CAPOBIANCO, F. et al. Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE, T cell response and systemic anaphylactic reactions. *Int. Immunol*, v. 20, 1077–1086, 2008.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. *Braz J Med Biol Res*, v. 27, p. 1331-1341, 1994.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scand J Immunol*, v. 45, p. 16-20, 1997.

CARA, D.C; NEGRÃO-CORREA; TEIXEIRA, M.M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance *in vivo*. *Histol e Histopathol*, v.15, p. 899-920, 2000.

CEBRA, J. J; et al The secretory IgA system of the gut. *Ciba Found Symp*, n. 46, Apr, p. 5-28, 1977.

CHEHADE, M.; MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol*, v. 115, n. 1, p. 3-12, 2005.

CHEN, Y. et al. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. V. 376, p.177–180, 1995.

DELGADO, A. F.; CARDOSO, A. L.; ZAMBERLAN, P. *Nutrologia básica e avançada*, 1ª Ed, São Paulo, Manole, 2010.

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

DUNKIN, D.; BERIN, M. C.; MAYER, L. Allergic sensitization can be induced via multiple physiologic routes in an adjuvante dependente manner. *J All Clin Immunol*, v. 128, n. 6, p. 1251.e2–1258.e2, 2011.

EIGENMANN, P. A. Mechanisms of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, v. 20, p. 5- 11, 2009.

ERICKSON, R. H.; KIM , Y. S. Digestion and absorption of dietary protein. *Annu Rev Med*, v. 41, p. 133-139, 1990.

ESTEVE, E.; RICART, W.; FERNANDEZ-REAL, J.M. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr*, v. 24, p. 16–31, 2005.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. *Immunol Rev*, v. 206, p. 232-59, Aug, 2005.



FERGUNSON, A e MURRAY, D. Quantification of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*, v. 12 p. 988-994, 1971

FISCHER, R. et al. Oral and nasal sensitization promote distinct immune responses and lung reactivity in a mouse model of peanut allergy. *The American Journal of Pathology*, v. 167, n. 6, p. 1621–1630, 2005.

FOSTER, P. S. et al. CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma. *Lab Invest*, vol. 82, n.4, p.455-62, April, 2002.

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

GARSDIE, P.; MILLINGTON, O.; SMITH, K. M. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1029, p. 9-15, 2004.

GONIPETA, B. et al. Longterm characteristics of hazelnut allergy in an adjuvant-free mouse model. *Int Arch All Immunol*, v. 152, n. 3, p. 219–225, 2010.

GRANADO, M. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition reverts the decrease in adiponectin levels and attenuates the loss of white adipose tissue during chronic inflammation. *Eur.J Pharmacol*, v. 608, p. 97–103, 2009.

HANSEN, L. G. et al. Prediction of allergy from family history and cord blood IgE levels. A follow-up at the age of 5 years. Cord blood IgE IV. *Allergy Immunol*, v. 4, p. 34–40, 1993.

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

HELM, R. M. et al. A neonatal swine model for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*, v. 109, n. 1, p. 136-42, Jan , 2002.

HOLMGREN, J. et al. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*,v.81, p. 81-95, 2003.

HUNTINGTON, J.A e STEIN, P.E. Structure and properties of ovalbumin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, v. 25, p.189-98, May, 2001.

HUSBY S; Fogel N, HOST A; SVEHAG S.E. Passage of dietary antigens into the blood of children with celiac disease: Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Gut*, v. 28, p.1062-72, 1987.

JOHANSSON, M. E. et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 39, p. 15064-15069, 2008.

KAGAN RS. et al. Prevalence of peanut allergy in primaryschool children in Montreal, Canada. *J Allergy Clin Immunol*, 112:1223–8, 2003.

- KJELLMAN, N. Atopic disease in seven-year-old children. *Acta Paediatr Scand*, v. 66, p. 565–7, 1977.
- KUHN, R; et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, v. 75, n. 2, , p. 263-74, Oct ,1993.
- KUNISAWA, J.; KIYONO, H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell Mol Life Sci*, v. 62, n. 12, p. 1308-1321, 2005.
- LEUNG, D. Y. Molecular basis of allergic diseases. *Mol Genet Metab*, v. 63, n. 3, p. 157-167, 1998.
- LEV, R.; SPICER, S. S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem*, v. 12, n. 309, 1964
- LI, X. M. et al. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity,"*J All Clin Immunol*, v. 103, n. 2, p. 206–214, 1999.
- LI, X. M. al., A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J All Clin Immunol*, v. 106, n. 1, p. 150–158, 2000.
- LUKACS, N. W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol*, v.1, n.2, p.108-16, Nov, 2001.
- MACPHERSON, A. J. et al. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*, v. 1, p. 11–22, 2008.
- MARINARO, M. et al. Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J. Immunol.* 155, p. 4621–4629, 1995.
- MASSAGUE J. The transforming growth factor-b family. *Annu Rev Cell Biol*, v.6, p. 597-641,1990.
- MCCLAIN S.; BANNON, G. A. Animal models of food allergy: opportunities and barriers. *Curr All Asthma Rep*, v. 6, n. 2, p. 141–144, 2006.
- MEEUSEN, E.N et al. Sheep as amodel species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases. *Drug Discov Today: Dis Mod*, v. 6, n. 4, p. 101–106, 2009.
- MENEZES, J. S.; MUCIDA, D. S.; CARA, D. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; RUSSO, M.; VAZ, N. M.; FARIA, A. M. C Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol*, v. 15, n. 3, p. 447-55, Mar, 2003.
- MESTECKY, J. et al. Induction of tolerance in humans: effectiveness of oral and nasal immunization routes. *Ann N Y Acad Sci*, v. 778, p. 194–201, 1996.

MISHRA, A. et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J Clin Invest*, v.103, n.12, p.1719-27 Jun, 1999.

MONACI, L., et al., Milk allergens, their characteristics and their detection in food: a review. *European Food Research and Technology*, p.149-179. 2005

MORAFO, V. et al. Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J All Clin Immunol*, v. 111, n. 5, p. 1122–1128, 2003.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, n. 4, p. 331-341, 2003.

MOWAT, A. M. Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1029, p. 1-8, 2004.

NEUTRA, M. R., N. J. MANTIS, et al. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol*, 2(11): 1004-1009, 2001.

NGAN, J.; KIND, L. S. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J Immunol*, v. 120, n. 3, Mar, p. 861-5, 1978.

NOIMARK, L.; COX, H. E. Nutritional problems related to food allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*, v. 19, p. 188-195, 2008.

PARVATANENI, S et al. Development of an adjuvant-free cashew nut allergy mouse model. *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 149, n. 4, p. 299–304, 2009.

PRAKASH, S.; et al. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, v.5, p. 71-86, 2011.

ROTHENBERG, M. E.; S. P. Hogan. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, v.24, p.147-74. 2006.

ROUND, J. L.; O'CONNELL, R. M.; ANDMAZ-MANIAN, S. K. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *J Autoimmun*, v. 34, p. J220–J225, 2010.

RUITER, B., et al., Role of Human Leucocyte Antigen DQ in the Presentation of T Cell Epitopes in the Major Cow's Milk Allergen  $\alpha$ 1-Casein. *Int Arch Allergy Immunol*, 143(2): p. 119-126, 2007

SAARINEN KM, et al. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol*, 116:869–875, 2005

SAINI, A.; AL-SHANTI, N., STEWART, C.E. Waste management – cytokines, growth factors and cachexia. *Cytok Growth Fact. Ver*, v. 17, p. 475–486, 2006.

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

SAMPSON HA. et al. Symposium of the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol*, 115: 584-591, 2005.

SAURER, L.; MUELLER, C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy*, v. 64, n. 4, Apr, p. 505-19, 2009.

SCHMUCKER, D.L. et al. Basis for age-related decline in intestinal immunity. *Clin. Dev. Immunol*, 10(2-4), p. 167- 172, 2003.

SCHWAB, D. et al. Functional and morphologic characterization of eosinophils in the lower intestinal mucosa of patients with food allergy. *Am J Gastroenterol*, v.98, n.7, Jul, p.1525-34. 2003.

SEIBOLD, F. Food-induced immune responses as origin of bowel disease? *Digestion*, v. 71, p. 251-260, 2005.

SERRA,S; JANI, P.A An approach to duodenal biopsies. *J Clin Pathol*, 59:1133–1150, 2009.

SHAMIR, R. Nutritional aspects in inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v. 48, Suppl. 2, p. S86–88, 2009.

SICHERER, S.H. Food allergy. *Lancet* 360, 701-710, 2002.

SICHERER SH; MUNOZ-FURLONG A; SAMPSON HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol*, 112:1203–7, 2003.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food Allergy: Recent Advances in Pathophysiology and Treatment. *Annu Rev Med*, 2008.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy. *The Journal of allergy and clinical Immunology*, v. 125, p. S116-125, 2010.

SILVA, A.S. et al. Regulation of anaphylactic IgG1 antibody production by IL-4 and IL-10. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 141, 70–78, 2006.

SMITH, D. W; NAGLER-ANDERSON, C. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol*, v. 174, n. 7, p. 3851-3857, 2005.

SPOLIDORO, J. V. et al. Cow's milk protein allergy in children: a survey on features in Brazil. *Journal Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 29, n. 1, p. s27, 2005.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, v. 299, p. 1259–60, 1989.

TEIXEIRA, G et al . Induction of an antigen specific gut inflammatory reaction in mice and rats: a model for human Inflammatory Bowel Disease. *Braz. arch. biol. technol.*, v. 52, n. 3, Curitiba, June, 2009.

TEIXEIRA, G. Seleção de dietas por camundongos normais, imunes e tolerantes a amendoim e castanha de caju. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia). Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB, UFMG, Belo Horizonte, 1995. 115p.

TEIXEIRA, L. K. et al. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.100 Suppl 1, Mar, p.137-44. 2005.

THANG, C. L. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation on cow's milk allergy in a mouse model." *All, Asthma Clin Immunol*, v. 7, n. 20, 2011.

THIJS, C. et al. Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy*, v. 66, p. 58-67, 2010.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, v. 9, n. 11, p. 799-809, 2009.

VAN WIJK, F., KNIPPELS, L. Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother.* 61, 8–20, 2007.

VAZ, N. M.; et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult in bred mice by previous feeding of the specific antigen. *J Allergy Clin Immunol*, v. 60, n. 2, Aug, p. 110-5, 1977.

VERDOLIN BA. et al. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz J Med Biol Res.* 34(2): 211-9, Feb, 2001.

WAHN, U.; VON MUTIUS, E. Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. *J Allergy Clin Immunol*, v. 107, p. 567–74, 2001.

WAKABAYASHI, A. et al. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunology*, v. 119, n. 2, p. 167-177, 2006.

WAL, J.M. Cow's milk proteins/allergens. *Ann.allergy asthma immunol*, dez, 89, 2002.

---

WALZEM, R.L; DILLARD, C.J; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Ver. Food. Sci. Nutr*, v. 42, p. 353-375, 2002.

WEINER, H. L. Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, n. 23, Nov 8, p. 10762-5, 1994.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes, *J Clin Invest*, v. 115, p. 1111–1119, 2005.

WIT, JN. Nutricional and functional characteristics of whey protein in food products. *J. Dairy Sci.*, vol. 81, p. 597-608, 1988.

WOOD, R. A. et al. The nature history of milk allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol*, v. 131, p. 805-812, 2013.

YOUNG, V. R.; PELLETT, P. L. Protein intake and requirements with reference to diet and health. *Am J Clin Nutr*, v. 4, n. 5 Suppl, p. 1323-1343, 1987.

ZEIGER, R. S. Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics*, v. 111, p. 1662–1671, 2003.