

LETÍCIA FIGUEIREDO MOREIRA

**ESTUDO DOS COMPONENTES NUTRICIONAIS E
IMUNOLÓGICOS NA PERDA DE PESO EM
CAMUNDONGOS COM ALERGIA ALIMENTAR.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do grau de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Geral

**Belo Horizonte
2006**

LETÍCIA FIGUEIREDO MOREIRA

**ESTUDO DOS COMPONENTES NUTRICIONAIS E
IMUNOLÓGICOS NA PERDA DE PESO EM
CAMUNDONGOS COM ALERGIA ALIMENTAR.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do grau de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientadora: Profa Dra. Denise Carmona Cara
Co-Orientadora: Profa Dra. Jacqueline Alvarez-Leite

**Belo Horizonte
2006**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, do departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e tem apoio financeiro do CNPq e FAPEMIG – UFMG e do Centro de Pós Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG.

“O saber não basta, temos de o aplicar. A vontade não basta, temos de atuar.”

Goethe

A Deus, pela iluminação.
A Larissa pelo amor e compreensão.

A minha mãe e minha avó, por estarem com a
Larissa nos momentos de ausência.

Agradecimentos

A Deus pela iluminação, orientação e benção.

Aos meus pais, avós, Larissa e meu irmão, Leo, pelo amor e confiança.

A Denise pela oportunidade de aprendizado, crescimento e elogios.

A Diele pela abertura de portas da minha vida profissional.

A Júnia Amorim por me ensinar a amar a Patologia Geral.

A Jacqueline pelas sugestões e colaborações.

A amiga Maria Letícia pela importante colaboração durante a realização deste trabalho, em especial nos momentos de sacrificar os animais.

A amiga Camila por estar sempre apoiando e dando bons conselhos.

A Janaína e Luana por tudo que me ensinaram e ajudaram.

Ao Wanderson por me ensinar lidar com a “tecnologia científica”.

Ao professor Marcelo, da UFOP, por abrir seu laboratório para realização de parte da pesquisa e ao professor Anilton pelo empréstimo do freezer.

A todos do laboratório de Neuro-Imuno-Patologia experimental, em especial ao professor Wagner, ao Weverton, Felipe, Mirna, Marta, Paloma, Marina, Sílvia, Claudinha, Eliane, Daniela, Ferdinan, Ricardo, Mariana e Maria.

A Frank e a todas as alunas da Jacqueline, em especial à Ana Cristina e Juliana que me ensinaram técnicas e fabricação da ração.

Aos meus alunos Ríudo Paiva e Cibele pela “mãozinha”.

A Vânia, Jaqueline, Olinda e Soraia pela ajuda técnica.

Aos colegas Laís, Helen, Cássia, Ana Paula e Cris Cartelle por estarem comigo nesta jornada.

Aos bons amigos Cláudia Regina, Gustavo Carvalhaes, Silvana, e Adriana.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo.....	12
Abstract.....	14
1- Introdução e revisão de literatura.....	15
1.1- Sistema imune e alimentos.....	16
1.2- Metabolismo – Nutrição e emagrecimento.....	22
1.3- Alergia e emagrecimento.....	27
2- Objetivos.....	29
2.1- Objetivo Geral.....	29
2.2- Objetivos Específicos.....	29
3- Materiais e Métodos.....	30
3.1- Animais.....	30
3.2- Vermifugação.....	30
3.3- Indução da Alergia alimentar.....	30
3.3.1- Antígeno.....	30
3.3.2- Sensibilização ao antígeno.....	31
3.3.3- Desafio oral.....	31
3.4- Dieta e avaliação do consumo.....	32
3.5- Desenho experimental.....	36
3.6- Avaliação do peso corporal.....	38
3.7- Obtenção do soro.....	39
3.8- Avaliação do nível de desidratação e gorduras corporais.....	39
3.9- Dosagem dos anticorpos IgE específico Anti-ovalbumina.....	39
3.10- Avaliação da citocina relacionada com o emagrecimento: TNF- α ...40	

3.11- Avaliação da integridade da mucosa.....	40
3.12- Quantificação dos níveis de lípidos hepáticos.....	42
3.13- Avaliação morfológica da alergia.....	42
3.14- Avaliação da Mieloperoxidase (MPO) no intestino.	43
3.15- Análise estatística.....	44
4- Resultados.....	45
4.1- Peso corpóreo e consumo.....	45
4.2- Avaliação do nível de desidratação e gorduras corporais e peso dos órgãos.	48
4.3- Contagem de células do sangue.	50
4.4- Morfologia e Avaliação da Mieloperoxidase (MPO) no intestino.....	50
4.5- Avaliação da integridade da mucosa.....	52
4.6- Quantificação dos níveis de lípidos hepáticos	52
4.7- Dosagem dos anticorpos IgE específico Anti-ovalbumina.....	53
4.8- Quantificação de glicose, albumina e proteínas no soro.....	54
4.9- Avaliação da citocina relacionada com o emagrecimento: TNF- α	54
5- Gráficos e Figuras referentes aos resultados.....	55
6- Discussão.....	80
7- Conclusão.....	90
Referências Bibliográficas.....	91

Lista de Abreviaturas

- 1- ACTH- Corticotropina
- 2- AIN93G – American Institute of Nutrition
- 3- BHT – Hidroxitolueno de butilado (conservante)
- 4- FAO/WHO- Food Agriculture Organization/World Health Organization
- 5- FDA- Food and Drug Administration
- 6- IgA – Imunoglobulina A
- 7- IgE – Imunoglobulina E
- 8- IgM- Imunoglobulina M
- 9- IL-1 β - Interleucina 1 Beta
- 10-IL-3- Interleucina 3
- 11-IL-4 – Interleucina 4
- 12-IL-5- Interleucina 5
- 13-IL-6- Interleucina 6
- 14-IL-9- Interleucina 9
- 15-IL-12- Interleucina 12
- 16-IL-13- Interleucina 13
- 17-kcal- quilocaloria
- 18-LTCD4⁺ - Linfócito TCD4 positivo
- 19-MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
- 20-MPO- Mieloperoxidase
- 21- ω 3 (omega-3)
- 22- ω 6 (omega-6)
- 23-PAS – *Periodic Acid Schiff* (corante)
- 24-PDCAAS- Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score
- 25-® - Marca Registrada
- 26-SCF- *stem cell factor*
- 27-SCO – solução de clara de ovo
- 28-Th1- Linfócito T Helper 1
- 29-Th2- Linfócito T Helper 2

30-TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

31-IFN- γ - Interferon Gama

32-VCAM-1- moléculas de adesão celular expressa nos vasos

RESUMO

As alergias são doenças crônicas caracterizadas por um aumento na capacidade de linfócitos B de sintetizarem imunoglobulina do isotipo IgE contra antígenos que entram no organismo pela da inalação, ingestão ou penetração pela pele conduzindo a uma hiperatividade imunológica, inflamação alérgica e, como visto em nosso modelo, perda de 20% do peso corpóreo em animais BALB/c sensibilizados. O antígeno alimentar utilizado foi ovalbumina, administrado uma semana após sensibilização, via solução feita com água e com clara de ovo “in natura” ou clara de ovo liofilizada (ambas com ovalbumina na concentração de 10%) e na ração (ovalbumina na concentração de 14%). Quando os animais recebiam solução de clara como única opção líquida, a dieta se tornava desbalanceada. A presença de proteína na solução gerava um teor protéico além das necessidades fisiológicas dos animais. Tornou-se necessário fazer uma ração balanceada, baseada na AIN93G, em que ovalbumina era a fonte protéica para analisarmos se o emagrecimento era de origem nutricional. Constatou-se que a ração balanceada causou o emagrecimento ainda mais acentuado nos animais BALB/c sensibilizados. Isto fortalece a teoria de que o emagrecimento, neste modelo, está relacionado com a alergia. Quando testamos o modelo em animais C57BL/6 não se verifica alta produção de IgE e emagrecimento. Podemos dizer que o emagrecimento está acompanhado do aumento de IgE. Quando desidratamos as carcaças dos animais em estudo (BALB/c e C57/BL6) vimos que os animais C57BL/6 sensibilizados retinham líquido enquanto que os não sensibilizados não. Diante deste dado, concluímos que os animais C57BL/6 não estão emagrecendo pois seu peso está mascarado pela retenção de líquidos. Os animais não sensibilizados têm mais gordura abdominal do que os animais sensibilizados de ambas as linhagens. Essa perda da gordura é devida ao aumento da taxa de metabolismo. Este acontecimento é devido à: via endócrino-metabólica, pela atuação dos hormônios e dos substratos; via imunológica, com o envolvimento de células e mediadores

(citocinas). Logo, conseguimos provar que a perda de peso está relacionada com mecanismos imunológicos e não nutricionais.

ABSTRACT

Allergic diseases have reached epidemic proportions and are characterized by IgE production against antigens that gain the organisms through the mucosas. Here, we used a allergy model which BALB/c mice receive ovalbumin orally after sensitization with ovalbumin. After the oral challenge with egg white solution, the ovalbumin sensitized BALB/c mice usually show intestinal modifications, with mucous production, edema, increased of the number of mast cells and eosinophils. Systemic signals are associated with antiovalbumin IgE productions and loss of body weight. In order to see whether or not the lost of the weight had nutrituional or immunological mechanisms, we used balanced diets containing ovalbumin. The liophilization of the ovalbumin did not reduce its allergenicity, once ovalbumin sensitized BALB/c mice lost their weight after ingestion of natural egg white, liophilized egg white in water or liophilized ovalbumin inside the diet. The ingestion of ovalbumin diet after ovalbumin sensitization also caused intestinal mucous production and IgE production in both BALB/c and C57BL6 mice. , reduction of abdominal fat and increased of hepatic cholesterol n BALB/c mice. In BALB/c, the reduced body weight was associated with reduction of muscle mass and abdominal fat. There was general edema in ovalbumin sensitized C57BL6, and reduction of abdominal fat after ovalbumin diet consumption. Increased hepatic cholesterol concentration was find in both animals after ovalbumin ingestion. These results were not connected to TNF-alpha production. Although much is still unknown about the etiology of cachexia in this allergy model, we suggest that this model reproduce clinical allergic situation in which multiple cytokines, neuropeptides, classic stress hormones, and intermediary substrate metabolism are involved.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1- Introdução e revisão de literatura

Quando as reações adversas a alimentos são causados por mecanismos imunológicos são ditas alergias alimentares enquanto que quando causadas por reações tóxicas, farmacológicas, metabólicas ou idiossincráticas a substâncias químicas são ditas intolerâncias alimentares (PARKER et al., 1993).

O termo hipersensibilidade alimentar também pode ser usado para se referir a essas reações adversas mediadas imunologicamente (SAMPSON & METCALFE, 1992).

As alergias são desordens que acometem cerca de 20% a 30% da população humana em países desenvolvidos, estando entre as doenças crônicas mais comuns (MATYSIAK-BUDNICK & HEYMAN, 2002).

Os principais alimentos que têm sido citados como causadores de alergias alimentares são: leite, ovos, amendoim, castanhas, camarão, peixe e soja (BOCK, 1986; METCALFE, 1998).

Para que a reação alérgica a um alimento ocorra, proteínas ou outros antígenos devem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal, interagir com o sistema imunológico e produzir uma resposta.

A alergia é caracterizada por um aumento na capacidade de linfócitos B de sintetizarem imunoglobulinas do isotipo IgE contra antígenos que entram no organismo através da inalação, ingestão ou penetração pela pele (PICCINNI *et al.*, 2000), conduzindo a uma hiper atividade imunológica e a uma inflamação alérgica (BUFE, 1998). Esses antígenos são considerados inócuos, mas

capazes de induzir quadros patológicos em indivíduos sensibilizados. A alergia alimentar está incluída entre as alergias mais comuns em crianças.

1.1- Sistema Imune e alimentos

Em condições normais, a reação alérgica a alimentos é evitada pois o trato gastrointestinal e o sistema imunológico fornecem uma barreira que impede a absorção da maioria dos antígenos.

O intestino é a principal via de entrada de antígenos no corpo e os linfócitos ali presentes na mucosa, submucosa, placas de Peyer ou linfonodos mesentéricos são responsáveis pela montagem da resposta imune adequada contra esses antígenos (SPRINGER, 1994).

O lúmen gastrintestinal contém uma variedade de substâncias nocivas, incluindo antígenos e agentes químicos ingeridos com o alimento, bem como microrganismos e seus produtos tóxicos. No entanto, em condições fisiológicas, o sistema gastrintestinal apresenta muitas barreiras para evitar constantes reações a esses patógenos. Entre elas podemos citar o muco que cobre continuamente e de forma aderente a mucosa digestiva; as enzimas gástricas (pepsinas), pancreáticas (tripsina, quimitripsina carboxipeptidases) e intestinais (aminopeptidases e dipeptidases) (LAMONT, 1992) e a produção de IgA que se liga a moléculas antigênicas e dificultam sua penetração no organismo (MESTECKY, *et al.*, 1986). A mucosa do trato gastrintestinal contém um grande número de células imunocompetentes, incluindo mastócitos e granulócitos. Tem-se tornado claro que essas células representam importantes papéis na fisiologia (imunorregulação, remodelamento do tecido e defesa do hospedeiro) (GALLI & WERSHIL, 1996; LORENTZ & BISCHOFF, 2001) e na patofisiologia (YU & PERDUE, 2001).

A administração oral de antígenos pode levar a três principais consequências: resposta imune local com produção de IgA secretória (imunização local), uma resposta inflamatória sistêmica com produção de anticorpos séricos específicos (imunização oral) ou, mais frequentemente, uma supressão da reatividade imunológica sistêmica denominada tolerância oral (FARIA & WEINER, 1999).

A tolerância oral foi definida como um estado imunológico no qual o animal se torna refratário à imunização induzida com um antígeno que foi previamente administrado por via oral, apresentando repercussões sobre diversos tipos de manifestação da reatividade imunológica. Ela reduz o título de anticorpos de diversos isotipos no soro (HANSON, et al., 1977; VAZ, et al., 1987; MELAMED et al., 1996), reduz ou abole reações de hipersensibilidade do tipo retardada (DHT) (MILLER & HANSON, 1979; TITUS & CHILLER, 1981), o aparecimento de células secretoras de anticorpos (RICHMAN, et al., 1978; TITUS & CHILLER, 1981), o ritmo de clareamento de antígenos na circulação (HANSON, et al., 1979), a proliferação de linfócitos T em cultura (RICHMAN, et al., 1978, TITUS & CHILLER, 1981) e a secreção de citocinas (FISHMAN-LOBELL, et al., 1994, MELAMED, et al., 1996).

O resultado da administração de antígenos por via oral é dependente de vários fatores, ligados ao antígeno ou ao animal, que serão descritos a seguir:

a) Fatores relacionados ao antígeno:

- Natureza: Um grande número de antígenos diferentes já foi utilizado para a indução da tolerância oral. Podem ser antígenos inertes e/ou solúveis, timo-dependentes, como por exemplo, as proteínas ou podem ser materiais particulados, patógenos invasivos e agentes inflamatórios, como toxinas, que muitas vezes induzem a imunização local e sistêmica (FARIA & WEINER, 1999).

- Dose: Por Saklayen et. al. (1984) baixas doses são suficientes para inibir o desenvolvimento de hipersensibilidade do tipo tardia e doses mais altas são necessárias para inibir a produção de anticorpos (com exceção de IgE).

- Regime de administração: a administração de antígeno de forma contínua é mais efetiva do que uma única administração para a indução da tolerância oral (SAKLAYEN, et al., 1984).

b) Fatores relacionados ao animal:

- Idade: há alguns trabalhos que demonstram que a administração de antígenos a animais neonatos não leva à indução de tolerância oral (HANSON, 1981; STROBEL & FERGUSON, 1984; MILLER, et al., 1994). Um trabalho recente demonstrou que animais neonatos são susceptíveis à indução da tolerância oral desde que as formas de administração e de desafio sejam adequadamente utilizadas (TOBAGUS, et al., 2004). A diferença de neonatos com animais adultos está em possuir características de absorção de antígenos e a falta de um sistema imune completamente maduro (FARIA & WEINER, 1999). A senescência também afeta a indução da tolerância oral. Uma diminuição na susceptibilidade de indução de supressão da produção de anticorpos pela tolerância oral é observada em camundongos a partir de 25 semanas de idade (FARIA, et al., 1998). Esta dificuldade deve-se a alterações que ocorrem no sistema imune com a senescência, levando a uma rigidez das interações celulares, cuja plasticidade é necessária para o funcionamento do sistema imune e conseqüentemente para a indução da tolerância oral (FARIA, et al., 1993). No entanto, a administração do antígeno de forma contínua por ingestão voluntária é capaz de superar esta dificuldade e induzir a tolerância oral em animais senescentes (FARIA, et al., 1998).

- *Background* genético: a maioria das linhagens de camundongos é susceptível à indução da tolerância oral. Isto pode estar associado ao haplótipo do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MOWAT, et al., 1987) e a outros genes (VAZ, et al., 1987).

- Status Imunológico: a tolerância oral é facilmente induzida de forma imunogênica em animais que ainda não entraram em contato com o antígeno. Em animais imunes, a administração oral do antígeno pode resultar em respostas imunes secundárias (CONDE, et al., 1998). No entanto, iniciando o tratamento oral em um curto período de tempo após a imunização e utilizando-se doses maiores ou freqüência de administração maior, é possível induzir a tolerância oral (CHUNG, et al., 1999).

Mesmo frente às várias barreiras existentes, os antígenos da dieta podem entrar na mucosa intestinal através das células M situadas nas placas de Peyer. Macrófagos residentes nesta placa fagocitam, processam e apresentam peptídeos unidos à molécula de histocompatibilidade principal (MHC) II para linfócitos T. Estes, ativam linfócitos B comprometidos com a síntese de IgA. As células T e B migram, então, das placas de Peyer para os linfonodos mesentéricos; destes, trafegam para o ducto torácico chegando na circulação sangüínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa digestiva e passam a residir na *lâmina própria* onde irão secretar mais IgA (HELM & BURKS, 2000).

Em algumas situações, a interação do antígeno com as células imunológicas irá conduzir a uma resposta do tipo T *helper* (Th) 2 com produção de IgE. O mecanismo responsável pelo desenvolvimento preferencial da resposta tipo Th2 reativas ao alérgeno em sujeitos atópicos não tem sido ainda completamente esclarecido. Atenção tem sido dada aos possíveis papéis das células apresentadoras de antígenos, ao repertório de células T e citocinas presentes no micro-ambiente durante a apresentação do antígeno (PICCINNI *et al.*, 2000).

Nessas condições, as células B sintetizam IgM específica ao antígeno na primeira exposição ao alérgeno. O peptídeo é então apresentado à célula T CD4⁺ específica ao antígeno via a MHC de classe II. A mudança de IgM para IgE requer interações entre antígeno, células B específicas e células T. As

células T ativadas secretam interleucina (IL)-4 e expressam o ligante CD 40, que age sobre as células B, tornando-as plasmócitos secretores de IgE e produzindo células B de memória. Quando ocorrer uma nova exposição ao antígeno, IgE específica será secretada pelos plasmócitos e se ligarão aos mastócitos. A reação imediata inicia-se pelo *crosslinking* de IgE como antígeno, seguido pela ativação e desgranulação dos mastócitos. Mediadores pré-formados como histamina, enzimas e fatores quimiotáticos são liberados, e outros mediadores (prostaglandinas e leucotrienos) são formados. Estes mediadores são responsáveis pelos sintomas das reações alérgicas. Histamina, prostaglandina e leucotrienos promovem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura lisa. Fatores quimiotáticos atraem eosinófilos que liberam outros mediadores prolongando a resposta alérgica (ANDERSON, 1997; FULEIHAN, 1998; SMARTIN *et al.*, 2001).

As primeiras modificações referem-se a eventos vasculares, com início após 15 a 30 minutos. Tais eventos incluem a vasodilatação gerada pela histamina, prostaglandina D₂ e pelo PAF, e o aumento da permeabilidade vascular, desencadeada pela ação da histamina, leucotrieno C₄ e PAF em receptores das células endoteliais. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular geram o eritema na pele e o edema no subcutâneo, trato respiratório ou digestivo. Tanto no trato respiratório como no digestivo, mediadores como a histamina e PGD₂ podem estimular a produção de muco. No trato respiratório, o PAF, a histamina e a PGD₂ induzem a broncoconstrição e, no trato gastrointestinal, a histamina, as prostaglandinas e o PAF geram um desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando a um estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (WASSERMAN, 1983; PLAUT, 1997).

A IL-5 e a eotaxina seletivamente induzem a infiltração de eosinófilos na mucosa intestinal durante a reação alérgica (BAE *et al.*, 1999). A IL-5, derivada de uma resposta Th₂, estimula a maturação de eosinófilos e a mobilização dessas

células da medula óssea para o sangue. Os eosinófilos são recrutados para o tecido principalmente em resposta à produção local de eotaxina (FOSTER et al., 2002). No local da lesão, os eosinófilos liberam uma abundância de mediadores altamente citotóxicos e pró-citotóxicos, como a proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica e peroxidase, contribuindo para a fase tardia da reação que ocorre três a doze horas depois da degranulação dos mastócitos (TEPPER et al., 1989; BISCHOF & MEEUSEN, 2002).

Sendo assim, podem-se listar sintomas freqüentemente provocados em vários órgãos alvos durante as reações alérgicas induzidas por alimento. A pele pode apresentar urticária, rubor, erupção prurítica eritematosa, dermatite atópica. O trato gastrointestinal apresenta inchaço dos lábios, língua ou mucosa oral, náusea, paralisia abdominal ou cólica, vômito ou refluxo, e diarreia. No trato respiratório ocorre a congestão nasal, edema laringeal, disфонia e espirros. Dependendo da gravidade do quadro anafilático pode ocorrer hipotensão, choque, desmaios e vertigens. (SAMPSON, 1999).

A etiologia das alergias mediadas por IgE é complexa e pouco entendida. Uma característica comum é a super produção de citocinas como IL-4, do repertório Th2, que induzem essa produção de IgE. A diferenciação de células T virgens para o fenótipo Th2 parece ser dependente de certas citocinas presentes nos estágios iniciais da resposta imune (HAAS *et al.*, 1999). Vários estudos têm mostrado que as células T do sangue periférico respondem ao alérgeno *in vitro* produzindo citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, e não do tipo Th1, como interferon-gama (IFN- γ) e IL-12 (KAY, 2000).

As citocinas do tipo Th2 influenciam uma variedade de eventos associados com a inflamação alérgica crônica. Em adição à estimulação da produção de IgE (IL-4, IL-13), esses efeitos incluem maturação de eosinófilos (IL-5, IL-9), aumento na expressão das moléculas de adesão celular expressas nos vasos (VCAM-1), seletivas para eosinófilos/basófilos (IL-4, IL-13), desenvolvimento de mastócitos

(IL-3, IL-9, *stem cell factor* - SCF), hipersensibilidade respiratória (IL-9, IL-13) e produção excessiva de muco (IL-4, IL-9, IL-13) (KAY, 2000).

Há vários modelos experimentais que podem mimetizar doenças, como a alergia, e contribuir para o entendimento dos mecanismos que as envolvem. Esses modelos podem, também, servir para testes de possíveis terapias farmacológicas. Recentemente, Saldanha *et al.* (2004), desenvolveram um modelo de alergia crônica no qual a resposta imune do tipo Th2 é induzida para um antígeno alimentar. Nesse trabalho, camundongos recebem a injeção do antígeno (ovalbumina) associado a um adjuvante, hidróxido de alumínio, que estimula a resposta do tipo Th2. Após a sensibilização, os animais têm como única opção líquida uma solução contendo o mesmo antígeno. Esse desafio oral leva a vários sinais clássicos do processo alérgico, como: produção de IgE, aumento da permeabilidade vascular, infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, hiperplasia de mastócitos e aumento da produção de muco. Um dos sinais sistêmicos mais marcantes e ainda sem explicação foi o emagrecimento acentuado dos animais uma semana após o início da ingestão do antígeno. O mecanismo associado a esse emagrecimento ainda não está elucidado e foi alvo de indagação dos revisores do artigo.

1.2- Metabolismo – Nutrição e emagrecimento

O estado nutricional, que pode ter como reflexo o peso corpóreo, expressa o grau no qual as necessidades fisiológicas por nutrientes estão sendo alcançadas. Deve haver um equilíbrio entre ingestão de nutrientes e necessidades de nutrientes para que o peso corpóreo também se mantenha.

Uma dieta adequada e balanceada é aquela que atinge todas as necessidades nutricionais para a manutenção, reparo, processos de vida e crescimento ou desenvolvimento. Inclui todos os nutrientes em quantidades apropriadas e proporcionais uns aos outros. A presença ou ausência de um nutriente essencial

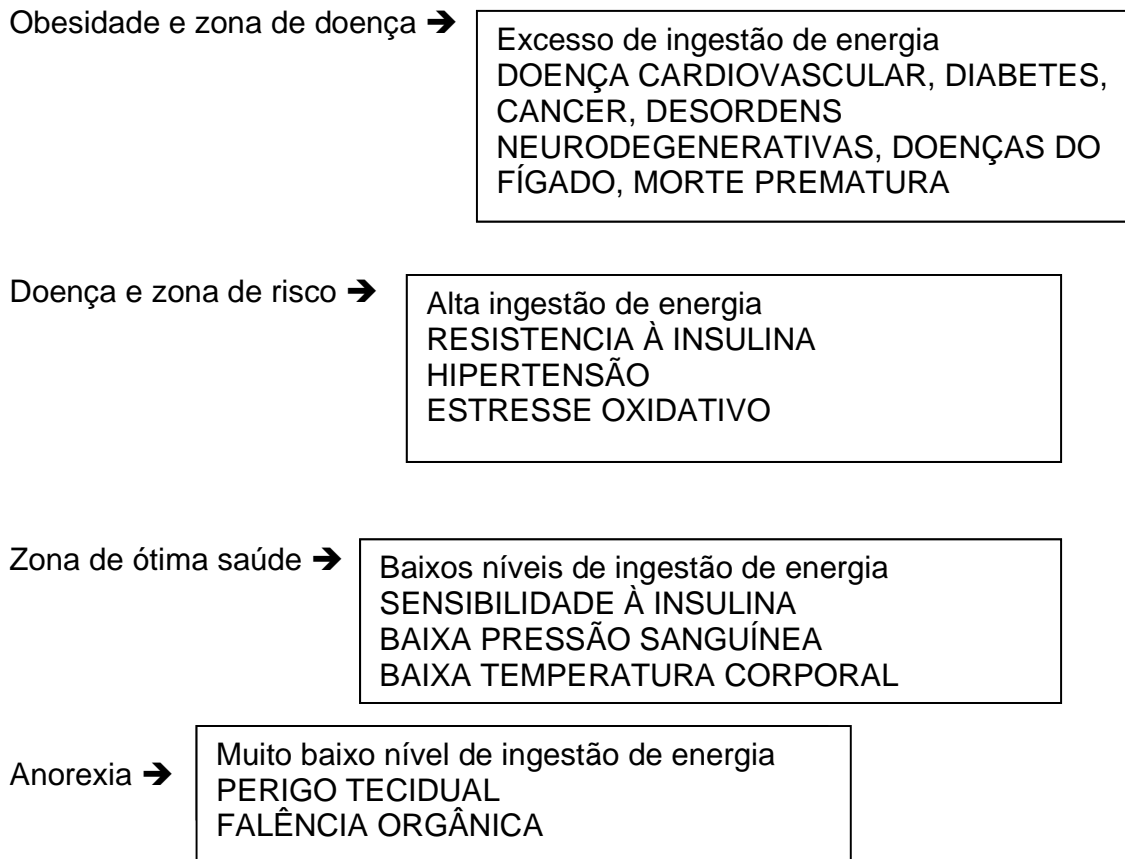
pode afetar a disponibilidade, absorção, metabolismo ou necessidades dietéticas de outros.

As proteínas são macronutrientes fundamentais para o crescimento, regeneração e renovação de tecidos (ossos, músculos, pele, cabelos, unhas), produção de hormônios, enzimas e integridade do sistema imunológico. São encontradas, principalmente, em alimentos de origem animal (leite, ovo, carnes em geral), frutos oleaginosos (amêndoas, amendoim, nozes) e grãos (feijões, soja, ervilhas, lentilhas e grão de bico) e sementes (gergelim, girassol, linhaça). Para nosso corpo formar suas próprias proteínas são necessários 22 tipos de aminoácidos, sendo 8 essenciais (necessitam vir da alimentação), 2 semi-essenciais (são necessários em algumas fases da vida) e 10 não essenciais (nosso organismo produz). Em 1991, o método que mede a qualidade das proteínas - PDCAAS (Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score) - foi recomendado pela FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) e adotado pela FDA (Food and Drug Administration) na avaliação de todos os alimentos destinados a adultos e crianças acima de 1 ano de idade. De acordo com este método, que classifica a qualidade das proteínas em uma escala de 0 a 1, a Proteína da Soja possui um valor mínimo de 0,8, próximo ao valor da Carne Bovina, de 0,92, e da Caseína do Ovo (proteína completa), de 1. Conforme posicionamento da American Dietetic Association (1997), fontes variadas e complementares de aminoácidos, ao longo do dia, garantem perfeitamente o atendimento das necessidades proteicas de indivíduos saudáveis. Indivíduos adultos saudáveis e sedentários necessitam de 0,8 a 1,2 g de proteínas/kg de peso corporal/dia.

O tamanho e a frequência das refeições também são aspectos fundamentais da nutrição que podem ter profundos efeitos na saúde e longevidade de animais de laboratório. Em humanos, o excesso de energia ingerida está associado com aumento da incidência de doença cardiovascular, diabetes e, com certeza, ao câncer (MATTSON, 2005).

Na figura 1, que se segue, mostramos as influências dos diferentes níveis de ingestão de energia e os sintomas causados por estes.

Figura 1: Influência de diferentes níveis de ingestão de energia.



Energia é definida como a capacidade de realizar trabalho. Na nutrição, refere-se à maneira pela qual o organismo utiliza energia situada nas ligações químicas que estão dentro do alimento. A energia liberada acompanha a síntese e a manutenção dos tecidos corpóreos, condução elétrica da atividade nervosa, o trabalho mecânico do esforço muscular e a produção de calor para a manutenção da temperatura corpórea. A unidade padrão para medida de energia é a caloria, que é a quantidade de energia térmica necessária para se elevar a temperatura de 1 mL de água, numa temperatura padrão inicial, de 1°C. A quantidade de energia envolvida no metabolismo dos alimentos é alta e, por

isto, usamos a quilocaloria (kcal) que é igual a 1000 calorias.

As necessidades nutricionais de um organismo são estimadas somando-se o gasto de energia no repouso, a energia requerida para atividade física e o efeito térmico do alimento.

As necessidades nutricionais refletem as taxas de crescimento, energia gasta na atividade, necessidades metabólicas basais e interação dos nutrientes. O melhor método para determinar a adequação das ingestões de energia dos seres em crescimento é monitorar cuidadosamente seu ganho em altura e peso. Se há uma redução na taxa de ganho de peso, não ganha peso ou perde peso, a ingestão de energia e nutrientes deve ser cuidadosamente monitorada.

As dietas com pouco carboidrato alteram o paladar e reduzem o apetite devido à alta formação e concentração de corpos cetônicos no sangue (cetoacidose). Os corpos cetônicos são substâncias derivadas da utilização de gordura como principal fonte de energia. Nesse tipo de alimentação ocorre um desvio do metabolismo: ao invés do corpo utilizar carboidratos como fonte de energia são utilizadas as gorduras, só que a um custo fisiológico alto, pois ocorre o desequilíbrio bioquímico do organismo.

Ao falarmos de emagrecimento, temos que falar de deficiência alimentar. A deficiência alimentar pode ser classificada de duas maneiras: a simples ou não complicada e a estressada ou complicada, que apresentam respostas metabólicas bastante distintas.

A desnutrição simples, também dita inanição, é devido a falta ou fornecimento de nutrientes ao organismo, na ausência de fatores estressantes. Não é o que ocorre no modelo citado de alergia.

A desnutrição estressada se caracteriza por hiperatividade metabólica. Em consequência há consumo protéico acelerado e a desnutrição grave e rápida. Há aceleração nas reações químicas para produzir energia. Há grande consumo de substratos orgânicos, principalmente proteína, aumento do gasto energético basal (devido ao maior consumo de oxigênio, maior produção de gás carbônico e estado hiperdinâmico). (CERRA, 1987). A rápida perda de musculatura esquelética e o balanço nitrogenado persistente negativo são característicos do quadro.

A resposta neuroendócrina e a liberação de mediadores da inflamação estão presentes nessas alterações metabólicas. Há uma quebra dos mecanismos defensivos e, com isto, a proteólise acelera-se e sobrevém desnutrição grave por hiperatabolismo. O meio hormonal passa a ter ação decisiva na persistência do consumo orgânico. Os três hormônios do estresse, ditos hormônios catabólicos, são catecolaminas, cortisol e glucagon. Estes estão em concentrações alteradas na presença do estresse grave. Eles causam efeitos como: aumento do metabolismo basal, elevação da glicemia, resistência à insulina e balanço nitrogenado negativo.

As catecolaminas atingem valores máximos imediatamente após o trauma. Ao mesmo tempo em que ocorre esta resposta do sistema nervoso simpático, o eixo hipotálamo-hipofisário é ativado e desencadeia a liberação de cortisol. O glucagon tem sua liberação estimulada pela atividade simpática e adrenalina circulante. (DOUGLAS & SHAW, 1989).

No modelo publicado por Saldanha et al. (2004), os animais ingeriam a ração Primor, que se baseia nas necessidades nutricionais dos camundongos e, além disto, bebiam uma solução de água contendo clara de ovo a 20%. Isto gera um desequilíbrio nutricional pois os animais estão ingerindo mais proteína do que deveriam. Supostamente, idealizou-se que este desequilíbrio nutricional poderia estar causando o emagrecimento dos animais alérgicos. Será que esta dieta

desequilibrada dos camundongos está sendo responsável pelo emagrecimento deles?

1.3- Alergia e emagrecimento

O processo inflamatório que ocorre na alergia pode elevar a taxa de metabolismo basal. A taxa metabólica aumentada exige a mobilização das reservas de nutrientes do corpo para fornecer substratos para a demanda energética aumentada. As reservas do corpo de carboidrato, principalmente glicogênio, são esgotadas nas primeiras 24 horas. Gordura e proteína servem como as principais fontes de energia. No estado hipermetabólico há catabolismo protéico líquido obrigatório em uma tentativa de prover substratos para gliconeogênese e aminoácidos para síntese aumentada de proteínas de fase aguda. Triacilgliceróis armazenados também são mobilizados e oxidados para fornecer substratos para o estado hipermetabólico, mas são incapazes de prevenir catabolismo de proteínas. Em suma, deve-se considerar que o estresse e a injúria aumentam as necessidades energéticas totais. Para isso, uma avaliação minuciosa da desidratação corpórea e a determinação da quantidade de glicose e proteínas totais devem ser comparadas. A quantidade de proteína absorvida e utilizada pelo organismo, bem como aspectos imunológicos devem ser estudados. Seria o emagrecimento dos camundongos do modelo de alergia alimentar citado puramente imunológico?

O emagrecimento também pode estar relacionado com produção sistêmica de citocinas, como em outras desordens imunológicas como a artrite reumatóide (SZEKANECZ, et al., 2000). Utilizando o modelo de artrite por adjuvante induzida pelo *M.butyricum* (derivado fenilacético com acentuada atividade antiinflamatória e antitranspirante) observaram correlação positiva entre o desenvolvimento de edema com perda de peso, leucocitose, neutrofilia, aumento da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 séricos.

A IL-1 ativa a secreção de ACTH que, por sua vez, estimula a secreção adrenal de glicocorticóides, e atua sobre o pâncreas, aumentando os níveis de insulina e glucagon.

O TNF- α estimula a supra-renal a produzir catecolaminas. Estas suprimem a produção de IL-1 pelos monócitos. A ação conjunta de IL-1 e TNF- α é o principal estímulo à mobilização de aminoácidos da musculatura periférica. Esta ação conjunta, também, inibe a lipase lipoprotéica, o que ocasiona hipertrigliceridemia. Estimulam a produção hepática de proteínas de fase aguda e reduzem a síntese de transferrina e albumina (POMPOSELLI, et al., 1988; SITGES-SERRA, 1991).

OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Investigar os mecanismos nutricionais e imunológicos que contribuem para a perda de peso em camundongos em que foi induzida a alergia alimentar a ovalbumina com ingestão de clara de ovo.

2.2- Objetivos Específicos

- Avaliar se uma dieta rica na proteína alergênica, mas equilibrada do ponto de vista nutricional, é capaz de gerar emagrecimento.
- Comparar camundongos susceptíveis (BALB/c) e resistentes (C57BL/6) ao protocolo de alergia alimentar, quanto ao emagrecimento.
- Avaliar a relação entre emagrecimento com níveis séricos de anticorpos específicos, níveis hepáticos da citocina TNF- α , nível de desidratação, quantificação da absorção protéica, e alterações morfológicas em diversos tecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- Materiais e Métodos

3.1- Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas com 5 a 7 semanas de idade das linhagens BALB/c e C57BL/6 provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram separados em grupos, sendo mantida a média de cinco animais por grupo. Todos os procedimentos foram executados de acordo com os princípios éticos estipulados pelo Comitê de Ética Animal (CETEA) da UFMG. Este projeto foi aprovado pelo protocolo de número 103/04.

3.2- Vermifugação

Todos os animais passaram pelo protocolo de vermifugação na semana anterior ao início dos experimentos. Foi utilizado 0,4 mL de Ivermectina a cada 500 mL de água e esta solução foi administrada na mamadeira dos animais. A cada 2 dias, a gaiola foi lavada e a maravalha foi trocada.

3.3- Indução da alergia alimentar

3.3.1- Antígeno

Foi utilizado como antígeno a OVALBUMINA (OVA, albumina da clara de ovo, SIGMA Grade V, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

3.3.2- Sensibilização ao antígeno

O protocolo de sensibilização parenteral consistiu de injeções subcutâneas no dorso do antígeno. Na sensibilização primária o animal recebeu 0,2 mL de salina fisiológica 0,85 % (NaCl 0,85% em água destilada), contendo 10 µg de OVA em 1 mg do adjuvante Al(OH)₃ e como reforço, 14 dias após, foi dada uma injeção similar de OVA sem adjuvante em 0,2 mL de salina (Figura 1). O protocolo de sensibilização foi aplicado apenas aos grupos experimentais alérgicos e grupo de animais tolerantes (que consomem a proteína alergênica desde o início do experimento). Os grupos controle, não alérgicos, receberam apenas o adjuvante e/ou salina fisiológica.

3.3.3- Desafio Oral

O desafio oral contendo a proteína alergênica foi feito de três formas: na solução de clara de ovo "in natura, na clara de ovo liofilizada ou na ração contendo ovalbumina. Em todos os grupos (ver desenho experimental – item 3.5), após sete dias do reforço com o antígeno foi feito o desafio oral: troca da mamadeira contendo água por mamadeiras contendo o antígeno - solução de clara de ovo a 20% (SCO), como única opção líquida, até o final do experimento; ou troca de uma ração contendo caseína ou ração comercial (Primor) por ração contendo ovalbumina (o antígeno).

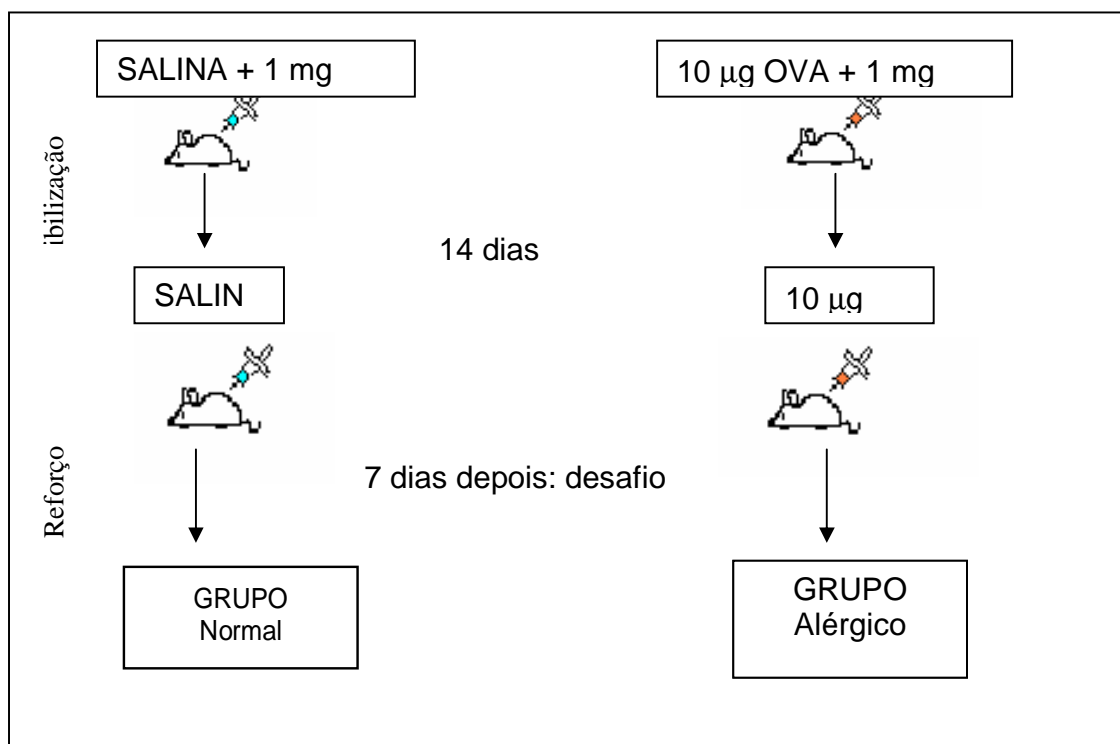


Figura 1: Protocolo Experimental da Alergia – Os grupos normais receberam injeção subcutânea de salina + $\text{Al}(\text{OH})_3$ no primeiro dia, e apenas salina 14 dias após. Os grupos alérgicos receberam injeção subcutânea de $10\ \mu\text{g}$ OVA + $1\ \text{mg}$ $\text{Al}(\text{OH})_3$ no primeiro dia, e apenas OVA 14 dias após. Em alguns grupos, sete dias depois houve o desafio oral: com troca de mamadeira (água por SCO) ou dieta (com caseína ou Primor por dieta com ovalbumina).

3.4- Dieta e avaliação do consumo

Em todos os experimentos houve uma oferta líquida “ad libitum”.

O desafio oral com a presença do antígeno foi administrado de duas maneiras:

- Líquido → Foram feitas duas formas de solução: 1ª misturando-se 80 mL de água com 20 mL com clara de ovo in natura ou 2ª misturando-se 1,82 gramas de clara de ovo liofilizada em 100 mL de água. Nas duas soluções a quantidade final de ovalbumina foi de 10 mg/mL. Estas

soluções foram administradas para os animais em mamadeiras e todas estas mamadeiras foram pesadas diariamente. O consumo líquido foi voluntário e restrito.

Tabela 1: Composição nutricional da Clara de Ovo segundo a tabela de composição química dos alimentos de Franco (1999)

Quantidade por porção (porção de 100 g)	
Valor kcal	43,2 kcal
Carboidrato	0 g
Proteína	10,8 g
Gorduras Totais	0 g
Cálcio	10 mg
Fósforo	28 mg
Ferro	0,8 mg

Tabela 2: Informação nutricional da Clara de Ovo Salto's (de acordo com o fornecedor).

Quantidade por porção (porção de 14 g)	
Valor kcal	54 Kcal
Carboidrato	1 g
Proteína	11 g
Gorduras Totais	0 g
Gordura saturada	0 g
Colesterol	0 mg
Fibra	0 g
Cálcio	8,7 mg
Ferro	0,02 mg
Sódio	179 mg

- Ração → foram usadas as seguintes rações: convencional (Primor), ração balanceada (AIN93G) contendo como fonte protéica caseína ou ovalbumina (para tal, foi usada clara de ovo liofilizada Salto's). A ração rica em ovalbumina possui a concentração desta proteína a 14%. Para fazermos a ração com ovalbumina concentrada a 10% (como as soluções contendo clara de ovo) deveríamos utilizar menor quantidade de proteína e isto não é possível uma vez que a dieta AIN93G estipula que haja 20% de proteína para que esta seja equilibrada do ponto de vista nutricional. Todas as rações foram administradas "ad libitum". Para controle do consumo, a ração foi pesada antes e depois de ser colocada nas gaiolas. Semanalmente, foi peneirado o conteúdo do fundo da gaiola para separar fezes e maravalha dos restos de ração. Esta ração foi pesada.

Tabela 3: Receita Padrão para Roedores Baseada na AIN93G

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

A maltodextrina não foi utilizada e, por isto, foi substituída por amido de milho. Na clara em pó liofilizada, usada para fazer a ração balanceada rica em ovalbumina, há 11 gramas de proteína para cada 14 gramas de pó. São necessários 200 gramas de proteína e, por isto, utilizamos 245,55 gramas de pó para cada 1 quilo de ração a ser feito. A clara em pó liofilizada possui carboidrato (1 grama para cada 14 gramas de pó) e esta quantidade deve ser subtraída do amido de milho senão colocaremos um excesso de carboidrato na dieta e, assim, ela ficará desbalanceada.

Todos os ingredientes são meticulosamente pesados e misturados na ordem de acordo com o peso (coloca-se primeiro o mais leve). O óleo deve ser pesado com aproximadamente 2 gramas a mais pois há perda deste no vasilhame. A mistura de vitaminas deve ser adicionada por último e no escuro pois algumas vitaminas são fotossensíveis. Após adicionar todos os ingredientes, peneira-se a mistura 3 vezes e, depois, acrescenta-se água e vai moldando para fazer os rolinhos de ração. A ração que não está sendo utilizada deve ser guardada no freezer (-20° C).

Tabela 4: Composição calórica e centesimal da dieta AIN93G

COMPOSIÇÃO CALÓRICA (g)	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL (%)
Proteína 20X4 =80	Proteína 20%
Carboidrato 64X4 = 256	Carboidratos 64%
Lipídios 16X9 = 144	Lipídios 16%
480 kcal/100 gramas de ração	TOTAL 100%

3.5- Desenho Experimental

Foram realizados 4 experimentos. Cada um dos grupos experimentais possuiu 5 animais.

No primeiro experimento, verificou-se a ingestão de solução de clara de ovo liofilizada (a 20%) teria o mesmo efeito da ingestão de solução de clara de ovo “in natura” (a 20%).

Tabela 5: *Desenho Experimental do primeiro experimento feito com camundongos BALB/c que consumiam mamadeira contendo água antes do desafio oral.*

Grupo	Protocolo de Experimentação	Mamadeira no desafio(contendo o antígeno)
A	Normal	Clara de ovo in natura
B	Sensibilizado à OVA	Clara de ovo in natura
C	Normal	Clara de ovo liofilizada
D	Sensibilizado à OVA	Clara de ovo liofilizada

No segundo experimento, foi verificado se a ingestão de solução de clara de ovo liofilizada teria o mesmo efeito de uma ração contendo clara de ovo liofilizada.

Tabela 6: Desenho Experimental do segundo experimento feito com camundongos BALB/c que consumiam mamadeira contendo água antes do desafio oral e ração comercial Primor..

Grupo	Protocolo de Experimentação	Ingestão no desafio (contendo o antígeno)
A	Normal	Ração contendo clara de ovo liofilizada
B	Sensibilizado à OVA	Ração contendo clara de ovo liofilizada
C	Normal	Mamadeira contendo solução de Clara de ovo liofilizada
D	Sensibilizado à OVA	Mamadeira contendo solução de Clara de ovo liofilizada

No terceiro e quarto experimento, foi testado o efeito sistêmico após a ingestão de rações balanceadas (20% de proteína) com caseína ou ovalbumina nas linhagens BALB/c e C57BL/6.

Tabela 7: Desenho Experimental do terceiro experimento feito com camundongos que consumiam mamadeira contendo água antes do desafio oral e ração comercial Primor. .

Grupo	Linhagem	Protocolo de Experimentação	Ração do desafio contendo 20% de proteína do tipo:
A	BALB/c	Normal	Ovalbumina
B	BALB/c	Sensibilizado à OVA	Ovalbumina
C	C57BL/6	Normal	Ovalbumina
D	C57BL/6	Sensibilizado à OVA	Ovalbumina

Tabela 8: Desenho Experimental do quarto experimento feito com camundongos que consumiam mamadeira contendo água durante todo o experimento..

Grupo	Linhagem	Ração antes do desafio contendo 20% de proteína do tipo:	Protocolo de Experimentação	Ração do desafio contendo 20% de proteína do tipo:
A	BALB/c	Caseína	Normal	Ovalbumina
B	BALB/c	Caseína	Sensibilizado à OVA	Ovalbumina
C	BALB/c	Ovalbumina	Normal	Ovalbumina
D	BALB/c	Ovalbumina	Sensibilizado à OVA	Ovalbumina
E	BALB/c	Caseína	Normal	Caseína
F	BALB/c	Caseína	Sensibilizado à OVA	Caseína
G	C57BL/6	Caseína	Normal	Ovalbumina
H	C57BL/6	Caseína	Sensibilizado à OVA	Ovalbumina

Observa-se que o grupo D é o grupo da tolerância oral pois ele recebe a dieta contendo ovalbumina antes da sensibilização ao antígeno ovalbumina. Este grupo possui o seu grupo controle que é o grupo C.

3.6- Avaliação do peso corporal

O peso corporal foi avaliado individualmente 3 vezes por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o final (dia 54).

3.7- Obtenção do Soro

Os animais foram sangrados no término de cada experimento. Foi feita a sangria pelos vasos axilares, em animais anestesiados com xilasina e ketamina. Após coagulação do sangue, este foi centrifugado (3000 rpm) por 8 minutos. O soro foi retirado e congelado (-20° C) para posterior análise da concentração de anticorpos, albumina, proteína sérica, glicose e contagem de leucócitos. Para: albumina, proteína sérica e glicose utilizamos o testes de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante (Quibasa). Para a contagem de leucócitos fizeram-se lâminas do esfregaço sanguíneo e contou-se em microscópio óptico.

3.8- Avaliação do nível de desidratação e gorduras corporais.

O nível de desidratação foi avaliado da seguinte forma. Após o sacrifício, o conteúdo total de água da carcaça sem a cabeça foi avaliado pela diferença entre o peso úmido e seco (totalmente desidratada em estufa ventilada à 60° durante 24 horas). Pesaram-se o coração, rim direito e rim esquerdo dos animais. A gordura de cobertura abdominal foi retirada e pesada também.

3.9- Dosagem dos anticorpos IgE específico anti-OVALBUMINA

Microplacas de poliestireno serão incubadas a 4°C, com antígeno IgE de rato anti-camundongo na concentração de 1:250 diluídos em 50µl de tampão carbonato pH 9.6, por poço, durante uma noite. Posteriormente, as placas serão lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora com 200µl de solução caseína a 0,25% em PBS, por poço, para bloqueio à temperatura ambiente. A solução será desprezada e as placas incubadas por 2 horas com 50µl por poço de soro total dos animais a serem testados. As placas serão lavadas com solução salina-Tween e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com 1µl de OVA-Biotina em 50µl de PBS-caseína, por poço. As placas serão novamente

lavadas com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 50µl por poço de estreptoavidina-peroxidase na concentração de 1:6000 por 45 minutos à temperatura ambiente. As placas serão lavadas com salina-Tween e incubadas, protegidas da luz, por 15 minutos à temperatura ambiente com 100µl, por poço, de tampão citrato pH=5.0 contendo H₂O₂ e ortofenileno-diamino (OPD). As reações serão interrompidas, após 15 minutos, pela adição de 20µl por poço de H₂SO₄ 2N. Em todas as placas será corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica será obtida em Leitor de ELISA com filtro de 490 nm. Os resultados serão amostrados em unidades arbitrárias (U.A.) a partir do padrão positivo considerado como 1000 unidades.

3.10- Avaliação da citocina relacionada com emagrecimento: TNF-α

Foram feitas dosagens da citocina TNF-α no fígado, para determinação do padrão da citocina produzida pelo processo alérgico desencadeado pela ingestão do antígeno ao qual os animais foram previamente sensibilizados, comparado ao seu grupo controle. Para a determinação desta concentração de TNF-α foram usados anticorpos disponíveis comercialmente de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante (R&D Systems).

3.11- Avaliação da integridade da mucosa.

A integridade da mucosa foi avaliada pelo método de LOWRY (1951). Para tanto, após o sacrifício, o ceco e o intestino grosso dos animais foram retirados, lavados com salina fisiológica para retirada das fezes e armazenado em freezer (-70° C) até o dia do procedimento. Depois, foi masserado com 2 mL de salina e o conteúdo protéico avaliado pelo método de LOWRY (1951). O método consiste primeiramente em preparar uma solução "A" contendo: 1 parte de CuSO₄, 1 parte de tartarato de sódio ou tartarato de sódio e potássio a 1% e

100 partes de Na₂CO₃ a 2% em NaOH 0,1 M. Prepara-se a solução de reagente de Folin 1:2 em água destilada. Diluíram-se todas as amostras de ceco e intestino grosso previamente masseradas de acordo com um valor que coubesse dentro da curva padrão conforme o quadro abaixo:

Padrão (1mg/mL)	Quant. De proteína (µg) no tubo	Volume (µl)	H ₂ O destilada (µl)	Volume final (µl)
P1	2,0	2,0	38,0	40
P2	4,0	4,0	36,0	40
P3	8,0	8,0	32,0	40
P4	10,0	10,0	30,0	40
P5	40,0	40,0	0,0	40
Branco	0	-----	40,0	40

A proteína utilizada como padrão foi a albumina (1mg/mL). As amostras foram diluídas da seguinte maneira:

- Ceco do C57BL/6 → 1:50
- Intestino grosso do C57BL/6 → 1:30
- Ceco do BALB/c → 1:50
- Intestino Grosso do BALB/c → 1:100

Pegou-se uma alíquota de 40 µl de cada amostra utilizando-se pipetas novas, Ependorfs novos e colocou-se em uma microplaca de ELISA de 96 poços nova. Acrescentou-se a cada poço 200 µl de solução "A" e 20 µl de solução de Folin. Esperou-se 30 minutos e leu-se no espectrofotômetro a 690 nm na mesma ordem de aplicação dos reagentes.

3.12- Quantificação dos níveis de lípidos hepáticos.

No sacrifício, os fígados dos animais foram removidos, pesados e armazenados em freezer (-70° C) até o dia do procedimento. Neste dia, os fígados foram descongelados, lavados em solução salina fisiológica e secos em papel filtro. Pesou-se uma alíquota de 100 mg de fígado e triturou-se em tubos de ensaio durante 3 minutos com 1900 µl de solução de clorofórmio:metanol (2:1) usando-se homogeneizador. Adicionaram-se 400 µl de metanol com um jato forte a cada tubo e levou-se para centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi recolhido em tubo de massa conhecida (previamente pesado). Acrescentaram-se 800µl de clorofórmio com pipeta de vidro e 640 µl de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm, desprezou-se a fase superior. Lavou-se a parede interna de cada tubo com 600µl de solução contendo: 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada, e 2% de NaCl a 0,29%. Após cada lavagem, a fase superior foi descartada. Os extratos lipídicos obtidos foram secos em estufa "overnight" a 37° C e os lípidos foram quantificados gravimetricamente.

Em outro momento, os extratos lipídicos foram homogeneizados com 500 µl de isopropanol e determinaram-se os níveis de colesterol total. A diluição para dosar o colesterol no fígado foi de 1:50.

3.13- Avaliação morfológica da alergia

A alergia alimentar foi avaliada morfológicamente através dos segmentos do intestino delgado que foram retirados. Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção será baseado segundo FERRARIS e colaboradores (1992), sendo o

intestino lavado com salina fisiológica, para retirada das fezes, e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções são designadas como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Essas porções são fixadas em formol tamponado a 10%, desidratadas em soluções decrescentes de álcoois e incluídas em parafina. Cortes de 4 µm são obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE), e posteriormente analisados usando microscópio óptico convencional. Após esta análise, o epitélio foi examinado com aumento de 40x.

Outros órgãos como baço e fígado também foram retirados para histologia e analisados.

Fez-se a análise morfométrica da quantidade de muco das porções do intestino delgado. Foi utilizado um programa de análise de imagem (KS-100/300) em computador PC-486, acoplado a microscópio Zeiss, em aumento de 40x. As criptas se apresentam em cortes bem orientados, isto é, cortados verticalmente e as células caliciformes bem coradas com P.A.S. (*Periodic Acid Schiff*). Não foi necessário contra-corar com hematoxilina.

3.14- Avaliação da mieloperoxidase (MPO) no intestino.

O intestino dos animais (separados nos seus já referidos segmentos) foram coletados ao final do experimento e armazenados em freezer -70 °C, para análise posterior.

Para quantificação da atividade da MPO, o material foi pesado, macerado com solução tampão e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspenso em salina/EDTA (2 mL) gelada, sendo adicionados 15 mL de NaCl 0,2% gelado e 15 mL de NaCl 1,6% com glucose 5% gelada. Foi feita uma nova centrifugação, o sobrenadante foi

descartado e o “pellet” ressuspeso em tampão fosfato com HTAB 5% e re-homogenizado por 30 segundos. O volume de 1 mL de cada amostra foi transferido para Eppendorf. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente 3x em nitrogênio líquido, e submetidas novamente à centrifugação e os sobrenadantes coletados para o ensaio. Um volume de 75 µl do sobrenadante foi adicionado em placas de 96 poços, incubado com 75 µl de tampão mais OPD/H₂O₂ por 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 75 µl de H₂SO₄ e a densidade óptica foi medida em 492 nm.

3.15- Análise estatística

Diferenças na resposta entre grupos relacionados serão feitas pela análise de variância (ANOVA). Para comparações pareadas entre grupos controle e experimentais, será usado teste Anova-Tukey.

RESULTADOS

4- Resultados

4.1- Peso corpóreo e consumo

Uma vez que a ingestão de clara de ovo “in natura” por animais sensibilizados com ovalbumina causa o emagrecimento, perguntou-se: pode uma solução feita com a clara de ovo liofilizada e água causar o emagrecimento de animais BALB/c sensibilizados?

Para responder a essa pergunta, foi realizado o primeiro experimento que consistiu de comparar o peso dos animais sensibilizados ou não à ovalbumina após o consumo de mamadeira contendo a solução de clara de ovo “in natura” ou clara de ovo liofilizada.

Conforme mostrado no Gráfico 1, pode-se observar que a ingestão das duas formas do antígeno causou emagrecimento semelhante nos animais sensibilizados. O emagrecimento teve início a partir da primeira semana após a ingestão do antígeno.

O Gráfico 2 mostra que não houve diferença no consumo de solução de clara de ovo “in natura” (C) ou liofilizada (L) entre os grupos de animais sensibilizados (S). Da mesma maneira, os animais não sensibilizados (N) apresentam consumo equivalente das duas formas de solução contendo o antígeno. No entanto, observa-se que a ingestão das soluções contendo o antígeno foi maior em animais não sensibilizados quando comparados com animais sensibilizados.

Tendo visto que uma solução contendo 1,82 g de clara liofilizada em 100 mL de água foi capaz de causar o emagrecimento de animais sensibilizados à

ovalbumina, pergunta-se: pode uma ração feita com a clara de ovo liofilizada causar o emagrecimento de animais BALB/c sensibilizados?

A ração contendo clara de ovo liofilizada causa o emagrecimento ainda mais acentuado nos animais BALB/c sensibilizados. Esta ração possui uma concentração de 14% de ovalbumina contra 10% na solução de clara de ovo liofilizada (Gráfico 3).

A intenção de fornecer o antígeno alergênico na ração foi de saber se o desbalanço nutricional estava interferindo no emagrecimento dos animais sensibilizados. Fabricou-se a ração utilizando como fonte protéica a clara de ovo liofilizada. Esta dieta foi feita de acordo com os parâmetros da AIN93G, uma dieta balanceada. A ração para ser balanceada deve possuir 20% de proteína e para tal devem-se colocar 245,55 g de clara liofilizada da marca Salto's para cada 1 kg de ração.

Os Gráficos 4 e 5 comparam, respectivamente, o consumo líquido e de ração dos grupos sensibilizados ou não que consomem a ração balanceada contendo ovalbumina a 14% e bebem água ou que consomem a ração Primor e bebem uma solução contendo clara de ovo liofilizada a 10%, como desafio oral. O consumo de água pelos animais que consomem ração balanceada é o mesmo no grupo sensibilizado ou não. Os animais sensibilizados consumindo solução de clara de ovo liofilizada consomem menos do que os animais não sensibilizados. Quando comparamos o consumo de ração Primor pelos animais que bebem solução de clara de ovo liofilizada como desafio oral vimos que o consumo é igual entre o grupo sensibilizado e não sensibilizado. Os animais que consomem ração balanceada rica em ovalbumina também consomem a mesma quantidade.

Ao concluirmos que a clara de ovo liofilizada funciona quando utilizada na dieta pudemos fazer um experimento comparando as linhagens BALB/c e C57BL/6.

O Gráfico 6 compara o peso corpóreo (g) das linhagens C57BL/6 e BALB/c consumindo, como desafio oral, a ração balanceada rica em ovalbumina. Os animais sensibilizados da linhagem BALB/c emagrecem enquanto os C57BL/6 não. Os animais não sensibilizados de ambas as linhagens não emagrecem.

Ao compararmos o consumo de água e ração balanceada, nos Gráficos 7 e 8, entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 podemos concluir que o consumo de ração foi o mesmo em todos os grupos de quaisquer umas das linhagens. Quanto ao consumo de água, observou-se que os animais C57BL/6 consomem mais do que os BALB/c. Não há diferença entre os grupos sensibilizados (S) e não sensibilizados (N).

No experimento anterior, fizemos a comparação das linhagens BALB/c e C57BL/6 dando para os animais ração Primor antes do desafio oral e uma ração balanceada rica na proteína alergênica, a ovalbumina, como o desafio oral. Viu-se a necessidade de fazer um novo experimento no qual damos para os animais, antes do desafio oral, uma ração balanceada, de composição conhecida, que não tenha o antígeno. Confeccionou-se uma ração balanceada com 20% de proteína vinda da caseína e administrou-se esta ração às linhagens BALB/c e C57BL/6 antes do desafio oral e, como desafio oral, demos a dieta de ovalbumina. Fizemos, também, grupos experimentais com os animais BALB/c consumindo a ração rica em caseína do início ao fim do experimento e com a ração rica em ovalbumina também administrada em todo o experimento.

O peso corpóreo (g) dos animais neste último experimento, Gráfico 9, confirmou que os animais BALB/c sensibilizados que consomem ração de caseína antes do desafio e ração de ovalbumina como desafio oral (BALB/c S/DC-DO) emagrecem quando comparados com o seu grupo controle (BALB/c N/DC-DO). Quando comparados aos animais sensibilizados da linhagem C57BL/6 (C57BL/6 S/DC-DO) que consomem caseína antes do desafio e ovalbumina neste, estes

animais BALB/c emagrecem. E quando comparados com os BALB/c sensibilizados que consomem caseína durante todo o experimento (BALB/c S/DC-DC), eles também emagrecem. Os animais que consomem caseína ou ovalbumina durante todo o experimento não possuem diferença de peso quando comparamos o grupo sensibilizado (S) com o seu respectivo controle (N). E os animais da linhagem C57BL/6 também têm este comportamento, ou seja, os animais sensibilizados e os não sensibilizados não apresentam diferença de peso.

O Consumo de mamadeira de água neste experimento só foi diferente ao compararmos os animais não sensibilizados BALB/c e C57BL/6 que consumiam caseína antes do desafio oral e, como desafio, ovalbumina (Gráfico 10). O consumo de ração foi igual estatisticamente para todos os grupos experimentais mesmo considerando rações diferentes: caseína ou ovalbumina (Gráfico 11). Neste experimento, peneiramos o material depositado no fundo da gaiola no final de cada semana a fim de obter ração que eventualmente poderia estar sendo desperdiçada. Deste peneirado nada obtemos de ração em nenhuma das gaiolas.

4.2- Avaliação do nível de desidratação e gorduras corporais e peso dos órgãos.

No sacrifício dos animais, retiramos todos os órgãos de dentro da carcaça dos animais e, retirou-se, também, a cabeça. Pesou-se esta carcaça. Este peso da carcaça considera a água existente nos tecidos. Levamos as carcaças para a estufa ventilada a 60°C durante 24 horas e, depois, pesamo-las.

O peso das carcaças ainda hidratadas, quando comparadas entre si no Gráfico 12, mostrou diferenças entre os seguintes grupos:

- animais BALB/c sensibilizados e não sensibilizados que consumiam dieta de caseína antes do desafio oral e dieta de ovalbumina neste. Os animais não sensibilizados possuíram carcaça maior.

- animais C57BL/6 com dieta de caseína antes do desafio oral e ovalbumina como desafio oral. Os animais sensibilizados possuíam carcaça maior do que os animais não sensibilizados.

Os animais BALB/c que consumiram dieta de caseína ou ovalbumina durante todo o experimento não apresentaram carcaças diferentes ao se comparar os grupos sensibilizados com os não sensibilizados.

O peso das carcaças desidratadas, vistas no Gráfico 13, mostraram diferenças estatísticas entre animais BALB/c sensibilizados e não sensibilizados que consumiam dieta de caseína e depois passaram a consumir dieta de ovalbumina; os animais não sensibilizados possuíram maiores peso de carcaça. Comparando os animais sensibilizados com não sensibilizados dos demais grupos (C57BL/6 com dieta de caseína antes do desafio e ovalbumina como desafio oral; BALB/c com dieta de caseína ou ovalbumina durante todo o experimento) possuíram carcaças com pesos da mesma gramatura.

Ao retirarmos os órgãos de dentro da carcaça pesamo-los. Obtivemos os seguintes resultados:

- o peso do coração (mg), visto no Gráfico 14, foi o mesmo se compararmos os animais sensibilizados e não sensibilizados de ambas as linhagens. Se compararmos os animais C57BL/6 com os BALB/c veremos que os C57BL/6 possuem coração maior.

- o peso do rim direito (mg) não apresenta diferença estatística entre todos os grupos. Veremos isto no Gráfico 15.

- o peso do rim esquerdo (mg) dos animais BALB/c sensibilizados ou não é do mesmo tamanho mas quando olhamos os C57BL/6, no Gráfico 16, concluímos que os não sensibilizados possuem rim maior do que os sensibilizados.

- o peso da gordura abdominal (mg) mostra uma gritante diferença entre os animais sensibilizados e os não sensibilizados; que podem ser visualizados no Gráfico 17. Os animais sensibilizados possuem menos gordura abdominal do que os não sensibilizados. Os sensibilizados BALB/c e C57BL/6 não possuem diferença estatística da quantidade de gordura abdominal assim como os não sensibilizados.

4.3- Contagem de células do sangue

Os Gráficos 18, 19, 20, 21 e 22 mostram a contagem de células do sangue de animais BALB/c que consumiram dieta rica em caseína antes do desafio e ovalbumina após o desafio oral. As células que foram contadas são: neutrófilos, basófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos respectivamente. Vimos que entre os animais sensibilizados e os não sensibilizados não há diferença estatística destas células.

4.4- Morfologia e Avaliação da mieloperoxidase (MPO) no intestino

Nas Figuras 3, 4, 5 e 6 temos fotos comparando morfológicamente os fígados dos animais BALB/c e C57BL/6 sensibilizados (S) ou não (N). Observamos que não há diferenças morfológicas entre estes fígados.

Foram visualizadas alterações morfológicas nos vários experimentos feitos. Nos Gráficos 23, 24, 25 e 26, há a quantificação de muco produzida pelas células caliciformes do intestino delgado de animais BALB/c que consumiam, após desafio oral, solução de clara de ovo “in natura” ou solução com clara de ovo liofilizada. No Gráfico 23, temos a porção do duodeno, e nos Gráficos 24, 25 e 26 temos, respectivamente, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. O duodeno e o jejuno proximal de animais que consomem clara de ovo “in natura” possuem a mesma quantidade de muco do que o animais que consomem clara de ovo liofilizada. Quando consideramos o jejuno distal, vemos que os camundongos

sensibilizados produzem mais muco do que os seus respectivos controles (tanto na linhagem BALB/c quanto C57BL/6). E no íleo, há maior quantidade de muco apenas no grupo sensibilizado que consome clara de ovo “in natura” quando comparado com o seu controle.

Nas Figuras 7, 8, 9 e 10 temos fotos mostrando o muco das células caliciformes da porção do jejuno distal do intestino delgado.

Comparamos as linhagens BALB/c e C57BL/6, ambos comendo ração balanceada de ovalbumina após desafio oral, quanto à quantidade de muco produzida por células caliciformes no intestino delgado. O Gráfico 27 mostra a porção do duodeno enquanto os Gráficos 28, 29 e 30 mostram jejuno proximal, jejuno distal e íleo respectivamente. Observamos que no duodeno e no jejuno proximal há maior produção de muco pelos animais sensibilizados C57BL/6 do que pelo seu respectivo controle e do que o BALB/c sensibilizado. Já no jejuno distal, os animais sensibilizados (BALB/c ou C57BL/6) produzem maior quantidade de muco do que os seus controles e, entre eles, não há diferença estatística. Mas, entre os animais não sensibilizados há diferença estatística pois, os C57BL/6 produzem mais muco. No íleo, observa-se maior produção de muco no grupo C57BL/6 sensibilizado quando comparado apenas com o seu controle.

Outra alteração morfológica detectada foi feita por MPO, ou seja, quantificação da mieloperoxidase; vista no Gráfico 31. Esta enzima estava quantitativamente maior nos animais BALB/c sensibilizados que consumiam ração balanceada de caseína antes do desafio e ovalbumina após este do que nos C57BL/6 que consumiam o mesmo tipo de ração. Os animais BALB/c que consumiam ração de caseína ou ovalbumina durante todo o experimento não mostraram diferenças estatísticas entre eles.

4.5- Avaliação da integridade da mucosa.

Fez-se a quantificação de proteínas da mucosa do ceco e do intestino grosso de animais BALB/c e C57BL/6 que consumiam ração Primor antes do desafio oral e de ovalbumina após este. No ceco, representado no Gráfico 32, encontramos que os animais não sensibilizados C57BL/6 possuem maior quantidade de proteína do que o seu respectivo sensibilizado e do que o não sensibilizado da linhagem BALB/c. Já no intestino grosso, Gráfico 33, há diferença estatística entre todos os grupos. Os BALB/c possuem maior quantidade de proteína do que os C57BL/6 sendo que o sensibilizado BALB/c possui mais do que o não sensibilizado. Na linhagem C57BL/6 a quantidade de proteína é maior nos animais não sensibilizados.

4.6- Quantificação dos níveis de lípides hepáticos.

Pelo método de Folch, fez-se a detecção de lípidos totais (mg/g de fígado) de animais BALB/c e C57BL/6 que consumiam ração Primor antes do desafio oral e ração rica em ovalbumina após o desafio. Observa-se, no Gráfico 34, que a linhagem C57BL/6 possui mais lípidos do que a linhagem BALB/c sendo que os animais sensibilizados C57BL/6 possuem maior quantidade de lípidos do que os não sensibilizados. Não há diferença estatística da quantidade de lípidos totais de animais sensibilizados ou não da linhagem BALB/c.

Quando quantificamos somente a fração de colesterol dos lípidos totais do fígado de animais BALB/c e C57BL/6 que consomem ração Primor antes do desafio oral e ração de ovalbumina após o desafio, concluímos que:

- os animais sensibilizados (BALB/c ou C57BL/6) possuem maior quantidade de colesterol do que os seus respectivos não sensibilizados.
- os animais sensibilizados possuem, entre si, a mesma quantidade de colesterol.

- entre os animais não sensibilizados, os C57BL/6 possuem maior quantidade de colesterol.

A quantidade de colesterol pode ser vista no Gráfico 35.

4.7- Dosagem dos anticorpos IgE específico anti-ovalbumina

Para confirmarmos se os animais se tornaram sensibilizados à ovalbumina, mediu-se, no soro, a quantidade de anticorpos do isotipo IgE. No primeiro experimento, ver Gráfico 36, no qual comparamos animais BALB/c que consumiam, após desafio oral, solução contendo clara de ovo “in natura” ou solução de clara de ovo liofilizada, encontramos que:

- os animais sensibilizados produzem maior quantidade de IgE do que os seus respectivos não sensibilizados.
- os animais sensibilizados que consomem clara de ovo liofilizada produzem mais IgE do que os que consomem clara de ovo “in natura”.
- entre os animais não sensibilizados não há diferenças estatísticas.

No segundo experimento, visto no Gráfico 37, confirmamos a presença de maior quantidade de IgE entre os animais sensibilizados, sejam eles consumindo, após desafio oral, uma solução contendo clara de ovo liofilizada ou ração balanceada de ovalbumina. Quando comparamos os animais sensibilizados entre si não observamos diferença estatística e o mesmo ocorre para os animais não sensibilizados.

Quando comparamos as linhagens BALB/c e C57BL/6 (Gráfico 38), tem-se que: os animais sensibilizados produzem maior quantidade de IgE do que os seus respectivos controles. Os C57BL/6 sensibilizados produzem menos IgE do que os sensibilizados da linhagem BALB/c. Entre os não sensibilizados não há diferença estatística.

4.8- Quantificação de glicose, albumina e proteínas no soro

Aproveitando os soros dos animais, quantificou-se glicose, albumina e proteínas séricas, Gráficos 39, 40 e 41 respectivamente. Pode-se observar que não há diferenças estatísticas entre os grupos de nenhuma destas quantificações.

4.9- Avaliação da citocina relacionada com o emagrecimento: TNF- α

Para finalizar o trabalho, procurou-se a citocina responsável pelo emagrecimento, TNF- α , no fígado dos animais BALB/c sensibilizados e não sensibilizados. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos; ver Gráfico 42.

DISCUSSÃO

6- Discussão

Nas três formas de administração oral do antígeno, ou seja, na forma de solução de clara “in natura”, solução de clara liofilizada e na dieta, houve o emagrecimento dos animais BALB/c sensibilizados. Os animais não sensibilizados bebem mais solução de clara de ovo quando comparados ao grupo sensibilizado. Esse fato pode ser explicado por duas hipóteses: a clara de ovo tem muito sódio e com isto o animal fica com mais sede e bebe mais ou os animais bebem mais porque gostam. Quando olhamos para o grupo sensibilizado descartamos a hipótese do sódio e percebemos que os animais realmente gostam da solução de clara. Esse dado era esperado devido à teoria geral da aversão condicionada ao sabor. Essa teoria correlaciona sensações gustatórias e conseqüências gastrointestinais. Diversas áreas do cérebro estão interligadas ao trato gastrointestinal (GARCIA, et al., 1985), e projeções neurais do trato gastrointestinal e gustatórias convergem para o mesmo local no cérebro: a região caudal do núcleo solitário. Baseado nessas relações anatômicas e fisiológicas sugere-se que qualquer distúrbio gastrointestinal, via nervo vago ou via sanguínea, pode chegar ao cérebro concomitantemente a estímulos originados dos nervos gustatórios. A aversão ao sabor estaria relacionada com o estabelecimento dessa associação. Esse fato também foi observado por Cara e colaboradores (CARA et al, 1994; CARA et al., 1997). Os autores viram que frente a duas opções líquidas, uma de água e outra de clara de ovo adocicada com sacarina, animais não sensibilizados com ovalbumina preferiam ingerir a solução adocicada, enquanto que animais sensibilizados mostravam aversão a essa solução. Acredita-se, então, que mesmo com uma única fonte líquida, a ingestão de solução de clara de ovo causou um desconforto nos animais sensibilizados no período inicial da ingestão e isto os levou a relacionar o sabor da clara ao mal estar. A ingestão se tornaria mais nítida e intensa nos períodos subseqüentes porque seria reforçada por esse condicionamento. Um bom exemplo da alteração do comportamento alimentar é a mulher no início da

gravidez com mal estar e uma aversão a determinados alimentos. No primeiro trimestre, há uma modificação do limiar de sensibilidade do paladar que faz com que a gestante, passe a achar desagradável, cheiros e sabores que antes eram palatáveis. A náusea e o vômito do primeiro trimestre da gestação estão envolvidos na proteção do embrião contra uma ampla variedade de teratógenos (toxinas que causam defeitos congênitos) e abortíferos (toxinas que induzem o aborto) abundantes em alimentos. O mal estar da gravidez é um aumento da sensibilidade a certas toxinas para compensar a extrema vulnerabilidade do embrião a elas durante a organogênese. Essa teoria relaciona o período de mal-estar, que acontece entre a terceira semana e o terceiro mês, com a organogênese (PROFET, 1992).

Podemos, ainda, dizer que mesmo nos animais sensibilizados bebendo menor quantidade de solução de clara de ovo, esta quantidade é o suficiente para causar os sintomas da alergia.

Quando o animal sensibilizado bebe clara de ovo (“in natura” ou liofilizada), ele consome aproximadamente 4mL/dia enquanto o animal não sensibilizado consome 8mL/dia. Os animais sensibilizados ingerindo solução de clara de ovo têm aversão, após sensibilização, à presença do antígeno. Quando calculamos a quantidade de antígeno ingerido por animal por dia vimos que os animais sensibilizados que consomem clara de ovo (“in natura” ou liofilizada) ingerem 40mg de ova/mL e os não sensibilizados ingerem 80mg de ova/mL. Apesar de não se saber o quanto de antígeno está sendo absorvido pelo organismo dos animais, sabe-se que a quantidade de antígeno ingerido por animais sensibilizados em ambas as soluções foi a mesma. Isto pode ser elucidado vendo que o peso corpóreo de animais sensibilizados ingerindo solução de clara de ovo “in natura” ou solução de clara de ovo liofilizada foi o mesmo, ou seja, não houve diferença estatística. Entre os animais não sensibilizados ocorreu o mesmo fato e todos estes animais beberam maior solução de clara quando comparados aos sensibilizados. Com os resultados obtidos no primeiro

experimento, viu-se que poderíamos prosseguir para o segundo experimento: colocar o antígeno na dieta, ou seja, fabricar uma ração que possuía como única fonte protéica a ovalbumina vinda da clara de ovo liofilizada.

Os resultados do segundo experimento foram bastante satisfatórios. Neste experimento testou-se a clara do ovo liofilizada na ração. Os animais sensibilizados que consumiram a ração de ovalbumina, após desafio oral, ingeriram aproximadamente 39,2 mg de ova/mg de ração contra os animais não sensibilizados que ingeriram 44,6 mg de ova/mg de ração. Pode-se notar que, mesmo a dieta estando com maior concentração de ova (14%) que a solução líquida (10%), os animais sensibilizados ingerem a mesma quantidade de ova na ração ou bebendo solução de clara de ovo (ou seja, aproximadamente 40 mg de ova/dia). Os animais sensibilizados que consumiram o antígeno na dieta emagreceram mais do que os animais com solução de clara de ovo liofilizada; demonstrado no Gráfico 3. Líquidos não-nutricionais, líquidos nutricionais e sólidos drenam com velocidades diferentes, e essas velocidades são reguladas por diversos mecanismos (MAYER, 1994; READ, 1989). Líquidos não-nutricionais, como água ou solução salina isotônica, são rapidamente eliminados do estômago. O volume transferido para o duodeno corresponde a uma fração constante do volume de líquido no estômago. Líquidos de densidade calórica elevada drenam mais lentamente que aqueles com menos calorias por unidade de volume. Carboidratos e aminoácidos modulam a liberação de nutrientes intestinais pelos seus efeitos sobre a osmolaridade do intestino delgado. Sólidos digestivos deixam o estômago vazio com uma velocidade menor que os líquidos. As partículas de alimento precisam ser reduzidas em diâmetro 1 mm para permitir sua passagem pelo piloro. Partículas pequenas apresentam uma maior superfície: o que torna a maior parte de seus conteúdos acessível às enzimas digestivas do intestino. Esta explicação justifica que a quantidade de antígenos absorvidos também seja maior. Esse fato pode explicar o porquê que os animais sensibilizados que comem dieta de ovalbumina emagrecem mais do que animais sensibilizados que bebem clara de ovo. Quando observamos o consumo de

ração rica em ovalbumina entre o grupo sensibilizado e não sensibilizado, concluímos que: na ração não há aversão pelo grupo sensibilizado uma vez que este consome a mesma quantidade que o grupo não sensibilizado. No caso da dieta, a ovalbumina está bem misturada com os demais componentes da ração e, pode ser que não haja estímulos suficientes no nervo gustatório a serem associados a desconfortos gastrointestinais. Essa falta de aversão à dieta, pelos animais sensibilizados, se aproxima do que acontece na vida dos seres humanos. Comemos diariamente alimentos que nos fazem mal e, por estarem “mascarados”, não são percebidos por nós. A aversão, neste caso, deixa de ser um mecanismo de proteção. É claro que quanto mais puro está o alimento, mais fácil é a associação dos estímulos no nervo gustatório com o desconforto gastrointestinal. Poderia ser comprovado se realmente não houve aversão à ração se déssemos, para os animais, a opção de ração rica em caseína.

A linhagem BALB/c, quando previamente sensibilizada, continua emagrecendo mesmo comendo a ração balanceada (Gráficos 3, 6 e 9). Isto descarta a hipótese inicialmente levantada de que o desequilíbrio da dieta poderia estar causando o emagrecimento. Há muito se conhece que a ingestão inadequada de alimentos produz perda de peso e retardo do crescimento e, quando grave e prolongada, leva à caquexia e ao edema. As anormalidades associadas com caquexia incluem: anorexia, perda de peso, perda de músculo somático e massa adiposa, alterações hepáticas da glicose e metabolismo de lipídios e anemia. Evidências de modelos animais e estudos clínicos sugerem que uma resposta inflamatória, mediada em parte por uma desregulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, tem um papel muito importante no curso da caquexia, associada com doença crítica e doença inflamatória crônica (DELANO & MOLDAWER, 2006). Esse dado de emagrecimento diante de uma dieta equilibrada fortalece a teoria de que o emagrecimento, neste modelo, está relacionado com a alergia. A dieta alimentar pode afetar o curso de determinadas doenças auto-imunes por meio de dois mecanismos não mutuamente excludentes (PANUSH, 1991). Primeiro, antígenos relacionados

aos alimentos induziriam respostas de hipersensibilidade, levando a sintomas de auto-imunidade. Segundo, fatores nutricionais alterariam respostas inflamatórias e imunológicas e, conseqüentemente, modulariam a evolução de doenças auto-imunes selecionadas. A terapia dietética atual para doenças auto-imunes não é específica e é limitada pela toxicidade das drogas e por recidivas imprevisíveis. Há uma intensa e contínua avaliação de estratégias nutricionais para modular a evolução das doenças auto-imunes. Atualmente, sabe-se que a restrição calórica, a suplementação de ácidos graxos ω -3 e ω -6 e a administração oral de antígenos exercem uma gama de efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores em modelos animais de doenças auto-imune, incluindo aumento significativo na expectativa de vida e diminuição das evidências histológicas de dano tecidual (WAITZBERG, 2000). Os mecanismos que conseguem explicar esta influência nutricional são: prostaglandina na produção de leucotrienos; expressão de genes das citocinas; apoptose das células T e B; danos dos radicais livres à membrana celular. Estas estratégias dietéticas são passos futuros para estudos com alergia alimentar. Perspectivas futuras incluem manipulações dietéticas visando melhorias dos sintomas da alergia, até mesmo o emagrecimento. Até que estudos mais conclusivos estejam disponíveis, os pacientes portadores de doenças auto-imunes devem seguir a conduta dietética de eliminar o antígeno da dieta.

A maneira de comprovarmos que a dieta de ovalbumina, preconizada pela AIN93G, está balanceada é baseada nos animais tolerantes (BALB/c que consomem dieta de ovalbumina antes da sensibilização primária). Esses animais, consumindo o antígeno via oral, antes da sensibilização primária, não emagreceram (Gráfico 9). Cara e colaboradores também mostraram que a aversão à ingestão do antígeno não ocorre quando o animal é tornado tolerante, ou seja, recebe, previamente à sensibilização com ova, solução contendo a mesma proteína (CARA et al., 1994). Nesse trabalho, foi visto que não houve produção de anticorpos anti-ovalbumina, fato que deve ser semelhante ao nosso resultado.

Ao compararmos as linhagens BALB/c e C57BL/6 diante do protocolo de alergia alimentar vimos algumas semelhanças de comportamento mas, também, vimos diferenças. Os animais C57BL/6 não emagrecem diante do protocolo de alergia alimentar proposto (Gráficos 6 e 9). Eles produzem IgE mas não em tanta quantidade como os animais BALB/c (Gráfico 38). Podemos dizer que o emagrecimento está acompanhado do aumento de IgE. A produção de IgE é necessária mas não suficiente. O não emagrecimento dos animais sensibilizados C57BL/6 pode ser explicado pela presença de líquidos nos tecidos dos animais. Quando desidratamos as carcaças vimos que os animais sensibilizados retinham líquidos enquanto que os não sensibilizados não (Gráficos 12 e 13). O edema refere-se à presença de excesso de líquido nos tecidos corporais. O edema ocorre, principalmente, no compartimento de líquido extracelular mas também pode envolver os líquidos intracelulares (GUYTON & HALL, 2002). O que produz o edema intracelular: depressão dos sistemas metabólicos dos tecidos e/ou falta de nutrição adequada das células. O edema intracelular também pode ocorrer em tecidos inflamados pois a inflamação exerce efeito direto sobre as membranas celulares, aumentando sua permeabilidade e permitindo que sódio e outros íons se difundam para o interior das células, com a conseqüente osmose de água para dentro das células. O edema extracelular ocorre por duas causas: extravasamento anormal de líquidos do plasma para os espaços intersticiais pelos capilares e/ou incapacidade dos linfáticos em fazerem o líquido do interstício retornar para o sangue (GUYTON & HALL, 2002). Como houve inflamação, é possível que tenha ocorrido edema intracelular, mas certamente o edema extracelular foi determinante, como também visto por Saldanha e colaboradores (2004) utilizando este mesmo modelo. Diante do dado da carcaça, concluímos que os animais C57BL/6 não perdem peso, pois o mesmo está mascarado com a retenção de líquidos.

A musculatura representa a maior massa tecidual corpórea, correspondente a quase 50% do peso sem gordura. O músculo esquelético estriado é mais

abundante e atua como o principal reservatório de aminoácidos durante períodos de estresse, trauma e balanço negativo. Porém, permanecem limitados os métodos e a quantificação dos músculos em estudos nutricionais. Poderíamos, se fosse possível, ter feito o balanço nitrogenado dos animais, para avaliação do catabolismo protéico. Contudo, não possuímos gaiolas metabólicas que nos permitem coletar a urina por 24 horas. O cálculo exato do balanço nitrogenado exigiria a dosagem do nitrogênio urinário total e do nitrogênio excretado por outras vias. Estudos feitos com traumatizados têm mostrado que o grande consumo protéico é feito à custa do tecido muscular, enquanto que a proteína visceral é poupada. Porém, o oposto pode ser observado na ausência de trauma, no qual as vísceras têm, também, o seu peso reduzido. A perda de proteínas corresponde à perda de função essencial estando intimamente relacionada com a evolução da doença.

O método de Lowry quantifica a proteína da mucosa cecal e do intestino grosso (Gráficos 32 e 33). No ceco, há menor quantidade de proteína nas mucosas dos animais sensibilizados, isto comprova que há uma inflamação local devido ao processo alérgico. No intestino grosso, os animais BALB/c sensibilizados têm maior quantidade de proteína na mucosa, o que sugere que ela esteja intacta. Enquanto isto, os animais da linhagem C57BL/6 possuem uma mucosa bem destruída, ou seja, a inflamação intestinal comprometeu a mucosa. Porém, estes dados não podem ser sugestivos ou conclusivos. Esta metodologia deveria ser repetida pois houve algumas limitações da técnica. Primeiro, os órgãos deveriam estar totalmente limpos para que as fezes não interferissem nos resultados. Isto não ocorreu, uma vez que, é muito difícil retirar todo conteúdo de fezes dos tecidos. No ato da masseração dos órgãos, eles deveriam formar um homogenato líquido sem nenhum resíduo sólido. Ao pipetarmos este homogenato, observamos que o tecido não ficou totalmente líquido. Isto aconteceu devido ao masserador, que não atendeu as necessidades do método.

Os animais não alérgicos têm mais gordura abdominal do que os animais alérgicos. Isto pode ser visto no Gráfico 17, em ambas as linhagens (BALB/c e C57BL/6). Essa perda da gordura é devida ao aumento da taxa de metabolismo. Este acontecimento deve-se à: via endócrino-metabólica, pela atuação dos hormônios e dos substratos; via imunológica, com o envolvimento de células e mediadores (citocinas). A secreção aumentada da tríade hormonal catabólica (glucagon, catecolaminas e glicocorticóides) orienta o metabolismo no sentido catabólico, mediada pelos receptores β , estimulando a gliconeogênese, lipólise, estímulo das células alfa do pâncreas e o catabolismo protéico com ureogênese.

Outro resultado comum de ambas as linhagens é a quantidade de colesterol presente no fígado. Os animais sensibilizados possuem mais colesterol do que os animais não alérgicos (Gráfico 35). Este fato pode ser explicado pela maior mobilização do tecido adiposo. A liberação excessiva de ácidos graxos, visto na diminuição da gordura abdominal de animais sensibilizados, irá sobrecarregar o fígado pois, como não há proteínas suficientes para transportar estes lípidos, eles se acumulam no fígado. A distribuição de tecido gorduroso está associada a fatores de risco como doença coronariana e diabetes. A doença coronária ocorre devido à deposição de gordura na camada íntima da parede arterial, produzindo posteriormente obstrução parcial ou total do lúmen da artéria comprometida. A aterosclerose é uma doença multifatorial, sendo hoje considerados como fatores de risco a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial e o hábito de fumar. Existem, também, outros fatores envolvidos, como obesidade, hipertrigliceridemia, sedentarismo e estresse. Aqui acrescentamos que a alergia pode ser um fator de importante relevância na predisposição à aterosclerose.

Uma vez que os animais alérgicos demonstraram emagrecimento, avaliamos as proteínas séricas totais e não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (Gráfico 41). Entretanto, não existe nenhuma relação constante entre proteínas séricas ou viscerais e as proteínas corpóreas. Então, não podemos

afirmar que não houve catabolismo protéico em algum de nossos grupos experimentais. A determinação das proteínas séricas totais tem significado nutricional controverso pois pode ser pouco sensível e sujeita a resultados falsamente negativos devido à desidratação ou ao aumento das globulinas.

A albumina, proteína circulante do plasma e dos líquidos extracelulares mais abundante, tem importância na determinação da pressão colóido-osmótica do plasma. Ela exerce, também, a função de transporte de substâncias no plasma. A hipoalbuminemia não foi observada no nosso experimento mas isto pode ser explicado pelo fato de que a longa vida média da albumina (18 a 20 dias) e a existência do “pool” extravascular a tornaram um índice pouco sensível às rápidas variações do estado nutricional (Gráfico 40).

Após entrada de antígenos exógenos no organismo, ocorre uma resposta inflamatória celular. A inter-relação entre este processo inflamatório e as alterações metabólicas é mediada pela produção de citocinas. Os mediadores químicos da resposta inflamatória compreendem substâncias de origem celular e plasmática. Dentre os mediadores de natureza lipídica, destacam-se os eicosanóides, formados a partir do metabolismo do ácido araquidônico. Esse, através da via cicloxigenase, dá origem às prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, e, pela via da lipoxigenase, origina os leucotrienos. As prostaciclina atua promovendo vasodilatação, além de ação antagregante plaquetária, enquanto o tromboxano tem ação inversa, causando vasoconstrição e predisposição à agregação plaquetária (KRAUSE et al., 1981; MOREL, 1999; WISE et al., 1980). Os mediadores responsáveis pela produção de citocinas parecem incluir as prostaciclina (PGI_2) e óxido nítrico secretados pelas células endoteliais em resposta ao TNF-alfa e ao IFN-gama secretados por células T e macrófagos em resposta ao antígeno. Sabe-se que o TNF-alfa é uma das citocinas mais importantes no emagrecimento de pacientes com câncer (ESPER & HARB, 2005). Uma vez que também participa ativamente do processo inflamatório, o passo final do trabalho foi avaliar se essa citocina estava

aumentada no plasma de animais alérgicos. Com mostrado na Gráfico 50, não houve diferença na presença de TNF-alfa circulante entre os grupos. Porém, o $P=0,08$ e isto sugere a repetição da técnica com o aumento o número de animais por grupo. Outras citocinas, tais como IL-1, IL6 ou IFN-gama podem estar envolvidas no emagrecimento observado em nosso modelo e devem ser analisadas.

CONCLUSÃO

7- Conclusão

- 1) Quando se administrou o antígeno oral nas formas de solução de clara “in natura”, solução de clara liofilizada e na ração balanceada, houve o emagrecimento dos animais BALB/c sensibilizados com ovalbumina; sendo que, com a dieta os animais perdem maior quantidade de peso. Esses animais produzem IgE, perdem parte da gordura abdominal e possuem maior quantidade de colesterol quando comparados com o seu controle não sensibilizado.
- 2) A mesma administração do antígeno oral nos animais C57BL/6 sensibilizados não causou a perda de peso mas eles perderam gordura abdominal, produziram IgE (não em tanta quantidade quanto os BALB/c sensibilizados), aumentam os lípides hepáticos e são os únicos que retêm líquido em sua carcaça. Esses animais também possuem maior quantidade de colesterol do que o seu controle.
- 3) A dieta de ovalbumina, baseada na AIN93G, está balanceada tendo em vista os animais tolerantes (BALB/c que consomem dieta de ovalbumina antes da sensibilização primária). Esses animais não emagreceram em nenhum momento do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON J.A. *Milk, Eggs and Peanuts: Food allergies in children.* Am Fam Physician, **56**: 1365-1374, 1997.
2. BAE, S. J. Y.; TANAKA, J.; HAKUGAWA, KATAYAMA, I. *Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model.* J.Dermatol.Sci. **21**:1-7, 1999.
3. BISCHOF, R. J.; MEEUSEN, E.N. *Cellular kinetics of an allergic-type response in a sheep mammary gland model of inflammation.* Clin.Exp.Allergy **32**:619-626, 2002.
4. BOCK, S.A. *A critical evaluation of clinical trials in adverse reactions to foods in children.* J. Allergy Clin. Immunol., **78**: 165-74, 1986.
5. BUFE, A. *The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases?* International Archives of Allergy and Immunology, **117**: 215-219, 1998.
6. CARA D.C.; CONDE A.A., VAZ N.M. *Immunological induction of flavor aversion in mice.* Braz J Med Biol Res., Jun; **27**(6):1331-41, 1994.
7. CARA D.C.; CONDE A.A.; VAZ N.M. *Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition.* Scand J Immunol., Jan; **45**(1):16-20, 1997.
8. CERRA, F.B., *Hypermetabolism, organ failure, and metabolic support.* Surgery, **101**:1-14, 1987.

9. CONDE, A.A.; STRANSKY, B.; FARIA, A.M.; VAZ, N.M. *Interruption of recently induced immune responses by oral administration of antigen.* Braz J Med Biol Res, **31**, p.377-80, 1998.
10. CHUNG, Y.; CHANG, S.Y.; KANG, C.Y. *Kinetic analysis of oral tolerance: memory lymphocytes are refractory to oral tolerance.* J Immunol, **163**, p.3692-98, 1999.
11. DAVIS P.J.; WILLIAMNS S.C. *Protein modification by thermal processing.* Allergy; **53 (46 Suppl)**:102-5. Review, 1998.
12. DELANO, M.J.; MOLDAWER, L.L. *The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases.* Nutrition in Clinical Practice, **21**, p.68-81, 2006.
13. DOUGLAS, R.G.; SHAW, J.H.F., *Metabolic response to sepsis and trauma.* Br. J. Surg. **76**:115-22, 1989.
14. ESPER D.H.; HARB W.A. *The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations.* Nutr Clin Pract.; Aug; **20(4)**:369-76. Review, 2005.
15. FARIA, A.M.; WEINER, H.L. *Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications.* Adv Immunol, **73**, p.153-264, 1999.
16. FARIA, A.M.; GARCIA, G.; RIOS, M.J.; MICHALAROS, C.L.; VAZ, N.M. *Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization.* Immunology, **78**, p.147-51, 1993.

17. FARIA, A.M.; FICKER, S.M.; SPEZIALI, E.; MENEZES, J.S.; STRANSKY, B.; SILVA RODRIGUES, V.; VAZ, N.M. *Aging affects oral tolerance inductions but not its maintenance in mice.* Mech Ageing Dev, **102**, p.67-80, 1998.
18. FERRARIS, R. P., VILLENAS, S. A., and DIAMOND, J. *Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine.* Am.J.Physiol **262**:G1047-G1059, 1992.
19. FISHMAN-LOBELL, J., FRIEDMAN, A. & WEINER, H.L. *Different kinetic patterns of cytokine gene expression in vivo in orally tolerant mice.* Eur J Immunol, **24**, p.2720-4, 1994.
20. FOLCH J. *A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.* J. Biol. Chem. **226**:497-509, 1957.
21. FOSTER, P.S., YANG, M., KUMAR, R.K. *CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma.* Lab Invest, **82**(4):455-62, 2002.
22. Franco, G. *Tabela de composição química dos alimentos.* 9ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 1999.
23. FULEIHAN, R.L. *Allergy, immunology, and related disorders.* Curr Opin Pediatr **10**: 581-583, 1998.
24. GALLI S.J., WERSHIL B.K. *The two faces of the mast cell.* Nature, **381**: 21-22, 1996.

25. GARCIA, J.; LASITER, P.S.; BERMUDEZ-RATTONI, F.; DEEMS, D.A. *A general theory of aversion learning*. Ann. N.Y.Acad. Sci., **443**, p.8-21, 1985.
26. GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica*. 10 ed; Philadelphia: W.B. Saunders Company, Traduzido e publicado por Editora Guanabara Koogan S.A., p.260, 2002.
27. HANSON, D.G., VAZ, N.M., MAIA, L.C., HORNBOOK, M.M., LYNCH, J.M. & ROY, C.A. *Inhibition os specific immune responses by feeding protein antigens*. Int Arch Allergy Appl Immunol, **55**, p.526-32, 1977.
28. HANSON, D.G., VAZ, N.M., MAIA, L.C. & LYNCH, J.M. *Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. III. Evidence against maintenance of tolerance to ovalbumin by orally induced antibodies*. J Immunol, **123**, p.2337-43, 1979.
29. HANSON, D.G. *Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns*. J Immunol, **127**, p.1518-24, 1981.
30. HAAS H., FALCONE F.H., HOLLAND M.J., SCHRAMM G., HAISCH K., GIBBS B.F., BUFE A., SCHLAAK M. *Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy*. International Archives of Allergy and Immunology, **119**: 86-94, 1999.
31. HELM R.M., BURKS A.W. *Mechanisms of food allergy*. Current Opinion in Immunology, **12** (6): 647-653, 2000.
32. KAY A. B. *Overview of allergy and allergic diseases: with a view to the future*. British Medical Bulletin, **56**(4): 843-864, 2000.

33. KRAUSE, M.M.; UTSUNONUGA, T.; FENERSTEIN, G. *Prostacyclin reversal of letal endotoxicemic in dogs.* J Clin Invest. p.1118, 1981.
34. LAMONT, J. T. *Mucus: the front line of intestinal mucosal defense.* Ann N Y Acad Sci, **664**: 190-209, 1992.
35. LORENTZ A., BISCHOFF C.S. *Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4.* Immunological Reviews, **179**:57-60, 2001.
36. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J. & RANDALL, R.J. *Protein measurement with Folin phenol reagent.* J. Biol. Chem. **193**: 265-275, 1951.
37. MATTSON, M.P. *Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective.* Annu.Rev. Nutr., **25**: 237-60, 2005.
38. MATYSIAK-BUDNICK, T.; HEYMAN, M. *Food allergy and Helicobater pylori.* J. Pediatric Gastroenterol. And Nutrition, **34**: 5-12, 2002.
39. MAYER, E.A. *The physiology of gastric storage and emptying.* In: Johnson L.R., ed. Physiology of the gastrointestinal tract. 3rd ed. New York: Raven Press, p.929-76, 1994.
40. MELAMED, D., FISHMAN-LOVELL, J., UNI, Z., WEINWE, H.L.; FRIEDMAN, A. *Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin.* Int Immunol, **8**, p.717-24, 1996.
41. MESTECKY, J., RUSSEK, M. W., JACKSON S., BROWN T. A. *The human IgA system: a reassessment.* Clin Immunol Immunopathol, **40**: 105-114, 1986.

42. METCALFE, D.D. *Food allergy*. Prim Care; **25**(4):819-29, 1998.
43. MILLER, S.D. & HANSON, D.G. *Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens.IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin*. J Immunol, **123**, p.2344-50, 1979.
44. MILLER, A.; LIDER, O.; ABRAMSKY, O.; WEINER, H.L. *Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals*. Eur J Immunol, **24**, p.1026-32, 1994.
45. MOREL, D.R. *Role of arachidonic metabolism in ARDS*. In Vicent JL. Springer-Verlag, New York, p115, 1999.
46. MOWAT, A.M.; LAMONT, A.G.; BRUCE, M.G. *A genetically determined lack of oral tolerance to ovalbumin is due to failure of the immune system to respond to intestinally derived tolerogen*. Eur J Immunol, **17**, p.1673-76, 1987.
47. PANUSH, R.S. *Does food cause or cure arthritis?* Rheum Dis Clin N Am, **17**, p.259-272, 1991.
48. PARKER, S., et al. *Foods perceived by adults as causing adverse reactions*. J Am Diet Assoc **93**:40, 1993.
49. PICCINNI M-P; MAGGI E., ROMAGNANI S. *Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects*. Annals of The New York Academy of Sciences, **917**: 844-852, 2000.

50. Plaut, M. *New directions in food allergy research.* J.Allergy Clin.Immunol. **100**:p.7-10, 1997.
51. POMPOSELLI, J.J.;FLORES, E.A. & BISTRAN, B.R. *Role of biochemical mediators in clinical nutrition and surgical metabolism.* JPEN, **12**:212-8, 1988.
52. PROFET, M. *Pregnancy sickness as adaptation: a deterrent to maternal ingestion of teratogens.* In: BARKOW, J.H.; COSMIDES, L.; TOOBY, J. *The adapted Mind.*, New York, Oxford University press, p.327-65, 1992.
53. READ, N.W.; HOUGHTON, L.A. Gastroenterol Clin North Am, **18**, p.359-73, 1989.
54. RICHMAN, L.K., CHILLER, J.M., BROWN, W.R., HANSON, D.G. & VAZ, N.M. *Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins.* J Immunol, **121**, p.2429-34, 1978.
55. SAKLAYEN, M.G.; PESCE, A.J.; POLLAK, V.E.; MICHAEL, J.G. *Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen.* Int Arch Allergy Appl Immunol, **73**, p5-9, 1984.
56. SALDANHA, J.C.S.; GARGIULO, D.L., SILVA, S.S., CARMO-PINTO, F.H., ANDRADE, M .C., ALVAREZ-LEITE, J.I., TEIXEIRA , M.M., CARA, D.C. *A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice.* Braz J Med Biol Res, June **37**(6) 809-816, 2004
57. SAMPSON, H, METCALFE, D. *Primer on allergic and immunologic diseases.* JAMA **268**:2840, 1992.

58. Sampson, H. A. *Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders.* J.Allergy Clin.Immunol. **103**:717-728, 1999.
59. SITGES-SERRA, A. *Nutritional support in trauma patients.* Clin Nutr. **10**: 47-49, 1991.
60. SMARTIN S., MARCOS A., CHANDRA R.K. *Food hypersensitivity.* Nutrition Research, **21**(3): 473-497, 2001.
61. SPRINGER T.A. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.* Cell, **76**: 301-314, 1994.
62. STROBEL, S.; FERGUSON, A. *Immune responses to fed protein antigens in mice. Systemic tolerance or priming is related to age at which antigens is first encountered.* Pediatr Res, **18**, p.588-94, 1984.
63. SZEKANECZ Z., HALLORAN M.M. et al. *Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis.* Arthritis Rheum, **43**: p.1266-1277, 2000.
64. Tepper, R. I., P. K. Pattengale, and P. Leder. *Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo.* Cell **57**:503-512, 1989.
65. TITUS, R.G., & CHILLER, J.M. *Orally induced tolerance. Definition at the cellular level.* Int Arch Allergy Appl Immunol, **65**, p.323-38, 1981.
66. TOBAGUS, I.T.; THOMAS, W.R. HOLT, P.G. *Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period.* J. immunol. **172**, p.2274-85, 2004.

67. VAZ, N.; RIOS, M.J.; LOPES, L.M.; GONTIJO, C.M.; CASTANHEIRA, E.B.; JACQUEMART, F.; ANDRADE, L.A. *Genetics susceptibility to oral tolerance to ovalbumin.* Braz J Med Biol Res, **20**, p.785-90, 1987.
68. WAITZBERG, D.L. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.* 3.ed; São Paulo: Editora Atheneu, p.1286-90, 2000.
69. WASSERMAN, S. I. *Mediators of immediate hypersensitivity.* J.Allergy Clin.Immunol. **72**:101-119, 1983.
70. WISE, W.C.; COOK, J.A., HALISHKA, P.V. *Protective effects of tramboxane synthetase inhibitions in rats in endotoxic shock.* Circ Res, p846-54, 1980.
71. YU L. C. H., PERDUE M. H. *Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress.* Immunological Reviews, **179**: 61-73, 2001.

