

Maria Letícia Costa Reis

**Efeito do tratamento com selênio
orgânico, vitamina E e aminoguanidina na
alergia alimentar induzida em
camundongos**

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte**

2007

Maria Letícia Costa Reis

**Efeito do tratamento com selênio
orgânico, vitamina E e aminoguanidina na
alergia alimentar induzida em
camundongos**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Patologia da Faculdade de
Medicina da Universidade
Federal de Minas Gerais como
requisito para obtenção do
título de Mestre.

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

Departamento de Patologia Geral - ICB - UFMG

Co-Orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Departamento de Microbiologia - ICB - UFMG

Belo Horizonte

2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuro Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Contamos com apoio financeiro do CNPq e da FAPEMIG.

“Viva como se fosse morrer amanhã, e aprenda como se fosse viver para sempre”.

Gandhi

Dedico este trabalho à minha família por ter me apoiado e me incentivado, possibilitando que eu chegasse até aqui. Em especial à Ana Elisa, minha irmã, pelo apoio, amizade e por estar sempre presente.

AGRADECIMENTOS

À Denise, por ter aberto essa porta na minha vida e ter me orientado com tanta dedicação. Agradeço também pela amizade, compreensão, apóio e ótimo convívio.

À Janaína, pelos ensinamentos, pela paciência de Jó e disposição para ajudar a qualquer hora.

À Luana, Cláudia, Maria, Frank, Paloma, Vinícius e Thales pelas ajudas nos experimentos e pelo companheirismo no NIPE.

À Camila e ao Weverton pela amizade, companheirismo e pelos momentos descontraídos no Lab.

Aos colegas do laboratório: Wanderson, Marta, Mirna, Felipe, Eliane, Vanessa, Ferdinan, Everton, Mariana, Guilherme, Carol, Sílvia, pelo coleguismo.

Ao professor Wagner e à professora Rosa, pelo ótimo convívio.

À professora Jaqueline Alvarez e ao professor Jacques Nicoli por terem aberto seus laboratórios para realização de parte dos meus experimentos.

Ao professor Fernando Cunha pelas dosagens de NOS.

À Ana Cristina e Luciana pela ajuda na dosagem de nitrito.

Ao Flávio e a Daniele pela ajuda nos experimentos de translocação bacteriana.

À Olinda, Vânia e Jaqueline pela disposição em ajudar sempre.

A todos os colegas da Patologia Geral.

À Universidade Federal de Minas Gerais por ter complementado meus conhecimentos científicos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
ALERGIA ALIMENTAR E SISTEMA IMUNE.....	15
ESTRESSE OXIDATIVO, LESÕES INTESTINAIS E ANTIOXIDANTES.....	21
OBJETIVOS.....	25
OBJETIVO GERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
1. ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
2. VERMIFUGAÇÃO.....	27
3. INDUÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR.....	27
4. SUPLEMENTAÇÕES.....	28
5. AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	28
6. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO.....	28
7. OBTENÇÃO DO SORO TOTAL.....	29
8. AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	29
9. DOSAGEM DOS ANTICORPOS IgG1 ANTI-OVALBUMINA.....	29
10. DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICO ANTI-OVALBUMINA.....	30
11. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NITRITO + NITRATO NO SORO (NOX).....	31
12. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA ALERGIA.....	31
12.1 Avaliação da presença de muco intestinal.....	32
12.2 Avaliação do número de eosinófilos.....	32
13. AVALIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO INTESTINO.....	33
14. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS).....	33
15. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
1- RESULTADOS.....	36
1. AVALIAÇÃO DA iNOS, cNOS E NOS TOTAL NA MUCOSA INTESTINAL.....	36
2. AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE NITRITO NO SORO.....	38
3. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	39
4. AVALIAÇÃO DA iNOS NA MUCOSA INTESTINAL.....	41
2 - RESULTADOS.....	42
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E (VIT E) (1000 MG/ KG DIETA).....	42
5. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO.....	42
6. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO.....	43
7. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS DOS ISOTIPOS IgE E IgG1.....	43
8. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO PELAS CÉLULAS CALICIFORMES DO INTESTINO DELGADO.....	45
9. AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE EOSINÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO.....	48
10. AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO.....	50

3 - RESULTADOS	52
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E (VIT E 500 MG/KG DE DIETA).....	52
11. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO.....	52
12. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS DOS ISOTIPOS IgE.....	53
13. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO PELAS CÉLULAS CALICIFORMES DO INTESTINO DELGADO	54
14. AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE EOSINÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO..	56
15. AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO.....	59
4 - RESULTADOS	60
SUPLEMENTAÇÃO COM SELÊNIO ORGÂNICO (SE).....	60
16. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO.....	60
17. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO	61
18. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS DOS ISOTIPOS IgE E IgG1	62
19. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO PELAS CÉLULAS CALICIFORMES DO INTESTINO DELGADO	63
20. AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE EOSINÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO..	66
21. AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO.....	69
5 - RESULTADOS	70
TRATAMENTO COM AMINO Guanidina (AG).....	70
22. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO.....	70
23. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO	71
24. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS DOS ISOTIPOS IgE E IgG1	71
25. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO PELAS CÉLULAS CALICIFORMES DO INTESTINO DELGADO	73
26. AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE EOSINÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO..	75
27. AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO.....	77
6 - RESULTADOS	79
TODAS AS SUPLEMENTAÇÕES (TS) JUNTAS.....	79
28. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO.....	79
29. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO	80
30. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS DOS ISOTIPOS IgE E IgG1	80
31. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO PELAS CÉLULAS CALICIFORMES DO INTESTINO DELGADO	82
32. AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE EOSINÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO..	85
33. AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA MUCOSA DO INTESTINO DELGADO.....	87
7 - RESULTADOS	90
AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS DA ALERGIA ALIMENTAR EM ANIMAIS DA LINHAGEM SWISS	90
34. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO.....	90
35. AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS DOS ISOTIPOS IgE E IgG1	91
36. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO PELAS CÉLULAS CALICIFORMES DO INTESTINO DELGADO	92

37. AVALIAÇÃO DO PESO DA GORDURA ABDOMINAL.....	95
DISCUSSÃO	96
SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÕES	101
BIBLIOGRAFIA	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: AVALIAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (INOS)	36
FIGURA 2: AVALIAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CONSTITUTIVA (cNOS)	37
FIGURA 3: AVALIAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE TOTAL	37
FIGURA 4: AVALIAÇÃO DE NITRITO	38
FIGURA 5: AVALIAÇÃO DA TRASLOCAÇÃO BACTERIANA.....	40
FIGURA 6: AVALIAÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA	41
FIGURA 7: AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (VIT E; 1000 MG)	42
FIGURA 8: AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO (VIT E; 1000 MG).....	43
FIGURA 9: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (VIT E; 1000 MG).....	44
FIGURA 10: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G1 (VIT E; 1000 MG).....	44
FIGURA 11: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO DUODENO (VIT E; 1000 MG).....	45
FIGURA 12: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO PROXIMAL (VIT E; 1000 MG).....	46
FIGURA 13: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO DISTAL (VIT E; 1000 MG).....	46
FIGURA 14: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO ÍLEO (VIT E; 1000 MG).....	47
FIGURA 15: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO DUODENO (VIT E; 1000 MG)	48
FIGURA 16: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO PROXIMAL (VIT E; 1000 MG).....	49
FIGURA 17: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO DISTAL (VIT E; 1000 MG)	49
FIGURA 18: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO ÍLEO (VIT E; 1000 MG)	50
FIGURA 19: AVALIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE NO JEJUNO PROXIMAL (VIT E; 1000 MG) ..	51
FIGURA 20: AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (VIT E; 500 MG)	52
FIGURA 21: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (VIT E; 500 MG)	53
FIGURA 22: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO DUODENO (VIT E; 500 MG).....	54
FIGURA 23: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO PROXIMAL (VIT E; 500 MG) ..	55
FIGURA 24: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO DISTAL (VIT E; 500 MG).....	55
FIGURA 25: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO ÍLEO (VIT E; 500 MG).....	56
FIGURA 26: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO DUODENO (VIT E; 500 MG)	57
FIGURA 27: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO PROXIMAL (VIT E; 500 MG).....	57
FIGURA 28: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO DISTAL (VIT E; 500 MG)	58
FIGURA 29: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO ÍLEO (VIT E; 500 MG)	58
FIGURA 30: AVALIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE NO JEJUNO PROXIMAL (VIT E; 500 MG)	59
FIGURA 31: AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (SE)	60
FIGURA 32: AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO (SE)	61
FIGURA 33: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (SE)	62
FIGURA 34: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G1 (SE).....	63
FIGURA 35: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO DUODENO (SE).....	64
FIGURA 36: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO PROXIMAL (SE)	64
FIGURA 37: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO DISTAL (SE)	65
FIGURA 38: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO ÍLEO (SE).....	65
FIGURA 39: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO DUODENO (SE)	67
FIGURA 40: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO PROXIMAL (SE).....	67
FIGURA 41: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO DISTAL (SE)	68
FIGURA 42: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO ÍLEO (SE)	68
FIGURA 43: AVALIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE NO JEJUNO PROXIMAL (SE)	69
FIGURA 44: AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (AG)	70
FIGURA 45: AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (AG)	71
FIGURA 46: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (AG)	72

FIGURA 47: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G1 (AG)	72
FIGURA 48: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO DUODENO (AG)	73
FIGURA 49: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO PROXIMAL (AG)	74
FIGURA 50: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO DISTAL (AG)	74
FIGURA 51: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO ÍLEO (AG)	75
FIGURA 52: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO PROXIMAL (AG)	76
FIGURA 53: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO DISTAL (AG)	76
FIGURA 54: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO ÍLEO (AG)	77
FIGURA 55: AVALIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE NO JEJUNO PROXIMAL (AG)	78
FIGURA 56: AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (TS)	79
FIGURA 57: AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO (TS)	80
FIGURA 58: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (TS)	81
FIGURA 59: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G1 (TS)	81
FIGURA 60: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO DUODENO (TS)	82
FIGURA 61: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO PROXIMAL (TS)	83
FIGURA 62: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO DISTAL (TS)	83
FIGURA 63: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO ÍLEO (TS)	84
FIGURA 64: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO PROXIMAL (TS)	85
FIGURA 65: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO JEJUNO DISTAL (TS)	86
FIGURA 66: AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS NO ÍLEO (TS)	86
FIGURA 67: AVALIAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE NO JEJUNO PROXIMAL (TS)	87
FIGURA 69 : AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO (SWISS)	90
FIGURA 70: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA E (SWISS)	91
FIGURA 71: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G1 (SWISS)	92
FIGURA 72: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO DUODENO (SWISS)	93
FIGURA 73: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO PROXIMAL (SWISS)	93
FIGURA 74: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO JEJUNO DISTAL (SWISS)	94
FIGURA 75: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MUCO NO ÍLEO (SWISS)	94
FIGURA 76: AVALIAÇÃO DO PESO DA GORDURA ABDOMINAL (SWISS)	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Ig = Imunoglobulina
Th = Células T auxiliar
PAF = Fator ativador de plaquetas
VCAM = *Vascular cell adhesion molecule*
MHC = molécula de histocompatibilidade principal
IL = Interleucina
PGD₂ = Prostaglandina D₂
IFN- γ = interferon-gama
SCF = *stem cell factor*
ELISA = Imuno ensaio enzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
NO = Óxido nítrico
NOS = Óxido nítrico sintase
iNOS = Óxido nítrico sintase induzida
cNOS = Óxido nítrico sintase constitutiva
tNOS = Óxido nítrico sintase total
ROS = Espécies de oxigênio reativo
OVA = Ovalbumina
GSH = glutationa peroxidase
TB = Translocação bacteriana
LPS = lipopolissacarídes
AIN 93 = American Institute of Nutrition
mg = miligramas
g = gramas
kg = Kilo
 μm^2 = micrômetros quadrados
UFC = Unidades formadoras de colônias
U.A. = Unidades arbitrárias
PAS = Ácido periódico de Schiff
MPO = Mieloperoxidase
Log = Logarítmo
Vit E =Vitamina E

Se = Selênio

AG = Aminoguanidina

TS = Todas as suplementações juntas

RESUMO

A incidência de doenças alérgicas tem aumentado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata mediada por IgE que ocorre após a ingestão de determinados alimentos por indivíduos previamente sensibilizados. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo animal para o estudo da alergia alimentar à ovalbumina. Neste modelo, os camundongos são sensibilizados com ovalbumina (OVA) e desafiados com uma solução de clara de ovo a 20% (SCO). Um dos sintomas apresentados pelos camundongos BALB/c no nosso modelo de alergia alimentar é a perda de peso corpóreo após o desafio oral que persiste enquanto durar a ingestão do antígeno. Este emagrecimento não foi associado a um menor consumo líquido, nem a um menor consumo de ração. Macrófagos provenientes dos animais alérgicos produzem mais óxido nítrico que os animais normais. Foi observado também que animais alérgicos apresentam maior infiltrado eosinofílico no intestino delgado. No presente trabalho foi demonstrado que os animais alérgicos, que foram suplementados com selênio orgânico, vitamina E e todas as suplementações juntas, perderam peso corpóreo na primeira semana de desafio oral. A partir da segunda semana de desafio, esses animais recuperaram o peso corpóreo, sendo a recuperação do grupo suplementado com vitamina E, a mais expressiva. Além disso, os animais alérgicos expressaram mais iNOS no intestino, e quando foram suplementados com vitamina E a expressão dessa enzima foi semelhante à dos animais controles. Os animais alérgicos apresentaram um grande infiltrado de eosinófilos no intestino delgado e a vitamina E teve participação na diminuição do infiltrado. Esses resultados demonstram que a vitamina E apresenta efeitos positivos na alergia alimentar experimental. Os mecanismos pelos quais ela age devem ser investigados.

INTRODUÇÃO

Alergia Alimentar e Sistema Imune

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).

A alergia é caracterizada por um aumento na capacidade de linfócitos B 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 hiperatividade imunológica e a uma inflamação alérgica (BUFE, 1998). Esses antígenos são considerados inócuos, mas capazes de induzir quadros patológicos em indivíduos sensibilizados.

Os antígenos que provocam as reações alérgicas, também chamados de alérgenos, são em geral substâncias químicas e proteínas ambientais comuns. A maioria dos indivíduos em contato com esses antígenos não produz IgE específica nem desenvolve reações potencialmente lesivas, mas essas reações se desenvolvem em pessoas geneticamente susceptíveis (ABBAS, 2005).

A propensão à produção de IgE sofre influência de vários genes hereditários. Provavelmente, mais de 20 genes estão envolvidos no desenvolvimento de doenças alérgicas (LEUNG, 1998). Níveis exageradamente elevados de IgE e atopia associada são comuns em algumas famílias. A atopia é uma predisposição genética de certos indivíduos para a síntese inapropriada de IgE específica para componentes protéicos. Estudos familiares demonstraram transmissão autossômica nítida da atopia, embora o padrão completo de herança seja provavelmente poligênico. Vários estudos já identificaram genes candidatos ou *loci* que podem estar envolvidos na alergia. Um desses *loci* para a atopia está no cromossomo 5q, próximo ao sítio do aglomerado de genes que codifica as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e o receptor de IL-4. Essa região é de grande interesse por causa da conexão entre vários genes aí localizados e os mecanismos de regulação de IgE, bem como com o crescimento e diferenciação de mastócitos e eosinófilos (XU et al., 2000). Em um estudo sobre a genética da atopia em crianças, foi concluído que algumas variantes nos genes codificantes da IL-4, IL-13 e do receptor alfa da IL-4

desempenham importante papel no controle de respostas a alérgenos mediadas por IgE (LIU et al, 2004).

Estima-se que por volta de 1-2% da população e mais de 8% das crianças sofrem de algum tipo de alergia alimentar mediada por IgE (imunoglobulina E). A alergia alimentar está incluída entre as alergias mais comuns em crianças (HELM e BURKS, 2000).

Os principais alimentos que têm sido citados como causadores de alergias alimentares são: leite, ovos, amendoim, castanhas, camarão, frutos do mar e soja (BOCK, 1986; METCALFE, 1998). Sendo que, alergias a ovos e leite de vaca são observadas com maior frequência em crianças, enquanto frutos do mar e amendoim são as causas mais comuns de alergia em adultos (SEIBOLD, 2005). Os alimentos que causam reações imunológicas têm macromoléculas com propriedades comuns: baixo peso molecular, glicosilação e alta solubilidade em fluidos corporais. Essas características estruturais provavelmente protegem os antígenos da desnaturação e da degradação no trato gastrointestinal e permitem sua absorção intacta. Entretanto, não se sabe porque alguns alimentos são mais alergênicos que outros (ABBAS, 2005; BRADLEY, 1997).

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.

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

O intestino é a principal via de entrada de antígenos no corpo e os linfócitos 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 gastrointestinal contém uma variedade de substâncias nocivas, incluindo antígenos e agentes químicos ingeridos com os alimentos, 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 gastrointestinal contém um grande número de células imunocompetentes, incluindo mastócitos, neutrófilos e eosinófilos.

Os mastócitos são células altamente especializadas e são residentes proeminentes dos tecidos mucosos e epiteliais. Eles são ativados quando os antígenos fazem ligações cruzadas com a IgE ligada em seus receptores específicos de membrana. A degranulação ocorre em segundos, liberando uma série de mediadores inflamatórios pré-formados. Entre eles estão a histamina, uma amina vasoativa de vida curta que produz um aumento imediato do fluxo sanguíneo local e permeabilidade vascular, e as enzimas como a quimase, triptase e esterases de serina. Essas enzimas podem ativar as metaloproteinases de matriz, causando destruição tecidual. No momento da ativação, os mastócitos sintetizam e liberam quimiocinas, mediadores lipídicos tal como fator ativador das plaquetas (PAF), além de outras citocinas. Esses mediadores contribuem para as respostas inflamatórias crônicas e agudas. Os mediadores lipídicos, em particular, atuam rapidamente causando contração do músculo liso, aumento da permeabilidade vascular e secreção de muco, induzindo também a ativação e o influxo de leucócitos que contribuem para a resposta tardia (JANEWAY, 2002). 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).

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 à circulação sanguínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa digestiva e passam a residir na *lâmina própria* onde irão secretar mais IgA (HELM & BURKS, 2000).

Essas barreiras são muito efetivas. Normalmente a entrada de proteínas da dieta causa um fenômeno chamado Tolerância Oral, no qual, mesmo sendo posteriormente sensibilizado, não ocorre formação de anticorpos, especialmente IgE.

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 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 4 (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 com o 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 (ANDERSON, 1997; FULEIHAN, 1998). Além disso, estes sintomas refletem as quantidades de anticorpos IgA e IgG capazes de neutralizar o antígeno antes que este possa se ligar nas moléculas de IgE na superfície dos mastócitos (FINKELMAN *et al*, 2005).

As 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). Os eosinófilos são leucócitos granulócitos derivados da medula óssea, assim chamados em razão de seus grânulos, que contêm proteínas básicas ricas em arginina, por se corarem de laranja brilhante pelo corante ácido eosina. Somente um pequeno número dessas células é encontrado normalmente na circulação; a maioria dos eosinófilos é encontrada nos tecidos, especialmente no tecido conjuntivo imediatamente abaixo do epitélio respiratório, intestinal e urogenital, implicando um papel provável dessas células na defesa contra organismos invasores. Os eosinófilos têm dois tipos de funções efetoras. Primeiro liberam proteínas altamente tóxicas e radicais livres dos grânulos, que podem matar microrganismos e parasitas, mas também produzir lesão tecidual significativa nas reações alérgicas. Segundo, eles produzem moléculas como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, que amplificam a resposta inflamatória recrutando e ativando mais eosinófilos. A ativação e a degranulação dos eosinófilos é rigorosamente regulada. O primeiro nível de controle regula a produção de eosinófilos pela medula óssea, que é baixo na ausência de infecções ou outro estímulo imune. Mas quando as células Th2 são ativadas, citocinas como a IL-5 são liberadas, aumentando a produção de eosinófilos na medula óssea e promovendo sua liberação na circulação. Um segundo nível de controle regula a migração dos eosinófilos, da circulação para os tecidos. As moléculas-chave nessa resposta são as quimiocinas CC. As quimiotaxinas que promovem a migração dos eosinófilos são as eotaxina 1 e eotaxina 2 (JANEWAY, 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 e 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, disfonia 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 superprodução de citocinas como IL-4, do repertório 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 da linhagem BALB/c recebem uma injeção contendo o 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 à 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 (SALDANHA *et al.*, 2004).

Moreira 2006, em seu trabalho de mestrado, avaliou se a perda de peso corpóreo dos animais alérgicos era de origem nutricional, uma vez que eles consumiam ração comercial e uma solução de clara de ovo, ou seja, uma dieta desbalanceada. A partir de então a solução de clara de ovo foi substituída por uma dieta balanceada à base da proteína ovalbumina. Concluiu-se que os animais continuavam a emagrecer, mostrando que a perda de peso corpóreo não era de origem nutricional (MOREIRA, 2006).

O modelo de alergia alimentar foi estudado em outra linhagem, a C57/BL6. Os animais alérgicos dessa linhagem apresentaram uma resposta diferente da dos animais BALB/c. O grupo sensibilizado da linhagem C57/BL6 produziu uma quantidade significativamente menor de IgE quando comparado com o grupo alérgico da linhagem BALB/c e não perderam peso corpóreo quando comparados com seu grupo controle. Foi verificado, porém, através da desidratação das carcaças desses animais, que eles retinham líquido corpóreo, o que mascarava a perda de peso. A perda de gordura abdominal, dos animais alérgicos das duas linhagens, foi

semelhante, reforçando que a não perda de peso dos C57/BL6 era realmente mascarada por retenção de líquido (MOREIRA, 2006).

Estresse Oxidativo, Lesões Intestinais e Antioxidantes

Saldanha et al 2004, demonstraram que macrófagos provenientes do peritônio de camundongos alérgicos produzem quantidade exacerbada de óxido nítrico quando comparados com animais normais (SALDANHA, 2002).

O óxido nítrico (NO) é um oxidante altamente reativo e de meia vida curta. Este é produzido pela óxido nítrico sintetase constitutiva (cNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), a partir da L-arginina (NATHAN e XIE, 1994). Sob condições de produção exacerbada, como no processo inflamatório, pode provocar danos teciduais através da reação com superóxidos para formar peróxido-nitrito (BURGNER et al., 1998; GAUT et al., 2002). Durante a inflamação, a maioria de NO é gerada pelas células inflamatórias, como os neutrófilos e macrófagos (MONCADA et al., 1991).

Óxido nítrico e radicais livres estão intimamente relacionados com um processo bastante estudado, que é o de isquemia/reperfusão. Esse processo gera lesões teciduais. O grau da lesão é dependente da extensão do fluxo sanguíneo arterial, da circulação colateral e da duração da isquemia, bem como do influxo de neutrófilos e geração de radicais livres durante a reperfusão, o que exacerba o dano (WILLERSON,1997). Um radical livre é uma molécula com um elétron desemparelhado sendo, conseqüentemente, uma molécula instável, altamente reativa e citotóxica.

Biennu e Granger 1993, compararam os eventos bioquímicos ocorridos durante a reperfusão de tecidos isquêmicos aos de uma resposta inflamatória aguda, que podem resultar em trombose, edema e necrose tecidual (.BIENVENU E GRANGER, 1993).

Uma variedade de mecanismos pode ser responsável pelos danos causados pela reperfusão: a geração de radicais livres de oxigênio, perda de enzimas antioxidantes, grande infiltrado de neutrófilos, edema tecidual, dentre outros (HUDSON,1994).

É controverso se o processo de isquemia/reperfusão leva a um aumento ou diminuição da liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. O mecanismo pelo qual o NO exerce efeito benéfico ou prejudicial permanece obscuro. Pouco se sabe sobre NO e ROS no processo alérgico. É possível que a inflamação gerada no nosso modelo de alergia alimentar esteja gerando dano na mucosa intestinal assim como acontece na isquemia/reperfusão.

Alguns estudos têm mostrado que a aminoguanidina (AG) diminui a produção de NO produzida pelas células inflamatórias. Essa substância é um potente inibidor específico de iNOS (HABIB et al., 1997). Um pré-tratamento com aminoguanidina reduziu de forma efetiva o influxo de eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos em lavado pulmonar de animais sensibilizados com OVA (TULIC,2000). AG reduziu também danos teciduais causados por colite experimental (NAKAMURA et al., 1999).

As defesas antioxidantes protegem os tecidos e líquidos corpóreos das lesões causadas pelos oxidantes produzidos pelo metabolismo normal ou pela resposta à inflamação e às doenças (SALVEMINI et al., 1996). Dentre os vários tipos de antioxidantes podemos citar o selênio e a vitamina E.

O interesse no selênio concentrou-se primeiramente na sua toxicidade, porque foi identificado um envenenamento por selênio em animais que pastavam em terras com altos níveis deste elemento. No final da década de 50, foi identificado um papel positivo na proteção contra necrose de fígado de ratos deficientes em vitamina E. Em 1973, descobriu-se que a glutathiona peroxidase (GSH-px) era uma selenoenzima e foi considerada a principal forma de selênio ativo nos tecidos. O selênio está presente no organismo como seleno-metionina e seleno-cisteína. Os níveis teciduais são influenciados pela ingestão dietética e refletem o ambiente geoquímico. A absorção ocorre na porção superior do intestino delgado e é mais eficiente quando o animal está deficiente. Os alimentos reconhecidos como as principais fontes de selênio são: nozes brasileiras, frutos do mar, rim, fígado e carne bovina e de aves, enquanto as frutas e verduras são fontes pobres nesse mineral (KRAUSE, 1998). É encontrado sob a forma inorgânica (selenito ou selenato) e orgânica (seleno-aminoácidos). A forma orgânica é mais facilmente assimilada pelo organismo em comparação à inorgânica, o que pode ser confirmado pelo elevado nível de selênio observado em órgãos de camundongos após suplementação com selênio orgânico em comparação ao inorgânico (MUSIK et al,1999; MUSIK et al,

2002) . O selênio está envolvido em várias funções fisiológicas. Possui efeito antioxidante e atua como modulador do sistema imune. É o maior constituinte da enzima glutathiona peroxidase (HALLIWELL e MICHIELS, 2000). Esta enzima pode reduzir oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), diminuindo a propagação de radicais livres e espécies de oxigênio reativo. Além disso, reduz hidroperóxidos intermediários da ciclo-oxigenase e lipooxigenase diminuindo a produção de leucotrienos e prostaglandinas inflamatórias. (BULGER e MAIER, 2001; PARNHAM e GRAF, 1987)

Öztürk et al. 2002, demonstraram em modelo experimental de isquemia/reperfusão intestinal que, no epitélio da mucosa existe uma maior produção de espécies de oxigênio reativo que estão relacionados com lesão na mucosa. Essa lesão favorece translocação bacteriana (TB) e quando esses animais são pré-tratados com selênio, a translocação bacteriana não ocorre, mostrando o efeito benéfico desse mineral na restauração da integridade da mucosa intestinal. Uma das maneiras viáveis para verificar se ocorre translocação bacteriana no modelo de alergia alimentar, seria a utilização de animais isentos de germes, que estão disponíveis na linhagem Swiss.

A translocação bacteriana é a passagem de bactérias indígenas viáveis para locais estéreis do corpo, tais como os linfonodos mesentéricos, baço, fígado e/ou corrente sanguínea, após danos na barreira mucosa, que podem acontecer por diversos fatores. A translocação bacteriana do intestino para outros órgãos, pode acontecer por causa de uma proliferação descontrolada de bactérias intestinais ou por causa da quebra da integridade da barreira mucosa intestinal (ÖZTÜRK et al, 2002).

O selênio e a vitamina E atuam em sinergismo, visto que protegem as membranas celulares contra a degeneração oxidativa. Enquanto a vitamina E age como um antioxidante lipossolúvel nas membranas, a glutathiona peroxidase destrói os peróxidos antes que eles possam causar danos oxidativos (MCDOWELL, 1999).

Khanduja et al. 2005, demonstraram que ocorreu uma significativa redução de NO produzido por macrófagos alveolares estimulados com lipopolissacarídes (LPS), quando os animais foram suplementados com vitamina E (KHANDUJA et al 2005).

A vitamina E (tocoferol) é uma vitamina lipossolúvel, encontrada em grandes quantidades nos óleos vegetais e sementes oleaginosas. Entre os óleos vegetais, destacam-se os ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como é o caso do óleo de

soja (OLIVEIRA et al, 2005). Esta vitamina foi primeiramente descoberta em 1922, quando se observou que anormalidades reprodutivas em ratos alimentados com uma dieta básica eram corrigidas por uma substância isolada de óleos vegetais. Em 1938 uma fração quimicamente pura foi isolada e identificada como tocoferol (*tokos* significa parto e *phero* significa dar à luz) (KRAUSE, 1998).

A Vitamina E é considerada o antioxidante mais importante na defesa contra a peroxidação lipídica que ocorre na membrana celular de mamíferos (NACHBAR e KORTING, 1995). Recentemente tem sido reconhecida como um imunomodulador. Zheng et al. 1999, provaram que uma dieta suplementada com vitamina E suprime reações alérgicas das vias aéreas por diminuir a produção de IL-5. Essa vitamina também reduz a migração transendotelial de neutrófilos, diminuindo a inflamação alérgica das vias aéreas induzida por endotoxinas (ZHENG et al., 1999; ROCKSÉN et al., 2002).

Nosso trabalho parte da hipótese de que o processo inflamatório que ocorre nos animais alérgicos esteja produzindo um estresse oxidativo (geração de radicais livres e NO) que pode gerar danos e lesões teciduais assim como ocorre em outros modelos. Essa possível lesão poderia levar à translocação de bactérias do intestino para outros órgãos causando o emagrecimento nesses animais. Partimos então para investigar o estresse oxidativo e o papel de antioxidantes, como a vitamina E e o selênio orgânico e aminoguanidina, na alergia alimentar induzida em camundongos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito de selênio orgânico, vitamina E e aminoguanidina na alergia alimentar induzida em camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de selênio orgânico, vitamina E e aminoguanidina nos seguintes parâmetros encontrados em camundongos BALB/c com alergia:
 1. diminuição do peso corporal;
 2. diminuição do consumo de ração;
 3. aumento dos níveis séricos de IgE e IgG1 anti-ovalbumina;
 4. aumento do infiltrado de neutrófilos e eosinófilos na mucosa intestinal;
 5. aumento na produção de muco.
- Avaliar se ocorre no modelo da alergia alimentar:
 1. aumento da ativação da NOS na mucosa intestinal;
 2. translocação bacteriana do intestino para linfonodos mesentéricos, fígado e baço;
 3. geração de nitrito.
- Avaliar alguns parâmetros da alergia alimentar em camundongos da linhagem SWISS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais e desenho experimental

Foram utilizados camundongos fêmeas, jovens (de 5 a 7 semanas de idade), da linhagens BALB/c e SWISS, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos durante todo o experimento no Biotério do Departamento de Patologia Geral em estantes ventiladas (ALESCO). 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 120/05.

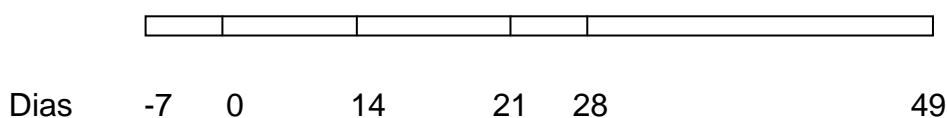
Desenho Experimental Animais da linhagem BALB/c

Grupos	Grupos	Dietas
A	Controle	Ração balanceada (RB)
B	Alérgico	Ração balanceada
C	Controle	Ração balanceada + Selênio (Se)
D	Alérgico	Ração balanceada + Se
E	Controle	Ração balanceada + Vitamina E (Vit E 1000 mg)
F	Alérgico	Ração balanceada + Vit E (1000 mg)
G	Controle	Ração balanceada + Vitamina E (Vit E 500 mg)
H	Alérgico	Ração balanceada + Vit E (500 mg)
I	Controle	Ração balanceada + Aminoguanidina (AG)
J	Alérgico	Ração balanceada + AG
K	Controle	Ração balanceada + Todas as suplementações (TS)
L	Alérgico	Ração Balanceada + TS

Animais da linhagem Swiss

Grupos	Grupos	Dietas
M	Controle	Ração balanceada
N	Alérgico 1	Ração Balanceada
O	Alérgico 2	Ração Balanceada Autoclavada

O diagrama abaixo representa o tempo das principais etapas dos experimentos:



Dia -7 – Início da vermifugação e das suplementações.

Dia 0 – Início do experimento - Imunização primária.

Dia 14 – Imunização secundária.

Dia 21 – Desafio: com troca da ração balanceada (Caseína) para ração balanceada (Ovalbumina).

Dia 28 – Sacrifício (1 semana após desafio)

Dia 49 – Sacrifício dos animais restantes (4 semanas após desafio)

2. Vermifugação

Todos os animais passaram pelo protocolo de vermifugação na semana anterior ao início dos experimentos. Foram diluídos 0,4 mL de Ivermectina em 500 mL de água e esta solução foi administrada na mamadeira dos animais durante 7 dias consecutivos. As gaiolas foram higienizadas a cada 3 dias.

3. Indução da alergia alimentar

A indução da alergia alimentar foi feita através de injeção de OVA (10 µg) adsorvida em Hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] (1 mg) e salina via sub-cutânea no dorso (dia 0). Os animais receberam uma segunda sensibilização 14 dias depois como reforço (dia 14). A partir do sétimo dia após a sensibilização secundária (dia

21), os animais receberam uma ração balanceada à base de ovalbumina (OVA) a 14%. Os animais dos grupos controles passaram pelo mesmo procedimento de sensibilização que os animais alérgicos, porém não receberam OVA.

4. Suplementações

No início do experimento, dia 0, todos os animais receberam uma dieta balanceada AIN93, à base de caseína até o dia do desafio. No desafio (dia 21) a dieta foi substituída por uma à base de ovalbumina (contendo OVA como antígeno).

As suplementações foram da seguinte forma:

Os grupos A e B não foram suplementados;

Os grupos C e D foram suplementados com selênio orgânico (Selplex^R) na proporção de 5g do Selplex^R por Kg de dieta;

Os grupos E e F foram suplementados com vitamina E, sendo 1000 mg vitamina E por Kg de dieta;

Os grupos G e H foram suplementados com vitamina E, sendo 500 mg vitamina E por Kg de dieta;

Os grupos I e J foram tratados com aminoguanidina, sendo 2,5g de aminoguanidina por Kg de dieta;

Os grupos K e L foram suplementados com selênio, vitamina E (1000 mg/ kg de dieta) e aminoguanidina nas quantidades citadas a cima;

Os grupos M, N e O não foram suplementados;

5. Avaliação do peso corporal

O peso corporal dos animais foi avaliado individualmente uma vez por semana, desde o início do experimento (dia 0) até o final (dia 28 ou 49).

6. Avaliação do consumo de ração

O consumo de ração foi avaliado através do peso diário desta. Uma possível perda no fundo da gaiola não foi computada.

7. Obtenção do soro total

Para realizar a sangria, os animais foram previamente anestesiados com xilasina e ketamina na concentração de 25,2% de cada anestésico em 49,6% de salina fisiológica por animal.

A sangria foi feita através dos vasos axilares. Após coagulação do sangue coletado, este foi centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos. O soro total foi retirado e congelado a -20° C para posterior análise da concentração de anticorpos e óxido nítrico.

8. Avaliação da translocação microbiológica

Linfonodos mesentéricos, fígado e baço de cada animal sacrificado foram removidos assepticamente, pesados, e homogeneizados. Os homogenatos foram diluídos dez vezes e usados para cultura e contagem bacteriana em placa contendo ágar MacConkey. As placas foram incubadas uma noite a 37^o C antes da contagem das colônias de bactérias. A translocação bacteriana foi considerada positiva para valores maiores que 10² cfu/g de tecido para fígado e baço e 10³ cfu/g de tecido para linfonodos mesentéricos.

9. Dosagem dos anticorpos IgG1 anti-OVALBUMINA

A dosagem de anticorpos foi feita através do teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que segue a metodologia descrita a seguir: Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* (4°C), com 2 µg de OVA diluídos em 100 µl por poço de tampão carbonato pH=9,6 (*Coating Buffer*). Após 18 horas, no mínimo, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co, St Louis, MO, USA – solução salina tween) e incubadas, por uma hora, com 200 µl de solução de caseína a 25% em PBS (PBS-caseína), por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas, por 1 hora, com 100 µl por poço de seis diluições seriadas dos soros totais a serem testados, iniciando com

a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5, diluições 1:100 a 1:3200). As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, por 1 hora (37°C) com 100 µl por poço de uma solução com anticorpos de cabra anti-IgG1 de camundongo (*Goat anti-mouse IgG1*, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA), diluídos a 1:20000. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas por 1h (37°C) com anticorpos de coelho anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (*Rabbit anti-goat IgG-HRP*, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA).

As placas foram lavadas novamente seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100 µl por poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H₂O₂ e ortofenileno-diamino (OPD). Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl por poço de H₂SO₄ 2%. A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA automático com filtro de 492nm. Em todas as placas foi colocado controle positivo padrão (*pool* de plasma de animais imunes), um controle negativo (*pool* de plasma de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo.

10. Dosagem de IgE específico Anti-OVALBUMINA

A dosagem de anticorpos foi feita através do teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que segue a metodologia descrita a seguir: Microplacas de poliestireno foram incubadas a 4°C, com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo na concentração de 1:250 diluídos em 50µl de tampão carbonato pH 9.6, por poço, durante uma noite. Posteriormente, as placas foram 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 foi desprezada e as placas incubadas por 2 horas com 50µl por poço de soro total dos animais a serem testados. As placas foram 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 foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 50µl por poço de estreptoavidina-peroxidase na concentração de 1:5000 por 45 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-

Tween, incubadas e 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 foram interrompidas, após 15 minutos, pela adição de 20µl por poço de H₂SO₄ 2N. Em todas as placas foram colocados um controle positivo padrão (pool de plasmas de animais imunes), um controle negativo (pool de plasma de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica foi obtida em leitor de ELISA com filtro de 490 nm. Os resultados foram amostrados em unidades arbitrárias (U.A.) a partir do padrão positivo considerado como 1000 unidades.

11. Determinação dos níveis de nitrito + nitrato no soro (Nox)

As amostras de soro foram delipidadas com éter 1:2. O nitrato do soro foi reduzido enzimaticamente para nitrito utilizando-se a enzima nitrato redutase (Sigma). A quantidade total de nitrito foi determinada de acordo com a reação colorimétrica de Griess (Ding *et al.*, 1988). Primeiramente, as placas de 96 poços foram incubadas, overnight, a 37°C, com 50 microlitros/poço de soro e 50 microlitros/poço de solução coquetel contendo 500µL de NADPH, 500 µL de tampão KH₂PO₄, 500µL de água e 50µL da solução da enzima nitrato redutase (100U/500µL). Após esta reação, 100 µL /poço da solução reagente AB (solução A: sulfanilamida 1 % em H₃PO₄ 2,5 % e solução B: naftil etileno amida dihidroclorido 0,1% em H₃PO₄ 2,5%) foram adicionados e as placas incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi feita a 540 nm no leitor de ELISA.

12. 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 foi baseado segundo FERRARIS *et al* 1992, sendo o intestino lavado com salina fisiológica, para retirada das fezes, posteriormente dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%.

Essas porções foram designadas como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Essas porções foram fixadas em formol tamponado a 10%, desidratadas em soluções decrescentes de álcoois e incluídas em parafina. Cortes de 4 μm foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE), e posteriormente analisados usando microscópio óptico convencional (FERRARIS et al., 1992) .

12.1 Avaliação da presença de muco intestinal

A avaliação da presença de muco intestinal foi feita através do método de coloração por PAS (Periodic Acid Schiff). Neste método, os cortes foram desparafinados, hidratados, banhados na solução de ácido periódico durante 5 minutos e então mergulhados no Reativo de Schiff durante 10 minutos ou mais, até que atinjam uma tonalidade rosa pálida. As células caliciformes ficaram evidenciadas em um tom rosa escuro.

As lâminas foram montadas e foram capturadas imagens de três campos de cada porção do intestino delgado a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB. As imagens foram analisadas com a utilização do software KS300 instalado em um analisador de imagens Kontron Eletronic/Carl Zeiss. Para a determinação da área das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em μm^2 PAS/campo.

12.2 Avaliação do número de eosinófilos

Para a identificação e contagem dos eosinófilos, os cortes das porções de intestino delgado foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (OLYMPUS B201). Dez campos foram escolhidos aleatoriamente, em um aumento de 40X ($53.333\mu\text{m}^2/\text{campo}$) para a contagem do número de eosinófilos. O resultado foi expresso em número de eosinófilos/campo.

13. Avaliação da Mieloperoxidase (MPO) no intestino.

Um fragmento do intestino dos animais (jejuno proximal) foi coletado ao final do experimento e armazenado em freezer a -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 a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido 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 ressuspendido 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 de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços, incubado com 75 μl de tampão mais OPD/ H_2O_2 por 30 minutos a 37°C . A reação foi interrompida com 75 μl de H_2SO_4 e a densidade óptica foi medida em 492 nm.

14. Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase (NOS)

A atividade da óxido nítrico sintase foi determinada através da taxa de conversão da L-[U-14C]arginina para [U-14C] citrulina. Imediatamente após a coleta os tecidos foram congelados e armazenados à -70°C . No dia do ensaio, os tecidos foram homogeneizados a 4°C em tampão de homogeneização (pH 7,4; 50 mmol/L Tris, 3,2 mmol/L sacarose, 1 mmol/L dithiothreitol, 10 g/mL leupeptina, 10 g/mL inibidor de tripsina, 21 g/mL aprotinina). O homogenato foi centrifugado à 10000g/20 min a 4°C e o supernadante, contendo a iNOS solúvel e particulada, foi adicionada ao tampão (pH 7,2; 50 mmol/L KH_2PO_4 , 1 mmol /L MgCl_2 , 0,2 mmol/L CaCl_2 , 50 mmol/L valina, 20 mol/L L-citrulina, 20 mol/L L-arginina, 1 mmol/L dithiothreitol, 100 mol/L NADPH, 2 mol /L tetrahydrobiopterina, 3 mol/L flavina adenina dinucleotídeo (FAD), 3 mol/L flavina mononucleotídeo (FMN). Após 30 min de incubação à 37°C , o substrato foi removido através da adição de 1:1 (v/v) água milli-Q/Dowex-AGSOW,

finalizando a reação. Após centrifugação à 5000g por 10 min, o supernadante foi cuidadosamente removido e a atividade da iNOS foi determinada a partir da conversão de L-[U-14C]arginina para [U-14C] citrulina. Para determinar a atividade Ca^{2+} independente, os experimentos foram realizados na ausência de CaCl_2 e calmodulina, mas na presença de 2nmol/L EGTA. A atividade da enzima foi calculada como a diferença entre a [U-14C] citrulina gerada das amostras do grupo controle e a gerada das amostras contendo inibidor de iNOS (L-NMMA, 1mmol/L). A atividade da NOS Ca^{2+} independente foi determinada como a diferença entre amostras contendo EGTA e amostras contendo EGTA+L-NMMA. O conteúdo de proteína solúvel do supernadante foi determinado utilizando-se um reagente protéico Bio-Rad tendo como padrão albumina sérica bovina. A atividade da NOS foi expressa em pmol citrulina/min/mg de proteína.

15. Análise Estatística

Para análise dos grupos experimentais foram utilizados os testes de ANOVA e o TESTE T DE STUDENT com um nível de significância considerado quando $P < 0.05$.

As diferenças na translocação bacteriana foram analisadas através do teste de Fisher.

Resultados

Uma vez que, nosso grupo de pesquisa verificou um aumento de óxido nítrico (NO), produzido por macrófagos peritoneais, em camundongos com alergia alimentar induzida, haveria produção de NO local nesses animais? E sistêmica?

1- RESULTADOS

1. Avaliação da iNOS, cNOS e NOS total na mucosa intestinal

As Figuras 1,2 e 3 representam a dosagem das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS), óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e óxido nítrico sintase total, no jejuno proximal de camundongos dos grupos controle e alérgico.

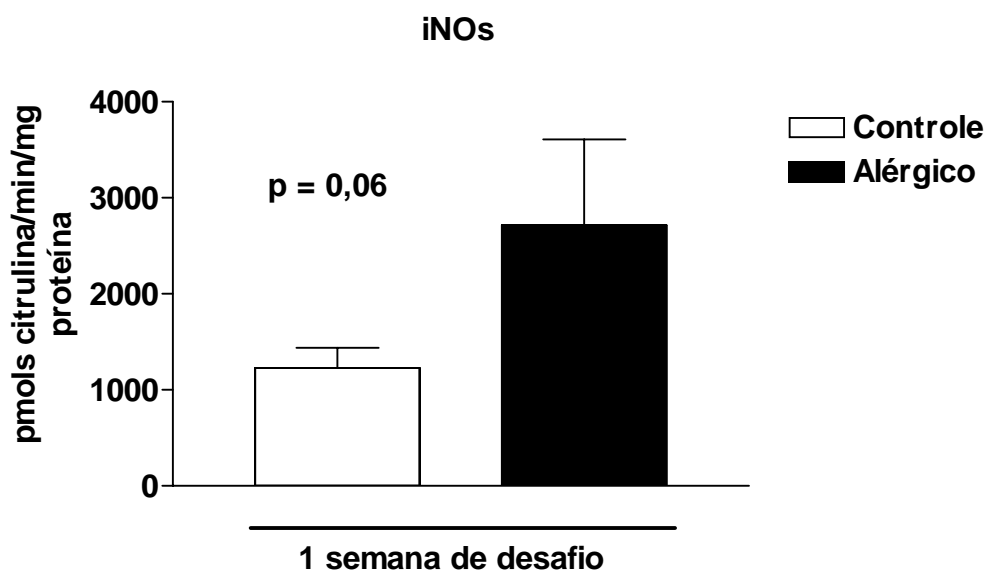


Figura 1: Avaliação da óxido nítrico sintase induzida (inos)
Representa a dosagem da enzima óxido nítrico sintase induzida (inos) realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c, divididos em grupos controle e alérgico, após uma semana de desafio.
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar que ocorreu um aumento, muito próximo do significativo ($P=0,06$), na quantidade da enzima iNOS no jejuno proximal dos animais alérgicos.

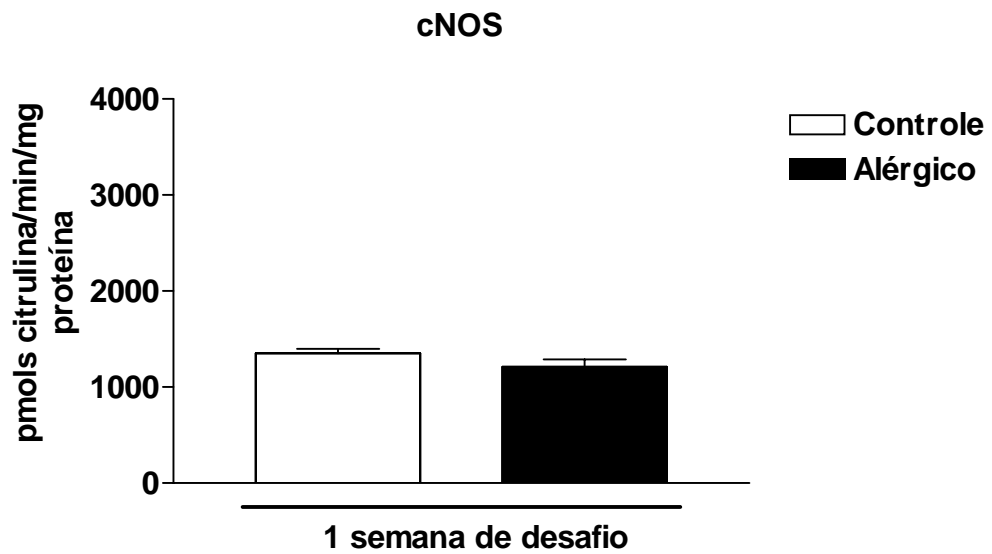


Figura 2: Avaliação da óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS)

Representa a dosagem da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c, divididos em grupos controle e alérgico, após uma semana de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

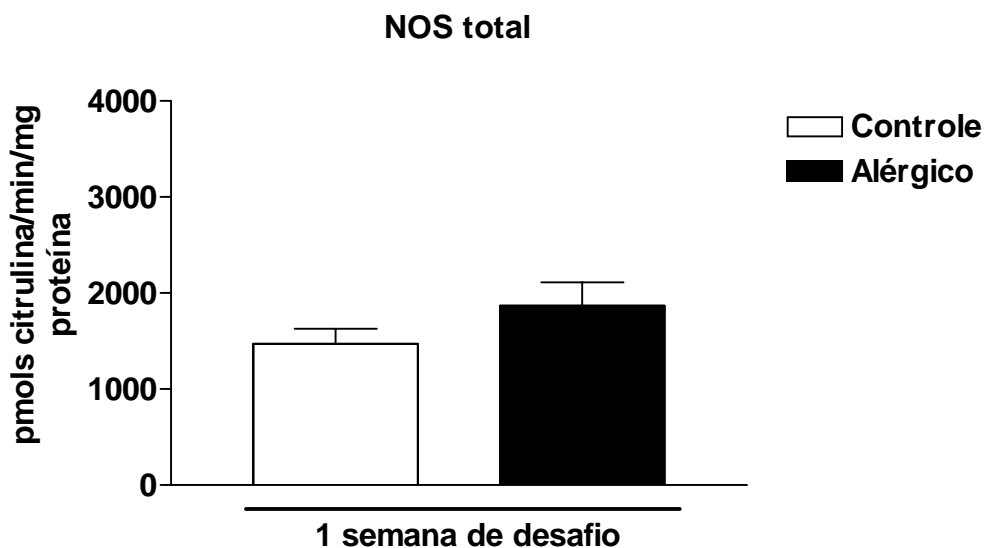


Figura 3: Avaliação da óxido nítrico sintase total

Representa a dosagem da enzima óxido nítrico sintase constitutiva (cnos) realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c, divididos em grupos controle e alérgico, após uma semana de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controle

Pode-se observar, que não foram detectadas alterações significativas na dosagem de cNOS e NOS total no jejuno proximal de camundongos alérgicos.

2. Avaliação da quantidade de nitrito no soro

Para avaliar a produção de óxido nítrico nos grupos controle e alérgico, foi quantificado, através do método de ELISA, nitrito no soro desses animais. A Figura abaixo representa essa dosagem em unidades arbitrárias (U.A.)

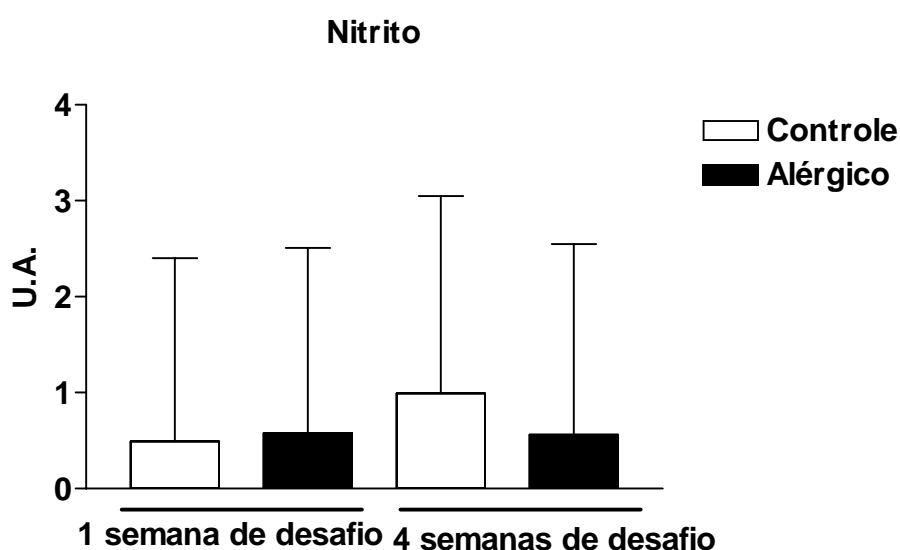


Figura 4: Avaliação de nitrito

Representa a dosagem de nitrito pelo método de ELISA, realizada no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle e alérgico, com uma e quatro semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar que não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

Foi visto que ocorreu aumento da iNOS no jejuno proximal de animais alérgicos, o que sugeri uma tendência ao aumento de NO nesse segmento. Essa maior quantidade de NO produzida poderia provocar uma lesão na mucosa intestinal e favorecer a translocação bacteriana do intestino para outros órgãos e conseqüentemente provocar uma infecção secundária, o que explicaria a causa do emagrecimento desses animais?

RESULTADOS

3. Análise microbiológica para avaliação da translocação bacteriana

Para avaliar a translocação bacteriana, do intestino para outros órgãos, que é comum em casos de dano tecidual causado por processo inflamatório como, por exemplo, no processo de isquemia/reperfusão, foram retirados assepticamente os linfonodos mesentéricos, baço e fígado de animais dos grupos controle e alérgico. Esses órgãos foram macerados, diluídos e incubados em meio de cultura para posterior contagem das colônias bacterianas. A Figura 5 representa o logaritmo das unidades formadoras de colônias (UFC) dos grupos controle e alérgico.

Podemos observar nesta Figura que ocorreu translocação bacteriana do intestino para os linfonodos mesentéricos em 2 animais do grupo controle e 5 animais do grupo alérgico. Para o baço, ocorreu translocação bacteriana em 2 animais de cada grupo, porém, o número de unidades formadoras de colônias não foi significativo, uma vez que, para ser significativo o log de UFC deveria estar acima de 2 para baço e fígado e acima de 3 para linfonodo mesentérico.

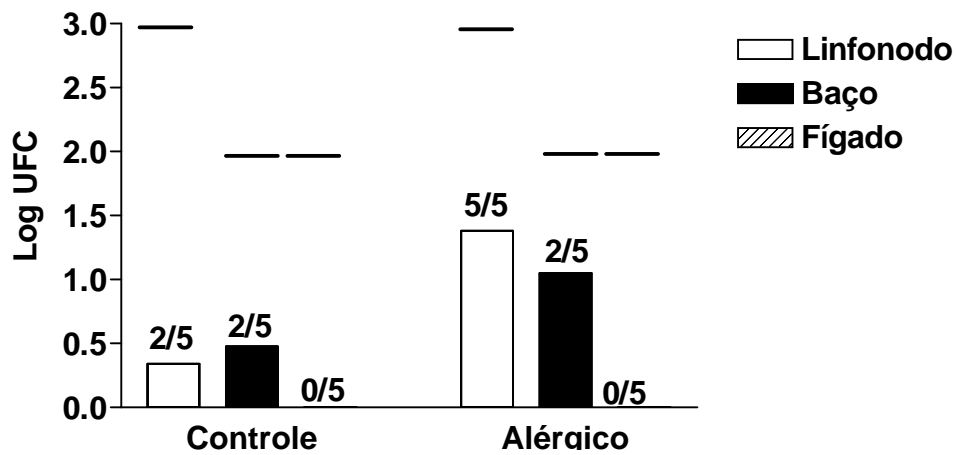


Figura 5: Avaliação da translocação bacteriana

Avaliação da translocação bacteriana em logaritmo de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama (g) de tecido (linfonodos mesentéricos, baço e fígado) de camundongos da linhagem BALB/c divididos em 2 grupos grupos controle e alérgico após uma semana de desafio. Os números representados em cima das barras indicam o número de animais em que foi detectado UFC por número total do grupo.

Acima deste ponto _____, ou seja, 3.0 log UFC (g) ou (10^3 ufc/g de tecido) para linfonodos mesentéricos e 2.0 log UFC (g) ou (10^2 ufc/g de tecido) para baço e fígado, representa translocação bacteriana estatisticamente significativa.

Nossos dados sugerem uma maior produção de NO local, observada através da dosagem da enzima iNOS no jejuno proximal de camundongos alérgicos. Um antioxidante, como a vitamina E, seria capaz de reverter esse aumento da iNOS no jejuno proximal desses camundongos?

RESULTADOS

4. Avaliação da iNOS na mucosa intestinal

A Figura 6 representa a dosagem da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), no jejuno proximal de camundongos dos grupos controle e alérgico suplementados com vitamina E (1000 mg/kg de dieta).

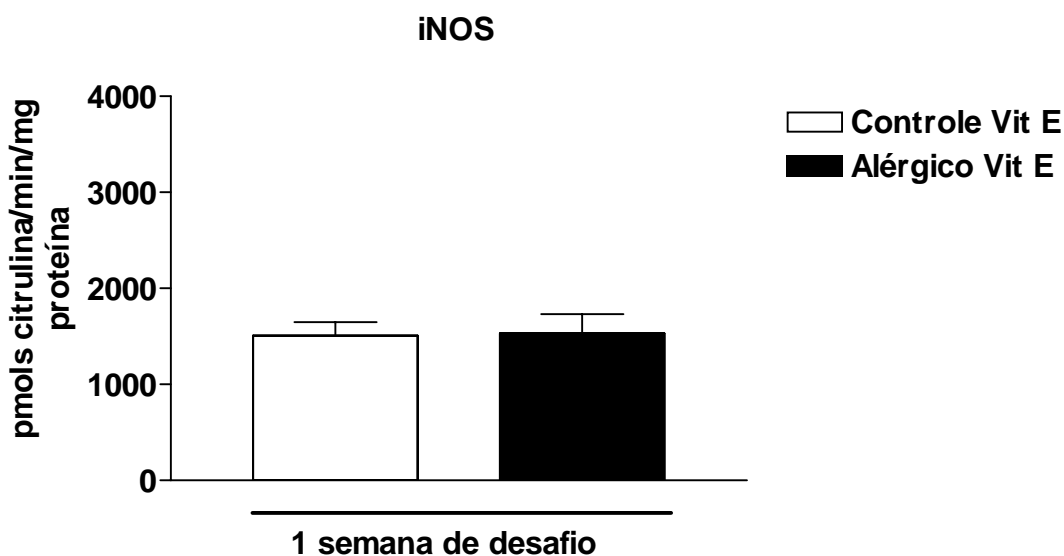


Figura 6: Avaliação da óxido nítrico sintase induzida
Representa a dosagem da enzima iNOS realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c, divididos em grupos controle e alérgico suplementados com vitamina E (1000 mg por kg de dieta), após uma semana de desafio.
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar que não há diferença entre os grupos analisados

Uma vez que, a vitamina E é capaz de reduzir a iNOS nos camundongos alérgicos, ela teria algum efeito nos parâmetros da alergia alimentar?

2 - RESULTADOS

Suplementação com Vitamina E (Vit E) (1000 mg/ kg dieta)

5. Avaliação do peso corpóreo

O peso dos animais, tratados com uma dieta balanceada e suplementada com vitamina E, foi avaliado semanalmente durante 7 semanas. Os animais alérgicos e alérgicos tratados com vitamina E apresentaram uma acentuada perda de peso a partir da terceira semana, que corresponde à primeira semana após o desafio com o antígeno. O grupo alérgico manteve o emagrecimento até o final do experimento (semana 7). Já, o grupo alérgico tratado com vitamina E, apresentou uma surpreendente recuperação do peso corpóreo, estatisticamente significativa, a partir da quarta semana e manteve essa recuperação até a última semana de avaliação. A Figura 7 representa a avaliação semanal do peso corpóreo dos animais suplementados com vitamina E em relação aos não suplementados.

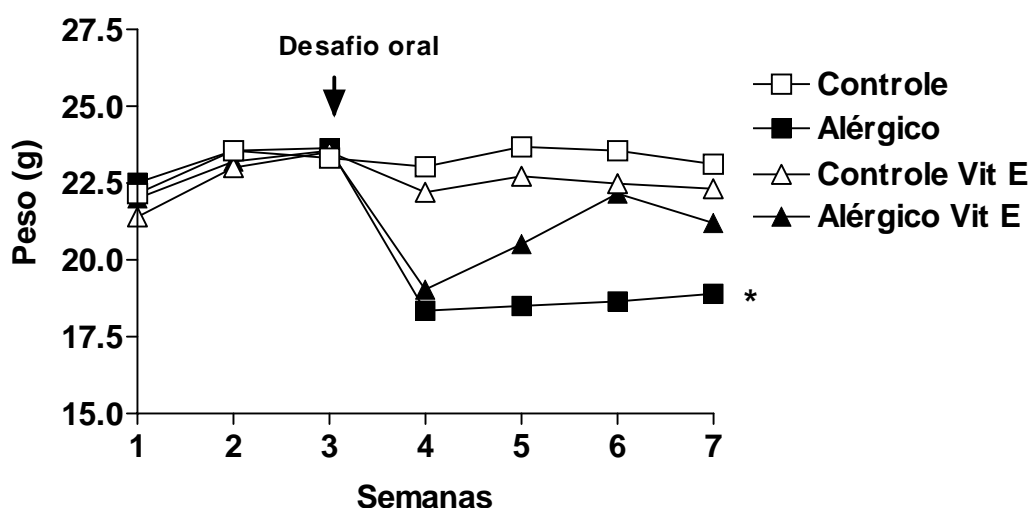


Figura 7: Avaliação do peso corpóreo (Vit E; 1000 mg)

Peso corpóreo em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta).

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

6. Avaliação do consumo de ração

A Figura 8 representa a avaliação semanal do consumo de ração dos animais tratados e não tratados com vitamina E (1000 mg/kg de dieta).

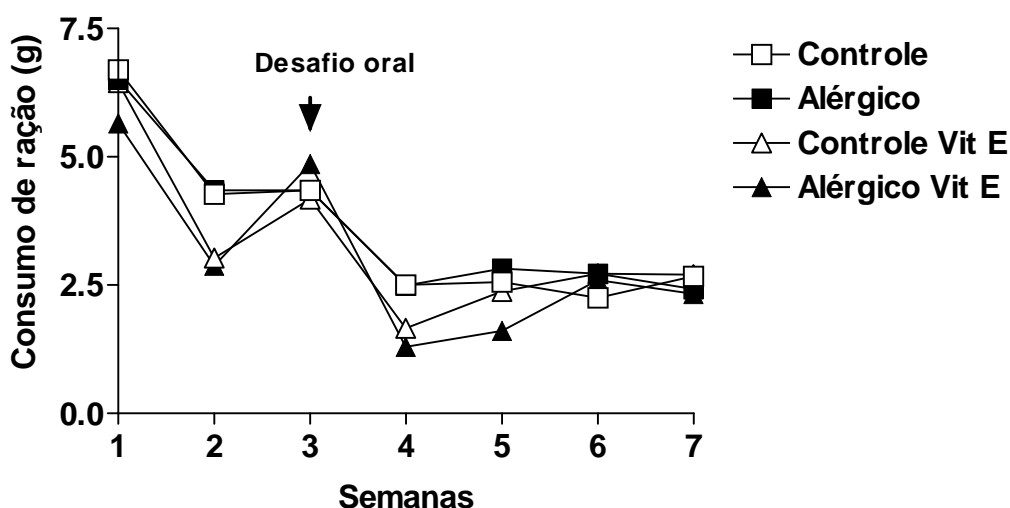


Figura 8: Avaliação do consumo de ração (Vit E; 1000 mg)

Consumo de ração em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta). Até a terceira semana todos os grupos receberam ração balanceada, suplementada ou não com vitamina E, à base de caseína. A partir da semana 3 todos os grupos foram desafiados com uma ração balanceada à base de ovalbumina, suplementada ou não com vitamina E.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Podemos observar que não houve diferença estatística no consumo de ração dos grupos mostrados na figura acima. Apesar de apresentarem uma diminuição do consumo de ração depois do desafio, ou seja, quando ocorre a troca da dieta, essa diminuição ocorreu em todos os grupos.

7. Avaliação dos anticorpos dos isotipos IgE e IgG1

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo alérgico é a dosagem de anticorpos dos isotipos IgE e IgG1. Como mostram as Figuras 9 e 10, a produção da IgE e da IgG1 dos grupos alérgico e alérgico suplementado com vitamina E (100 mg/kg de dieta), foi estatisticamente maior quando comparada aos seus respectivos grupos controles tanto com 1 quanto com 4 semanas de desafio.

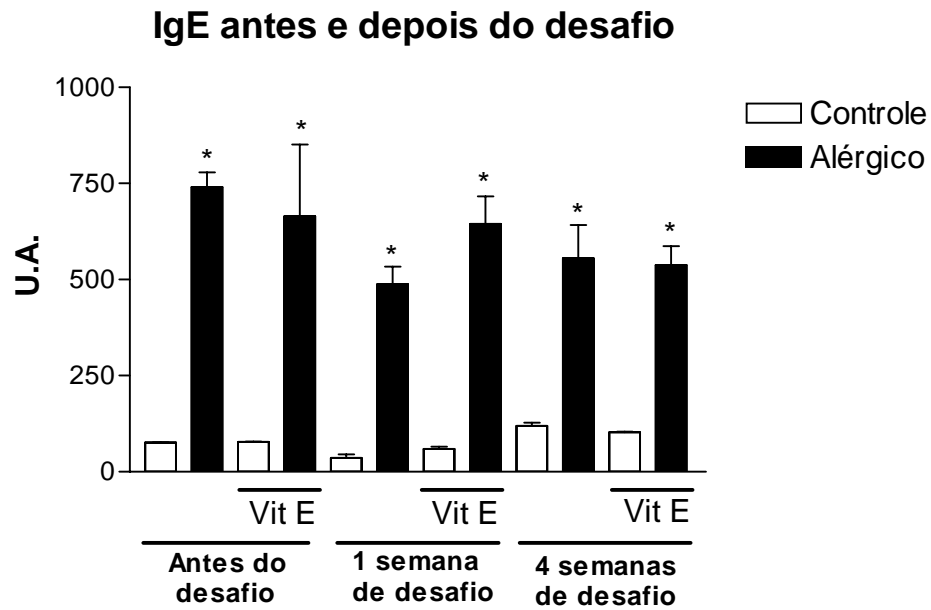


Figura 9: Avaliação da produção da Imunoglobulina E (Vit E; 1000 mg)
 Quantificação, da imunoglobulina E (IgE) em unidade arbitrária (U.A.), através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) com 1 e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

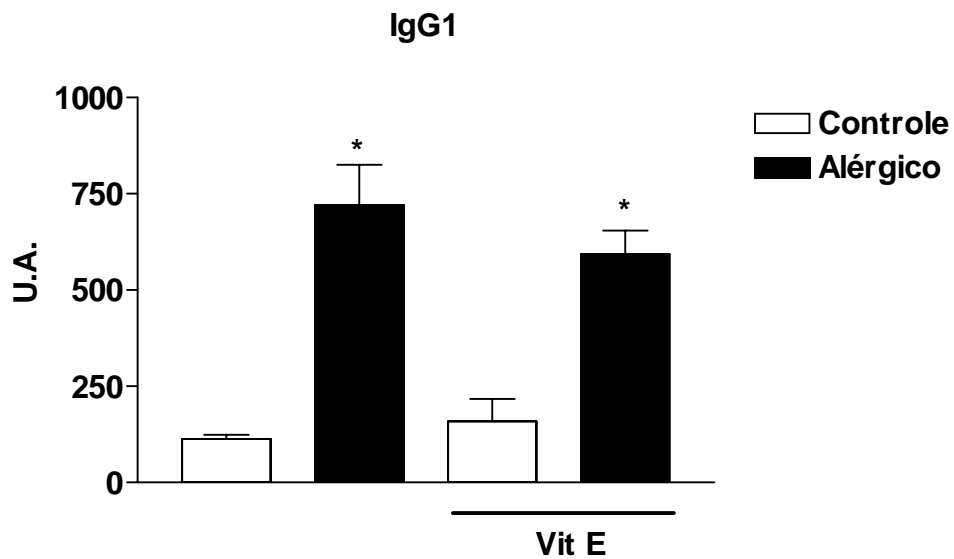


Figura 10: Avaliação da produção da imunoglobulina G1 (Vit E; 1000 mg)
 Quantificação, da imunoglobulina G1 (IgG1) em unidade arbitrária (U.A.), através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) com 1 semana de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

8. Avaliação da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

Um outro parâmetro da alergia alimentar avaliado foi a produção de muco pelas células caliciformes, situadas nas vilosidades de todo o intestino delgado. O intestino foi dividido em 4 partes: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada um desses segmentos de cinco animais de cada grupo. Esses campos foram analisados através de um programa de computador (KS300) que quantifica através da medida da área desejada, nesse caso, a área onde verificou-se a presença de muco através da coloração de P.A.S.. As Figuras 11, 12, 13 e 14 representam a área de muco em micrômetros quadrados por campo de cada segmento do intestino delgado.

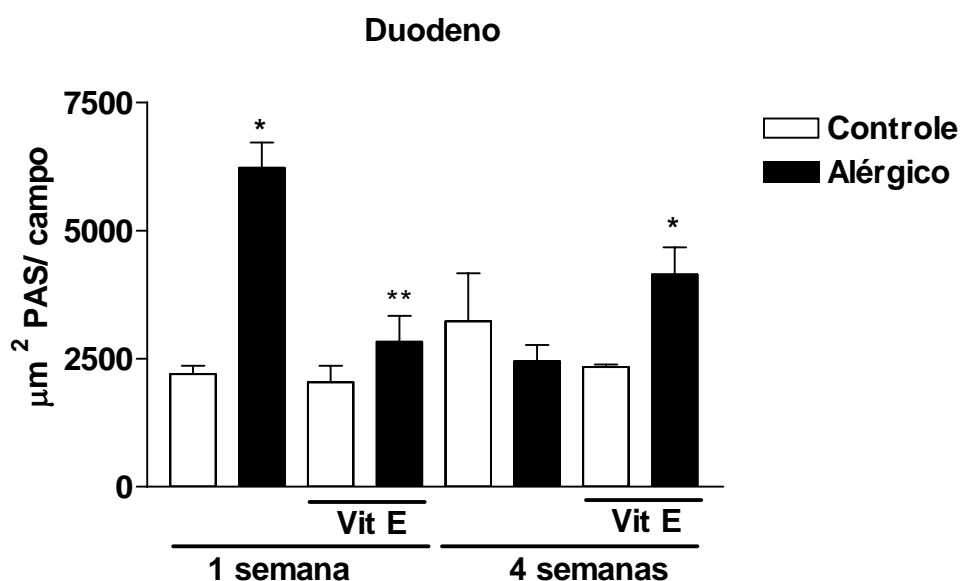


Figura 11: Avaliação da produção de muco no duodeno (Vit E; 1000 mg)

Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ em relação a outro alérgico

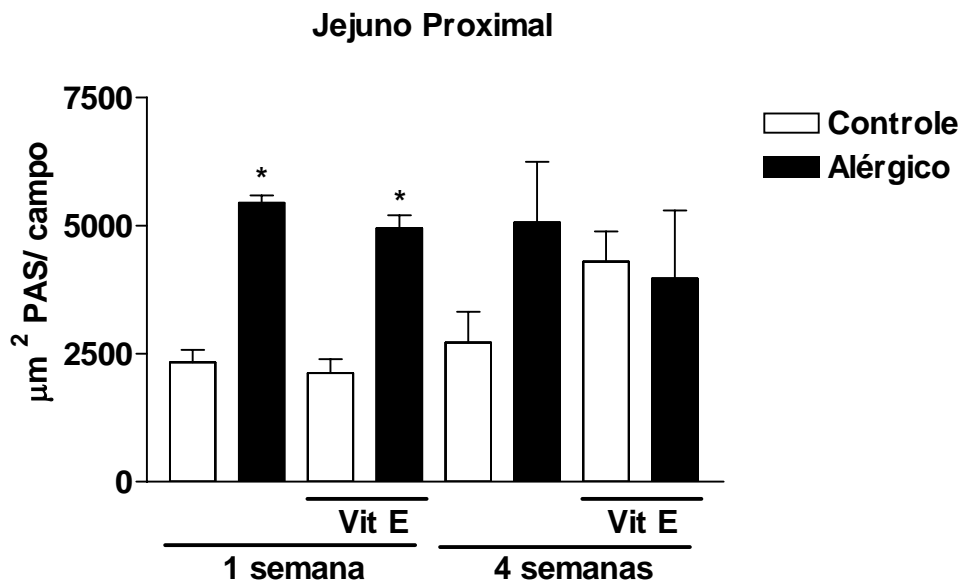


Figura 12: Avaliação da produção de muco no jejuno proximal (Vit E; 1000 mg)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

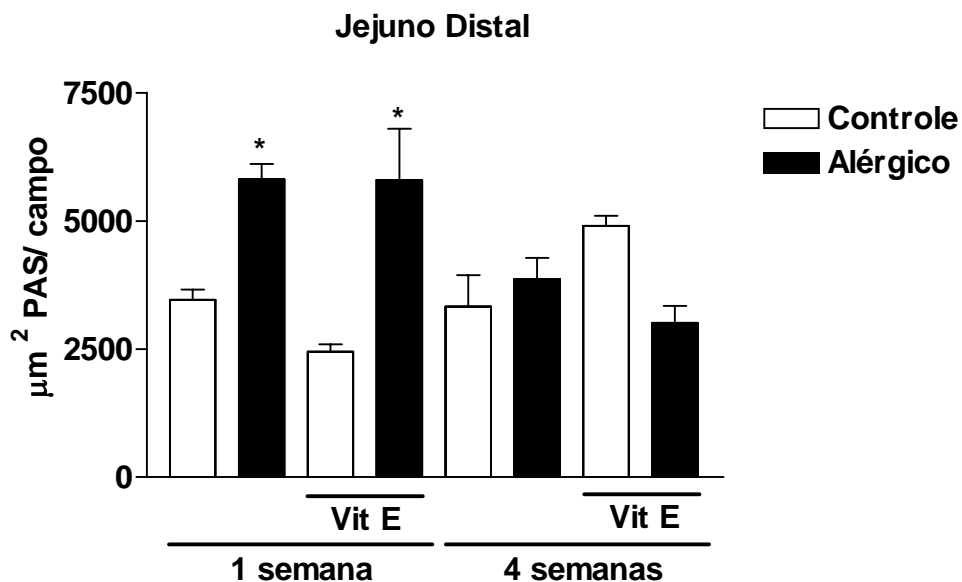


Figura 13: Avaliação da produção de muco no jejuno distal (Vit E; 1000 mg)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

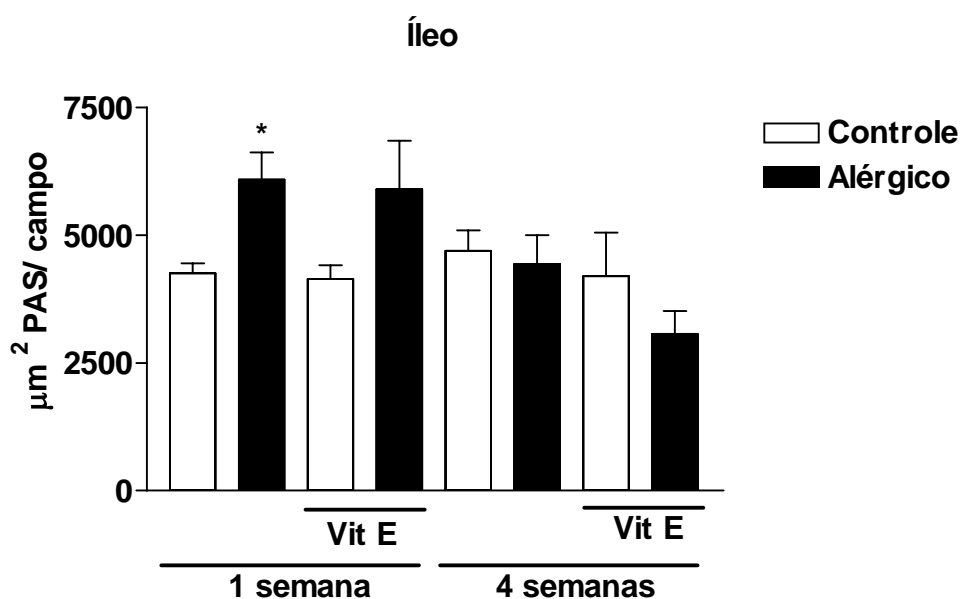


Figura 14: Avaliação da produção de muco no íleo (Vit E; 1000 mg)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Observa-se, no duodeno, um aumento significativo na quantidade de muco no grupo alérgico com uma semana de desafio e uma diminuição com quatro semanas de desafio. No grupo alérgico suplementado com vitamina E, observou-se uma quantidade de muco próxima da do grupo controle com uma semana de desafio e um aumento significativo com quatro semanas de desafio.

No jejuno proximal e distal ocorreu um aumento significativo na quantidade de muco nos grupos alérgicos, com uma semana de desafio. A avaliação histológica do muco no jejuno proximal pode ser observada na Figura 68. Com quatro semanas de desafio observou-se uma diminuição na quantidade de muco no grupo alérgico e alérgico suplementado com vitamina E, ficando num patamar bem parecido com o seu grupo controle. Já o grupo alérgico permaneceu com uma quantidade de muco muito parecida com a observada na primeira semana de desafio, porém, provavelmente por causa do tamanho do erro, não se observou diferença estatística quando comparado com seu controle. No íleo, observou-se um aumento na quantidade de muco nos grupos alérgico e alérgico suplementado com vitamina E com uma semana de desafio, porém verificou-se diferença estatística somente no

grupo alérgico. Com quatro semanas de desafio foi verificada uma diminuição de muco tanto no grupo alérgico quanto no alérgico suplementado com vitamina E, não apresentando diferença estatística quando comparados com seus controles.

9. Avaliação do infiltrado de eosinófilos na mucosa do intestino delgado

O número de eosinófilos na mucosa intestinal do intestino delgado é um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo inflamatório na alergia alimentar. Para essa análise, o intestino delgado foi dividido em 4 segmentos: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram analisados 10 campos aleatórios de cada segmento de cinco animais de cada grupo. As Figuras 15, 16, 17 e 18 representam o número de eosinófilos por campo de cada segmento do intestino delgado.

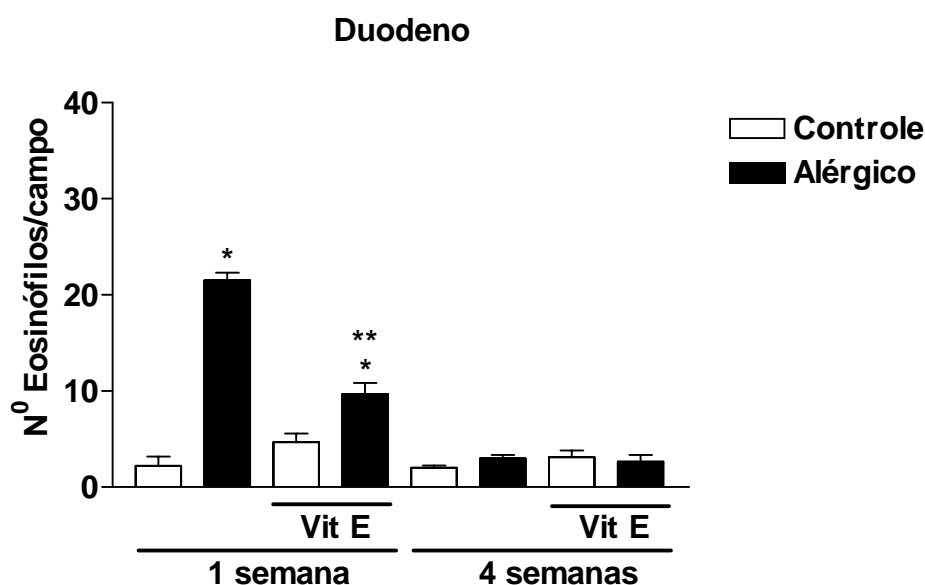


Figura 15: Avaliação de eosinófilos no duodeno (Vit E; 1000 mg) Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ em relação a outro alérgico

Jejuno Proximal

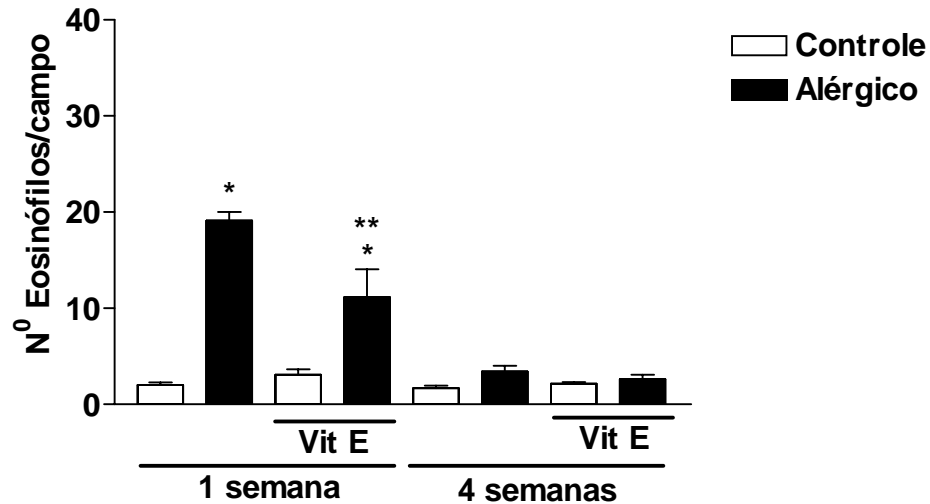


Figura 16: Avaliação de eosinófilos no jejuno proximal (Vit E; 1000 mg)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ controle em relação a outro controle

Jejuno Distal

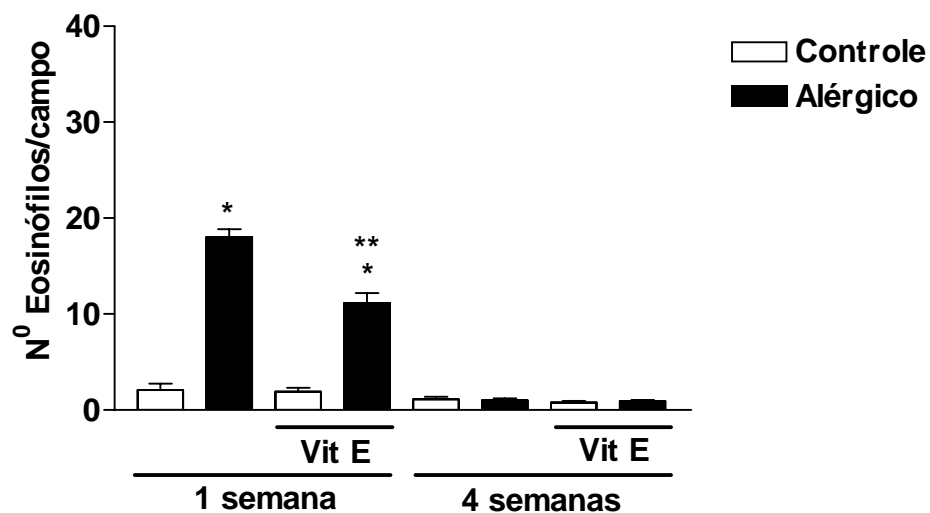


Figura 17: Avaliação de eosinófilos no jejuno distal (Vit E; 1000 mg)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

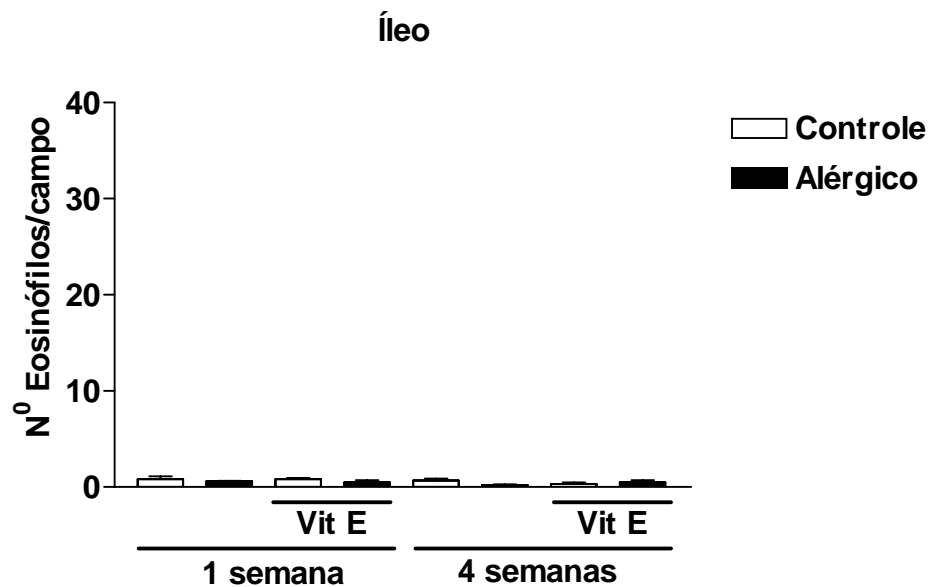


Figura 18: Avaliação de eosinófilos no íleo (Vit E; 1000 mg)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Observa-se um aumento significativo no número de eosinófilos, na mucosa do duodeno, jejuno proximal e jejuno distal, nos grupos alérgico e alérgico suplementado com vitamina E, com uma semana de desafio, quando comparados com seus respectivos controles. Quando os grupos alérgicos foram comparados, nesse mesmo tempo de desafio, observou-se uma diminuição no número de eosinófilos no grupo alérgico suplementado com vitamina E nos três segmentos citados acima.

Já no íleo, não foram observadas diferenças entre os grupos. Foi observada uma diminuição expressiva no número de eosinófilos em todos os grupos nos dois tempos analisados.

10. Avaliação de neutrófilos na mucosa do intestino delgado

A Figura 19 refere-se à avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal.

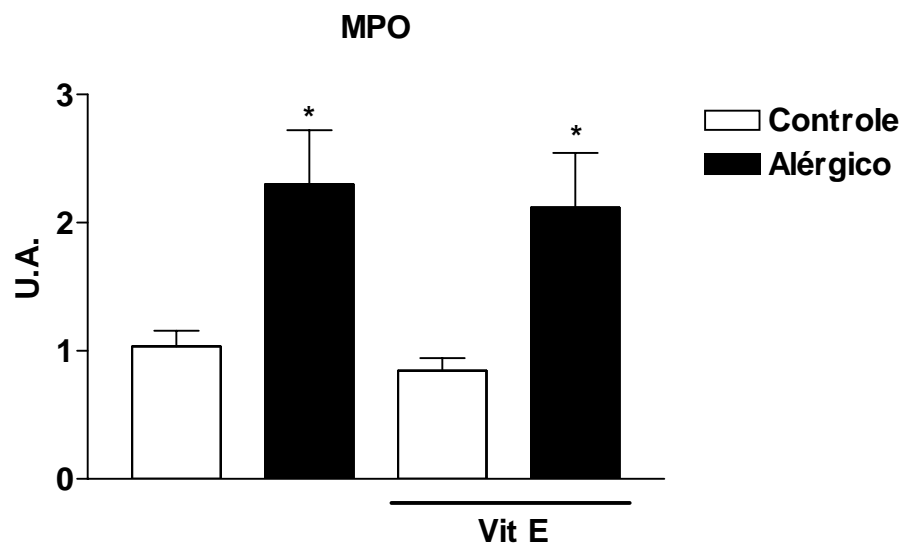


Figura 19: Avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal (Vit E; 1000 mg)
 Quantificação, da mieloperoxidase (MPO) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta) com 1 semana de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Observa-se um aumento significativo da mieloperoxidase tanto no grupo alérgico como no alérgico suplementado com Vitamina E (1000 mg/kg de dieta).

Visto que a vitamina E na proporção de 1000 mg/kg de dieta (considerada limite), apresentou uma melhora em alguns parâmetros do modelo de alergia alimentar, em uma dose menor ela teria o mesmo efeito?

3 - RESULTADOS

Suplementação com vitamina E (Vit E 500 mg/kg de dieta)

11. Avaliação do peso corpóreo

O peso dos animais, que foram tratados com uma dieta balanceada e suplementada com vitamina E (500 mg/kg de dieta), foi avaliado semanalmente durante 7 semanas.

A Figura 20 representa a avaliação semanal do peso corpóreo dos animais suplementados com vitamina E (500mg/kg de dieta) em relação aos não suplementados.

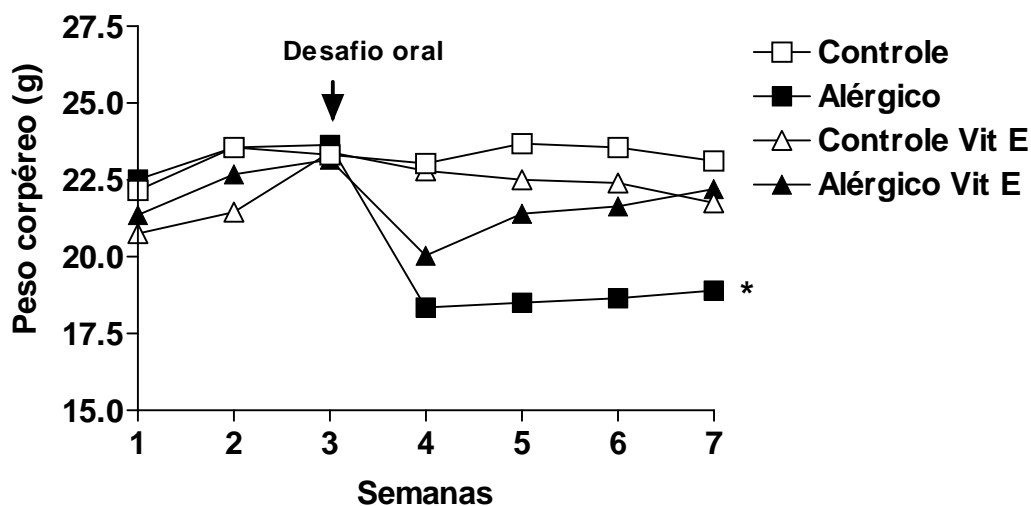


Figura 20: Avaliação do peso corpóreo (Vit E; 500 mg) Peso corpóreo em gramas (g), avaliada por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta).
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Os animais alérgicos e alérgicos tratados com vitamina E apresentaram uma acentuada perda de peso a partir da terceira semana, que corresponde à primeira semana de desafio com o antígeno. O grupo alérgico manteve o emagrecimento até o final do experimento (semana 7). Já o grupo alérgico, tratado com vitamina E, apresentou uma surpreendente recuperação do peso corpóreo, estatisticamente significativa, a partir da quarta semana e manteve essa recuperação até a última semana de avaliação.

12. Avaliação dos anticorpos dos isotipos IgE

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo alérgico é a dosagem de anticorpos dos isotipos IgE e IgG1. Como mostra a Figura 21, a produção da IgE dos grupos alérgico e alérgico suplementado com vitamina E (500 mg/kg de dieta), foi estatisticamente maior quando comparada aos seus respectivos grupos controles, tanto com uma semana de desafio quanto com quatro semanas de desafio.

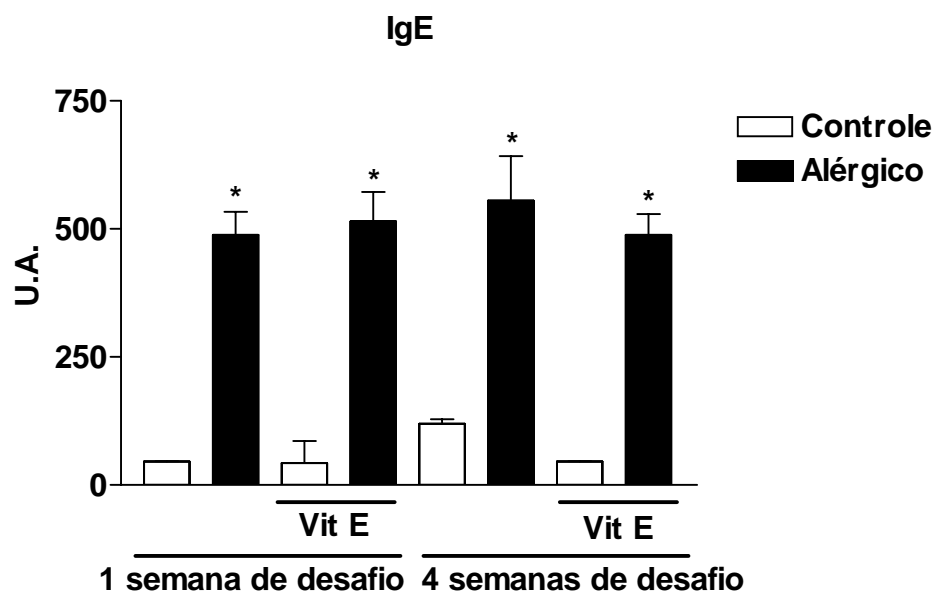


Figura 21: Avaliação da produção da imunoglobulina E (Vit E; 500 mg) Quantificação, da imunoglobulina E (IgE) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (VitE; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (VitE; 500 mg/kg de dieta) .
*p<0,05 em relação aos grupos controles

13. Avaliação da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

Um outro parâmetro da alergia alimentar avaliado foi a produção de muco pelas células caliciformes, situadas nas vilosidades de todo o intestino delgado. O intestino foi segmentado em 4 partes designadas duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada um desses segmentos de cinco animais de cada grupo. Esses campos foram analisados através de um programa de computador (KS300) que quantifica através da medida da área desejada, nesse caso, a área onde verificamos a presença de muco através da coloração de P.A.S.. As Figuras 22, 23, 24 e 25 representam a área de muco em micrômetros quadrados por campo de cada segmento do intestino delgado.

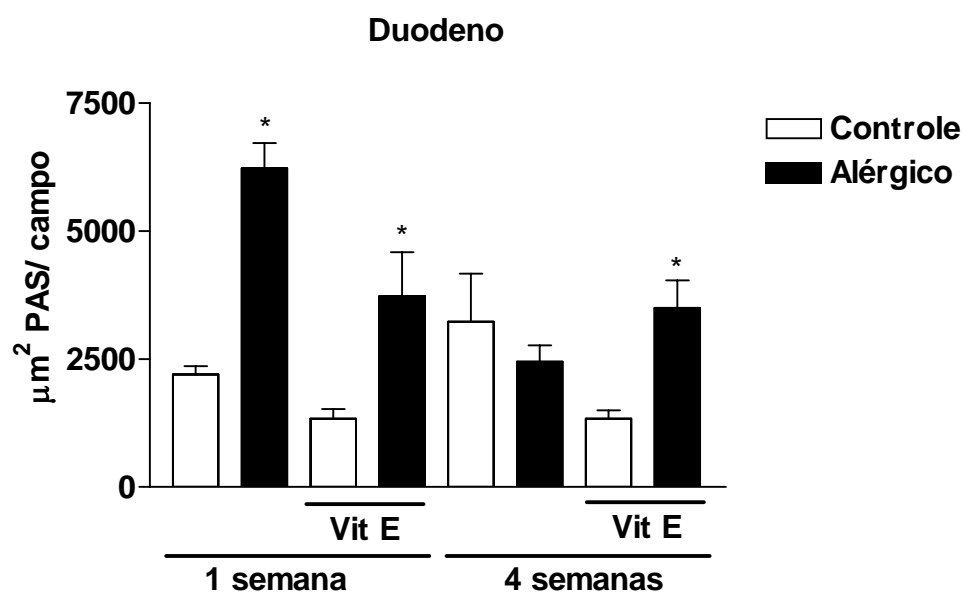


Figura 22: Avaliação da produção de muco no duodeno (Vit E; 500 mg)
Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

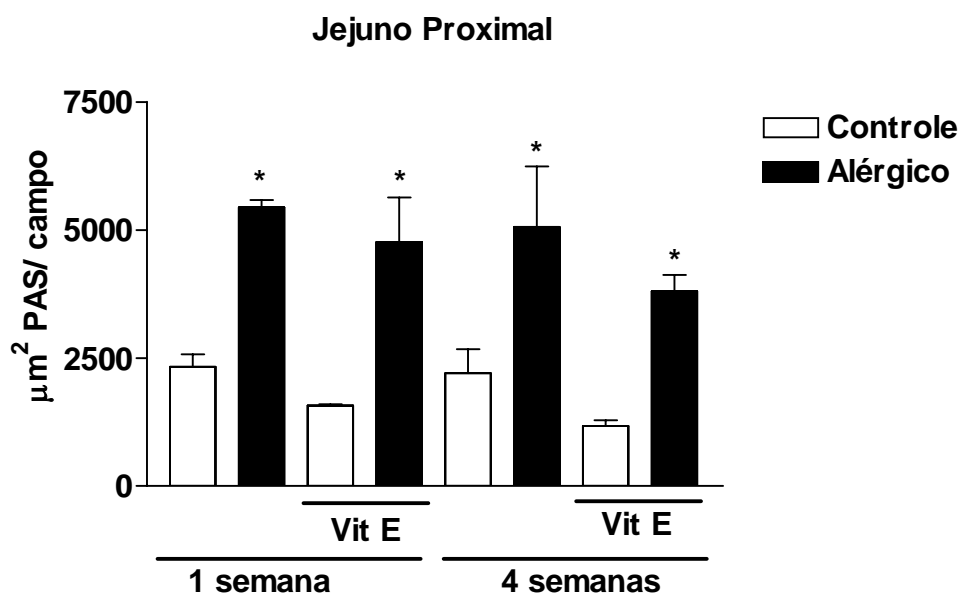


Figura 23: Avaliação da produção de muco no jejuno proximal (Vit E; 500 mg)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

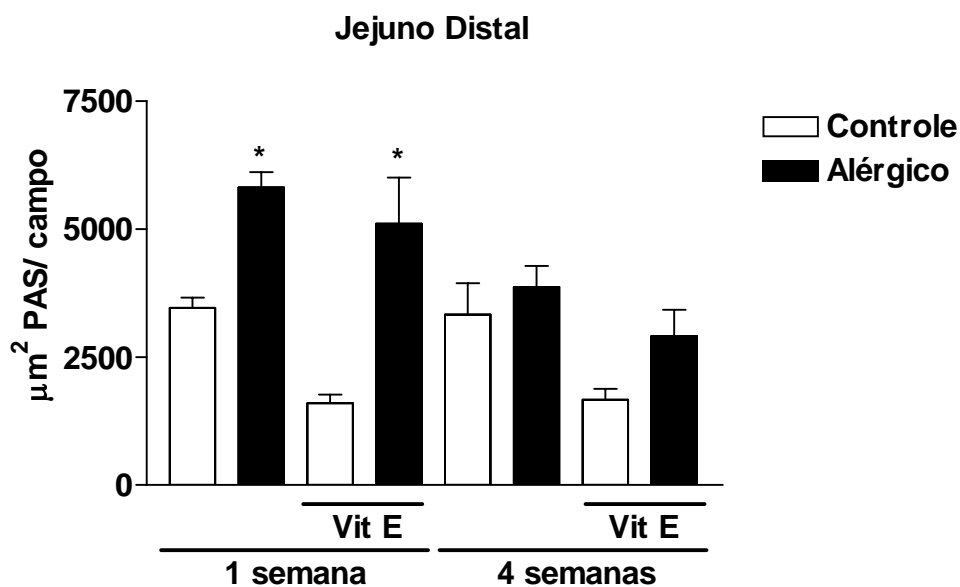


Figura 24: Avaliação da produção de muco no jejuno distal (Vit E; 500 mg)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

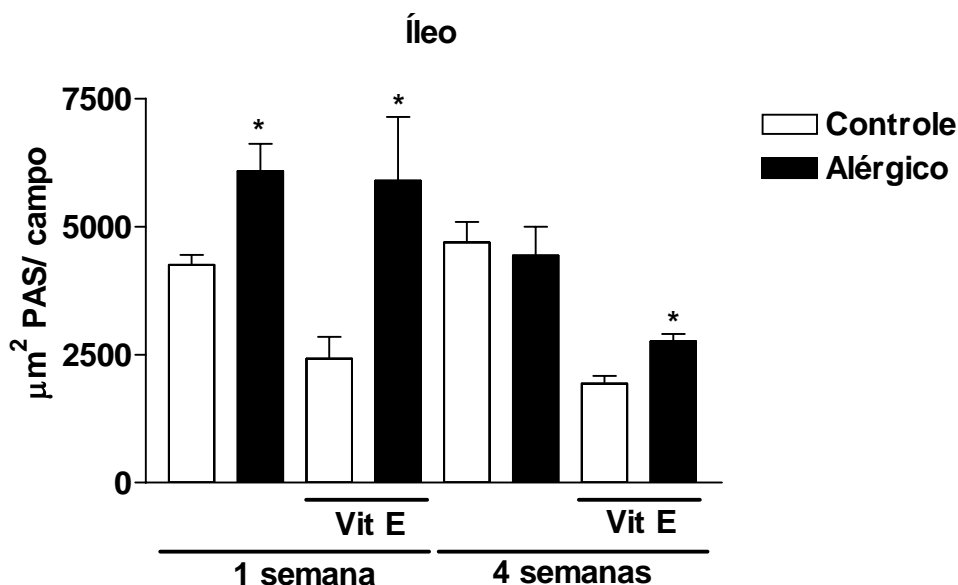


Figura 25: Avaliação da produção de muco no íleo (Vit E; 500 mg)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar nas Figuras 22, 23, 24 e 25 que ocorreu um aumento significativo de muco nos grupos alérgico e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em todos os segmentos analisados, na primeira semana de desafio. A avaliação histológica do muco no jejuno proximal pode ser observada na Figura 68 Essa diferença se manteve, no duodeno e no íleo do grupo alérgico suplementado com vitamina E, no jejuno proximal nos dois grupos alérgicos e no jejuno distal não foram observadas diferenças, quando analisados com quatro semanas de desafio.

14. Avaliação do infiltrado de eosinófilos na mucosa do intestino delgado

O número de eosinófilos na mucosa intestinal do intestino delgado é um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo inflamatório na alergia alimentar. Para essa análise, o intestino delgado foi dividido em 4 segmentos: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram analisados 10 campos aleatórios de cada

segmento de cinco animais de cada grupo. As Figuras 26, 27, 28 e 29 representam o número de eosinófilos por campo de cada segmento do intestino delgado.

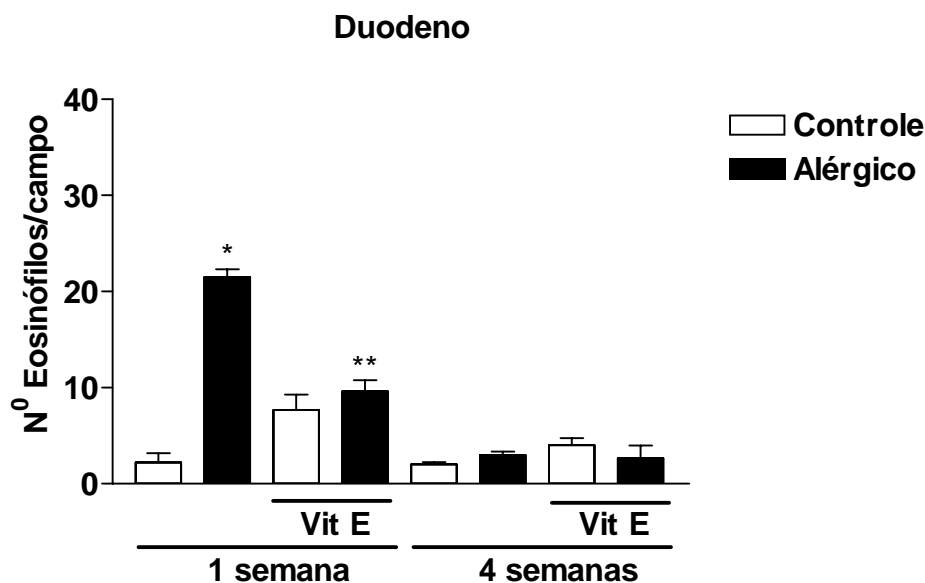


Figura 26: Avaliação de eosinófilos no duodeno (Vit E; 500 mg)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ em relação a outro alérgico

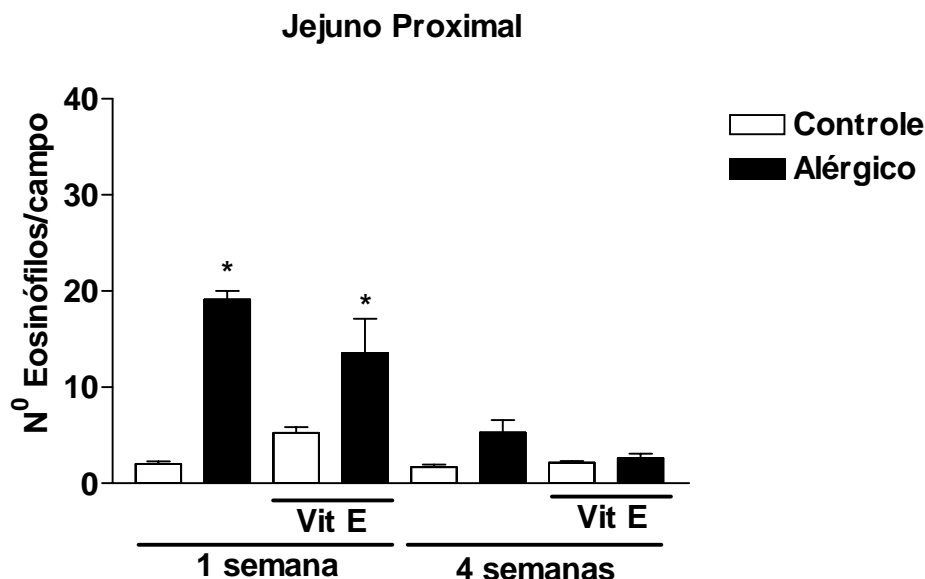


Figura 27: Avaliação de eosinófilos no jejuno proximal (Vit E; 500 mg)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg /kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Jejuno Distal

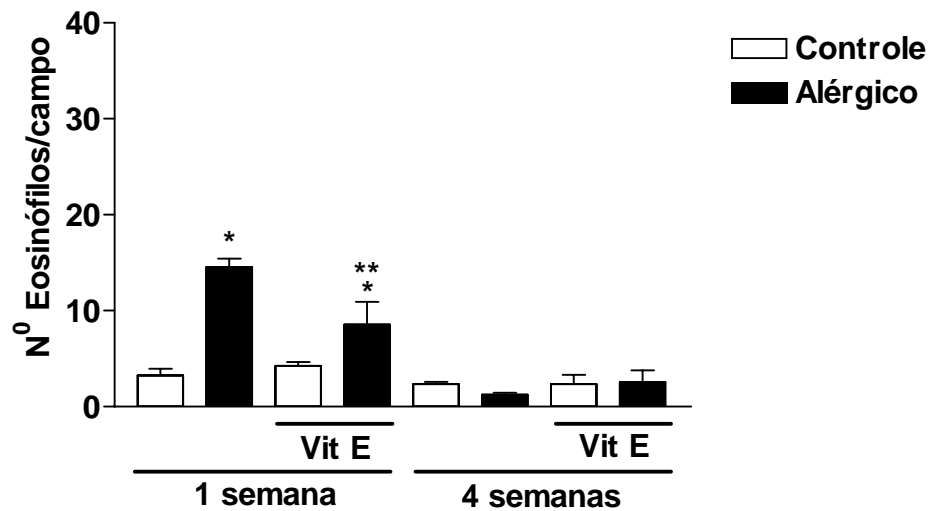


Figura 28: Avaliação de eosinófilos no jejuno distal (Vit E; 500 mg)
 Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ em relação a outro alérgico

Íleo

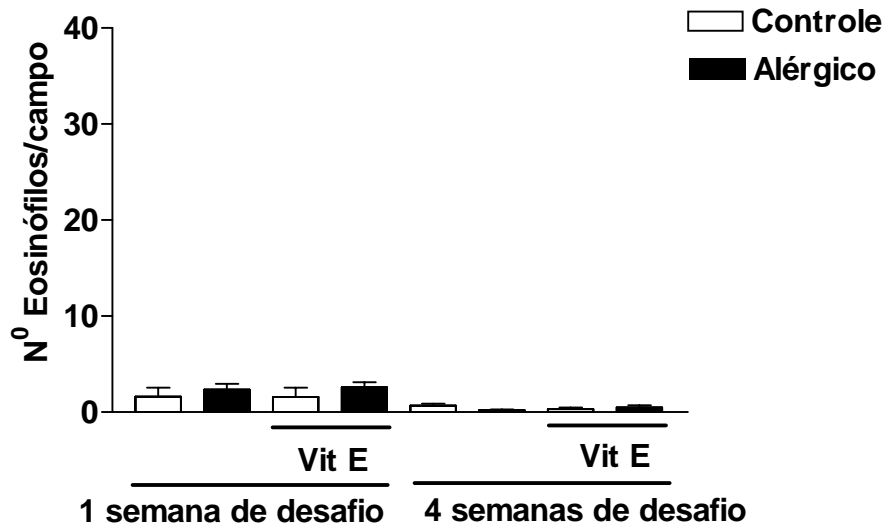


Figura 29: Avaliação de eosinófilos no íleo (Vit E; 500 mg)
 Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (Vit E; 500 mg/kg de dieta) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar um aumento no número de eosinófilos no duodeno dos animais do grupo alérgico e no jejuno proximal e jejuno distal dos animais dos grupos alérgico e alérgico suplementado com vitamina E (500 mg/kg de dieta), na primeira semana de desafio em relação aos seus grupos controles. No duodeno e no jejuno proximal dos animais alérgicos suplementados, foi observada uma diminuição no número de eosinófilos quando comparado ao alérgico.

15. Avaliação de neutrófilos na mucosa do intestino delgado

A Figura 30 refere-se à avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal.

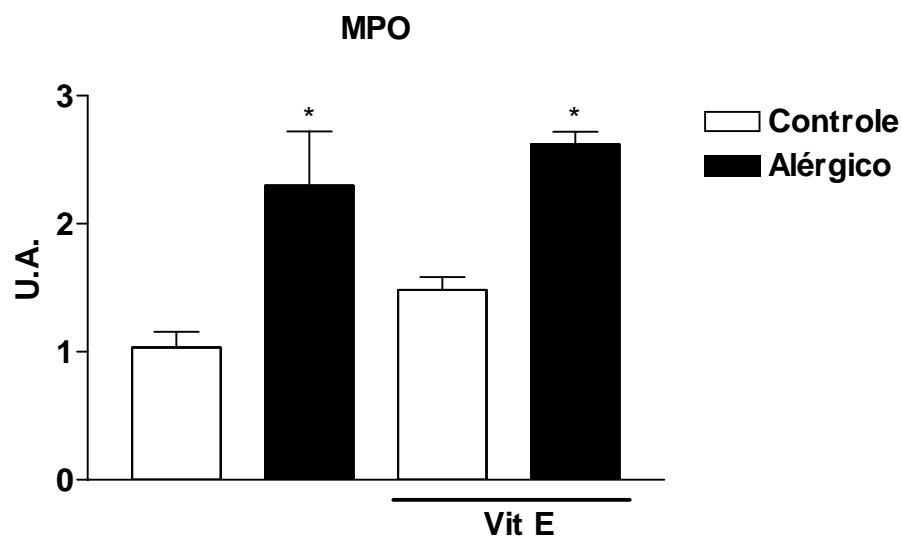


Figura 30: Avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal (Vit E; 500 mg)
Quantificação da mieloperoxidase (MPO) em unidade arbitrária (U.A.), através do método de ELISA, no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com vitamina E (500 mg/kg de dieta) e alérgico suplementado com vitamina E (500 mg/kg de dieta) com 1 semana de desafio.
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Observa-se um aumento significativo da mieloperoxidase tanto no grupo alérgico como no alérgico suplementado com Vitamina E (500 mg/kg de dieta).

Outro antioxidante, como o selênio orgânico, teria efeitos semelhantes aos da vitamina E, nos parâmetros da alergia alimentar?

4 - RESULTADOS

Suplementação com selênio orgânico (Se)

16. Avaliação do peso corpóreo

O peso dos animais, que foram tratados com uma dieta balanceada e suplementada com selênio orgânico, foi avaliado semanalmente durante 7 semanas.

A Figura 31 representa a avaliação semanal do peso corpóreo dos animais suplementados com selênio orgânico em relação aos não suplementados.

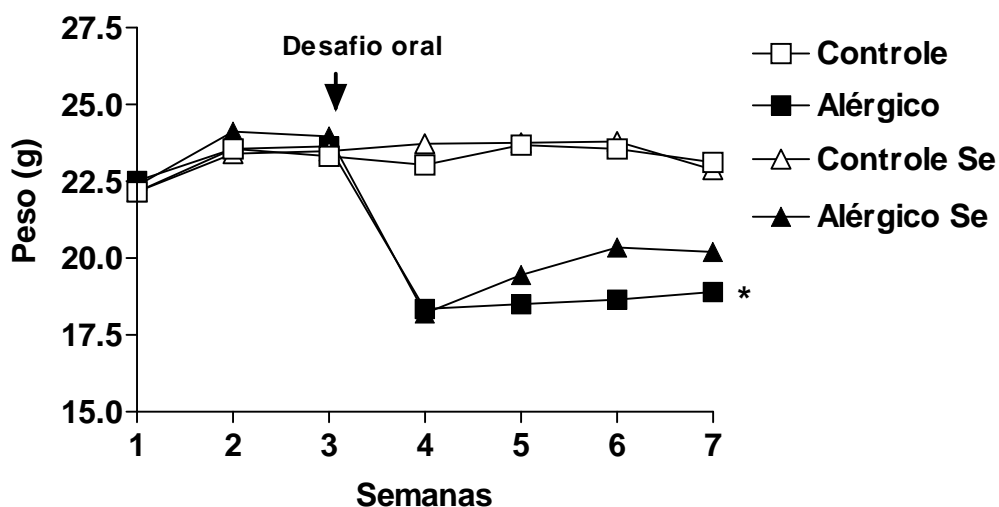


Figura 31: Avaliação do peso corpóreo (Se)

Peso corpóreo em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se).

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Os animais alérgicos e alérgicos tratados com selênio apresentaram uma acentuada perda de peso a partir da terceira semana, que corresponde à primeira semana após o desafio com o antígeno. O grupo alérgico manteve o emagrecimento

até o final do experimento (sétima semana). Já o grupo alérgico, tratado com selênio, apresentou uma recuperação, estatisticamente significativa, do peso corpóreo, a partir da quarta semana e manteve essa recuperação até a última semana de avaliação.

17. Avaliação do consumo de ração

A Figura 32 representa a avaliação semanal do consumo de ração dos animais dos grupos controle e alérgico, tratados ou não com selênio orgânico.

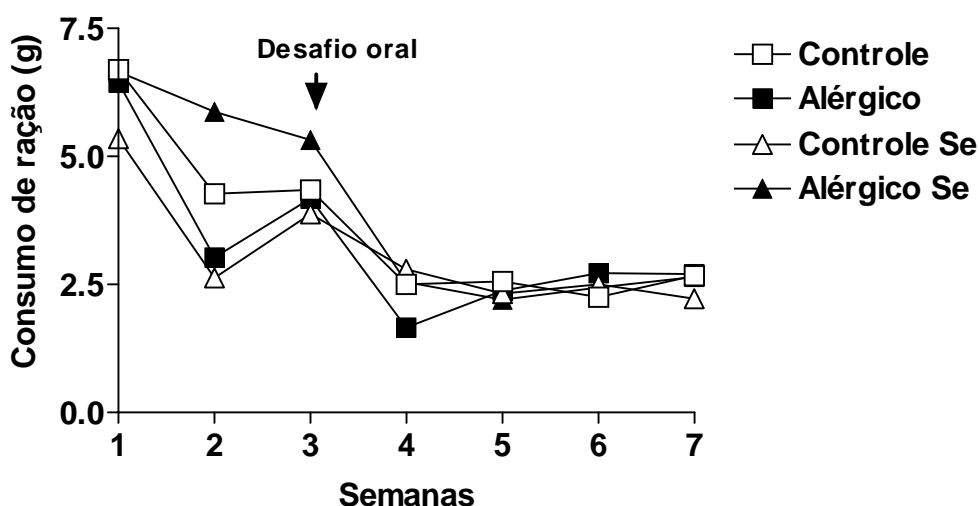


Figura 32: Avaliação do consumo de ração (Se)

Consumo de ração em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se). Até a terceira semana todos os grupos receberam ração balanceada, suplementada ou não com selênio, à base de caseína. A partir da semana 3 todos os grupos foram desafiados com uma ração balanceada à base de ovalbumina, suplementada ou não com selênio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Podemos observar que não houve diferença estatística no consumo de ração dos grupos mostrados no gráfico acima. Apesar de apresentarem uma diminuição do consumo de ração durante o desafio, ou seja, quando ocorre a troca da dieta, essa diminuição ocorreu em todos os grupos.

18. Avaliação dos anticorpos dos isotipos IgE e IgG1

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo alérgico é a dosagem de anticorpos dos isotipos IgE e IgG1. Como mostram as Figuras 33 e 34, a produção da IgE e da IgG1 dos grupos alérgico e alérgico suplementado com selênio orgânico, foi estatisticamente maior quando comparada aos seus respectivos grupos controles tanto com 1 semana de desafio quanto com 4 semanas de desafio.

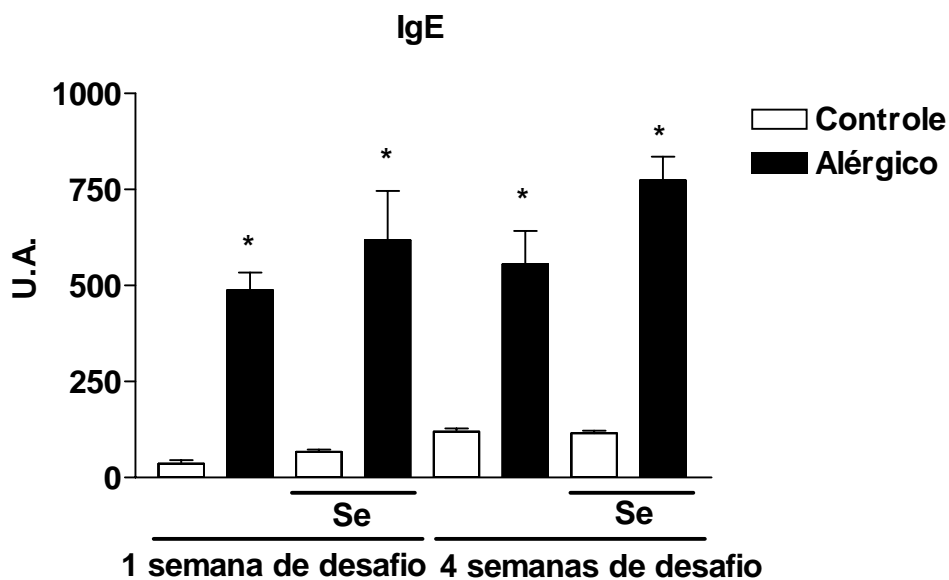


Figura 33: Avaliação da produção da imunoglobulina E (Se) Quantificação, da imunoglobulina E (IgE) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) com 1 e 4 semanas de desafio.
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

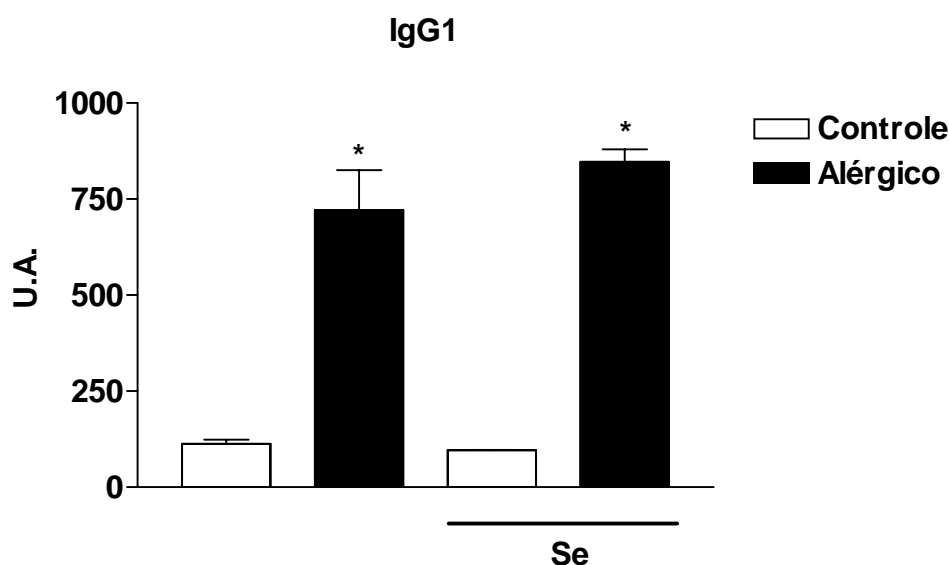


Figura 34: Avaliação da produção da imunoglobulina G1 (Se)
 Quantificação, da imunoglobulina G1 (IgG1) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) com 1 semana de desafio.
 *p<0,05 em relação aos grupos controles

19. Avaliação da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

Um outro parâmetro da alergia alimentar avaliado foi a produção de muco pelas células caliciformes, situadas nas vilosidades de todo o intestino delgado. O intestino foi dividido em 4 partes: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada um desses segmentos de cinco animais de cada grupo. Esses campos foram analisados através de um programa de computador (KS300) que quantifica através da medida da área desejada, nesse caso, a área onde se verificou a presença de muco através da coloração de P.A.S.. As Figuras 35, 36, 37 e 38 representam a área de muco em micrômetros quadrados por campo de cada segmento do intestino delgado.

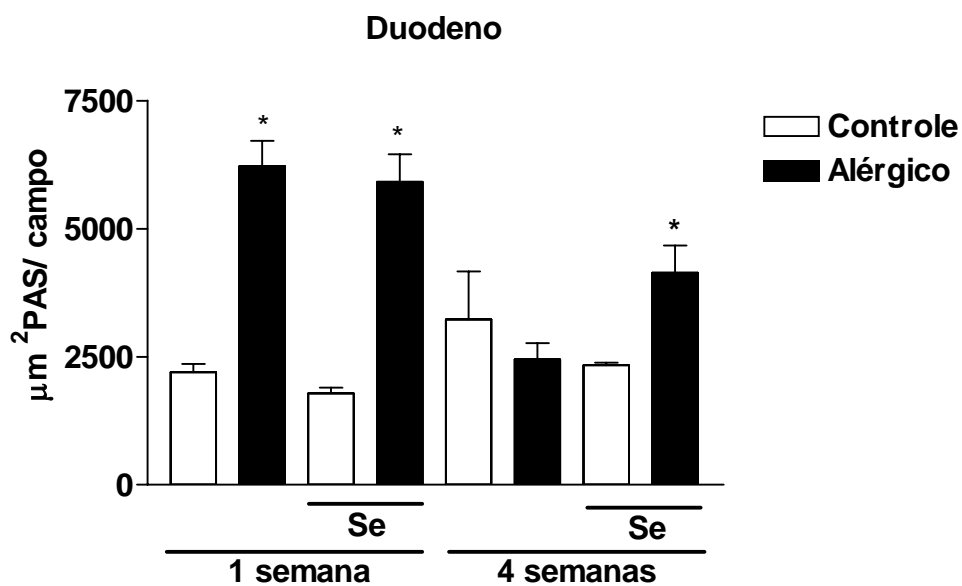


Figura 35: Avaliação da produção de muco no duodeno (Se)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

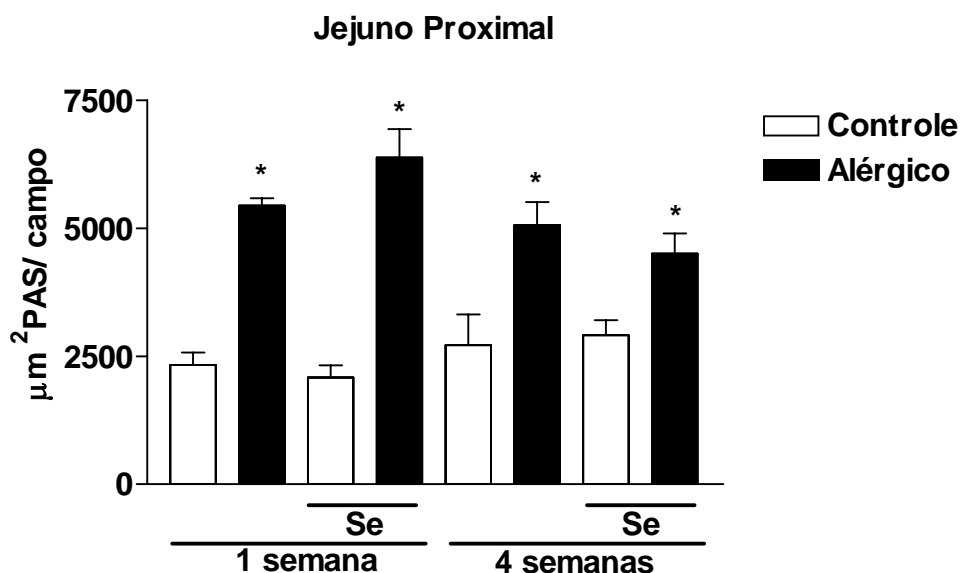


Figura 36: Avaliação da produção de muco no jejuno proximal (Se)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

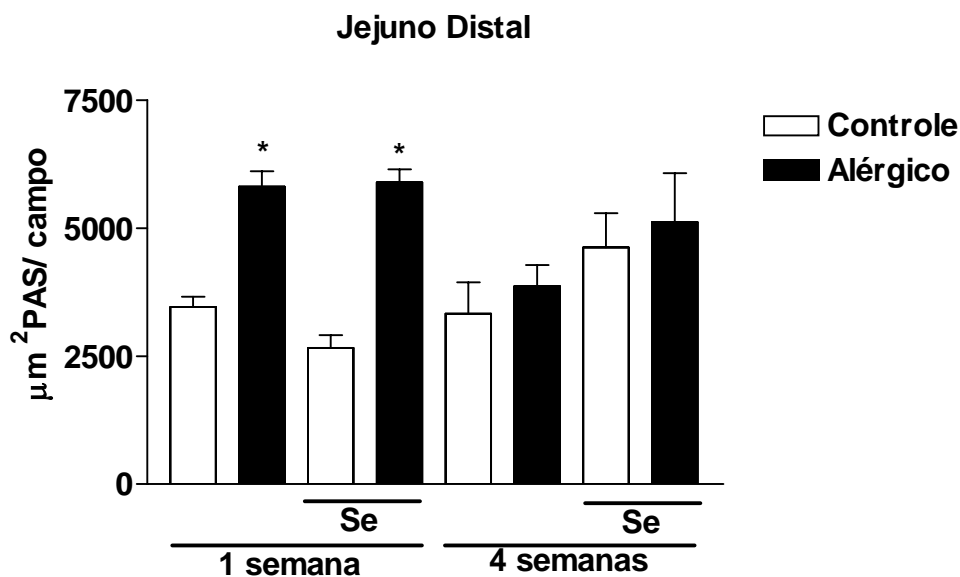


Figura 37: Avaliação da produção de muco no jejuno distal (Se)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

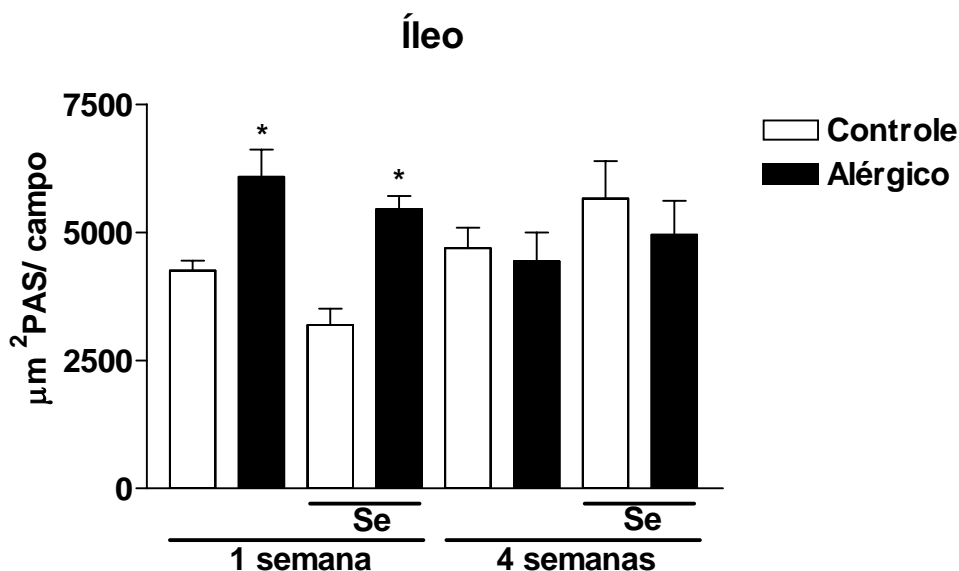


Figura 38: Avaliação da produção de muco no íleo (Se)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Quando analisamos o muco produzido, no duodeno, na primeira semana de desafio, verificamos que os animais dos grupos alérgico e alérgico suplementado com selênio orgânico apresentaram uma quantidade maior de muco, estatisticamente significativa. O grupo alérgico suplementado com selênio manteve esse aumento quando analisado após 4 semanas de desafio.

Quando analisamos o muco produzido, no jejuno proximal, tanto na primeira semana quanto na quarta semana após o desafio, verificamos que os animais dos grupos alérgico e alérgico suplementado com selênio orgânico apresentaram uma quantidade maior de muco, estatisticamente significativa. A avaliação histológica do muco no jejuno proximal com uma semana de desafio pode ser observada na Figura 68. No jejuno distal e no íleo, verificamos que os animais dos grupos alérgico e alérgico suplementado com selênio orgânico apresentaram uma quantidade maior de muco, estatisticamente significativa, na primeira semana de desafio. Esta mesma análise realizada após 4 semanas de desafio, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

20. Avaliação do infiltrado de eosinófilos na mucosa do intestino delgado

O número de eosinófilos na mucosa intestinal é um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo inflamatório na alergia alimentar. Para essa análise, o intestino delgado foi dividido em 4 segmentos: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram analisados 10 campos aleatórios de cada segmento de cinco animais de cada grupo. As Figuras 39, 40, 41 e 42 representam o número de eosinófilos por campo de cada segmento do intestino delgado.

No duodeno podemos observar que o número de eosinófilos do grupo alérgico é maior que o do seu controle e o controle suplementado com selênio é maior que o controle, quando analisados na primeira semana de desafio. Na quarta semana de desafio não foram detectadas diferenças estatísticas nesta porção.

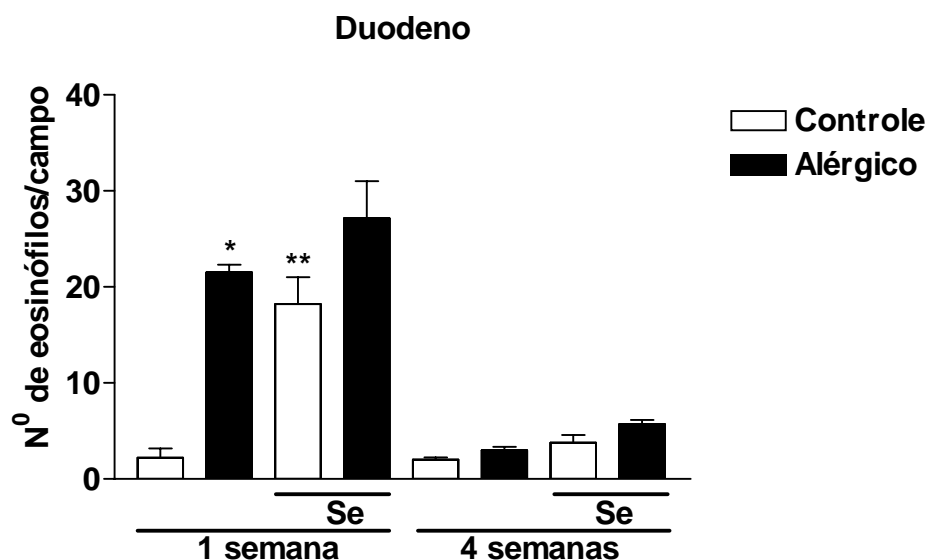


Figura 39: Avaliação de eosinófilos no duodeno (Se)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0), realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ controle em relação a outro controle

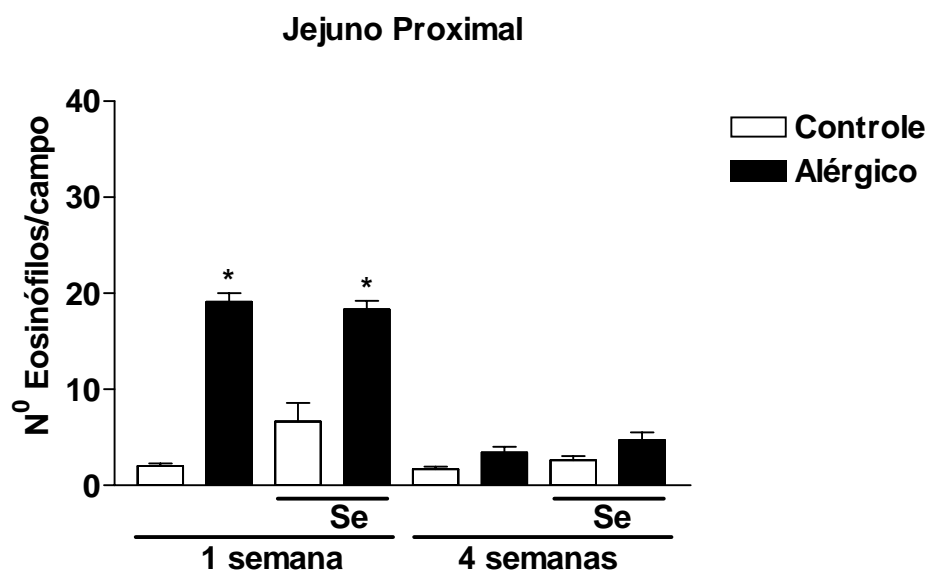


Figura 40: Avaliação de eosinófilos no jejuno proximal (Se)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0), realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

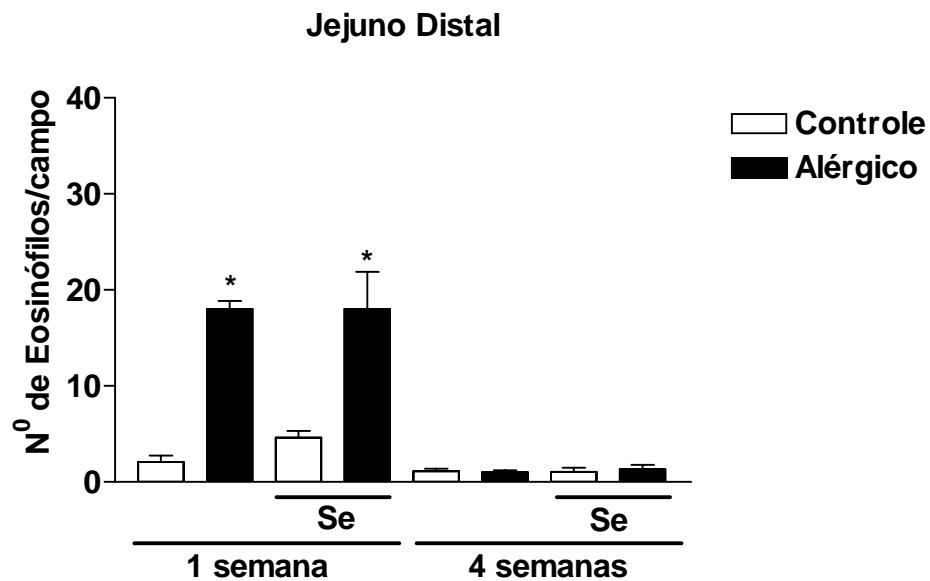


Figura 41: Avaliação de eosinófilos no jejuno distal (Se)
 Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0), realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos control

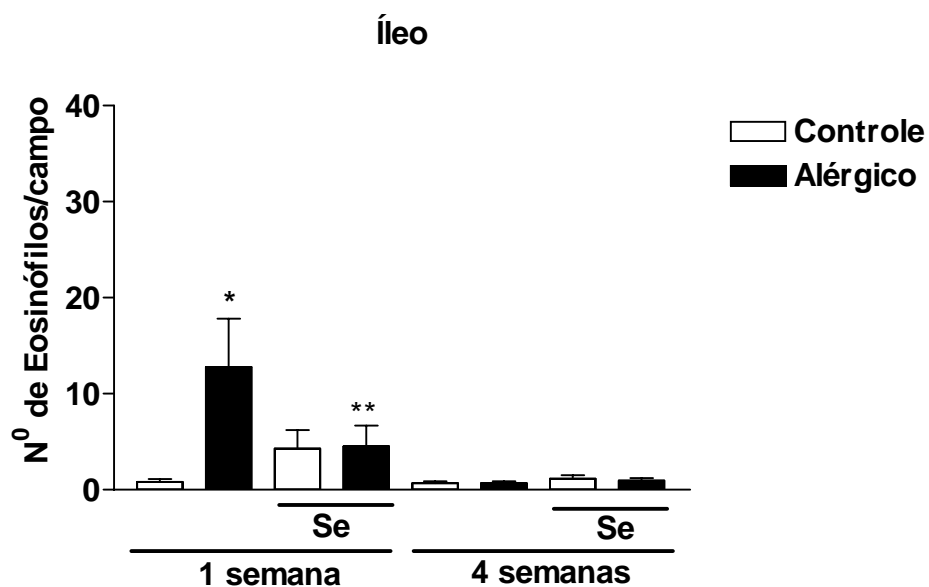


Figura 42: Avaliação de eosinófilos no íleo (Se)
 Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0), realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico (Se) e alérgico suplementado com selênio orgânico (Se) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles
 ** $p < 0,05$ em relação a outro alérgico

Os grupos alérgico e alérgico suplementado com selênio apresentaram no jejuno proximal e no jejuno distal números de eosinófilos muito maiores do que seus grupos controles, quando analisados na primeira semana de desafio. Na quarta semana de desafio não foram detectadas diferenças estatísticas nestas porções.

Já na última porção do intestino delgado, íleo, somente o grupo alérgico apresentou maior número de eosinófilos em relação ao seu controle e o grupo alérgico suplementado com selênio apresentou menor número de eosinófilos em relação a grupo alérgico quando analisados na primeira semana de desafio.

21. Avaliação de neutrófilos na mucosa do intestino delgado

A Figura 43 refere-se à avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal.

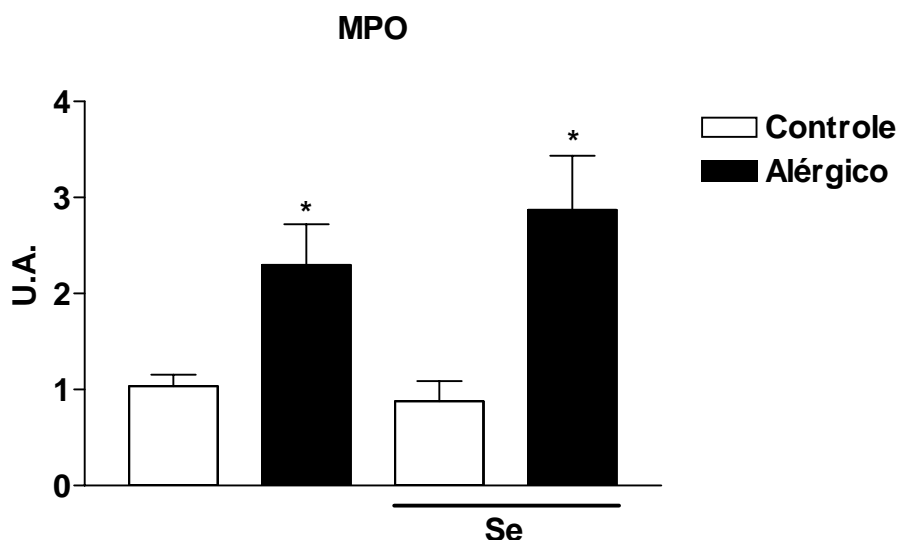


Figura 43: Avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal (Se)
Quantificação, da mieloperoxidase (MPO) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com selênio orgânico e alérgico suplementado com selênio orgânico com 1 semana de desafio.
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Observa-se um aumento significativo da mieloperoxidase tanto no grupo alérgico como no alérgico suplementado com selênio orgânico.

O tratamento com aminoguanidina teria algum efeito nos parâmetros da alergia alimentar em camundongos?

5 - RESULTADOS

Tratamento com aminoguanidina (AG)

22. Avaliação do peso corpóreo

O peso dos animais, que foram tratados com uma dieta balanceada e acrescida de aminoguanidina (AG), foi avaliado semanalmente durante 7 semanas. Os animais alérgicos e alérgicos tratados com aminoguanidina apresentaram uma acentuada perda de peso a partir da terceira semana, que corresponde à primeira semana após o desafio com o antígeno. Os grupos alérgico e alérgico tratado com aminoguanidina mantiveram o emagrecimento até o final do experimento (semana 7). A Figura 44 representa a avaliação semanal do peso corpóreo em gramas (g) dos animais tratados com aminoguanidina em relação aos não tratados.

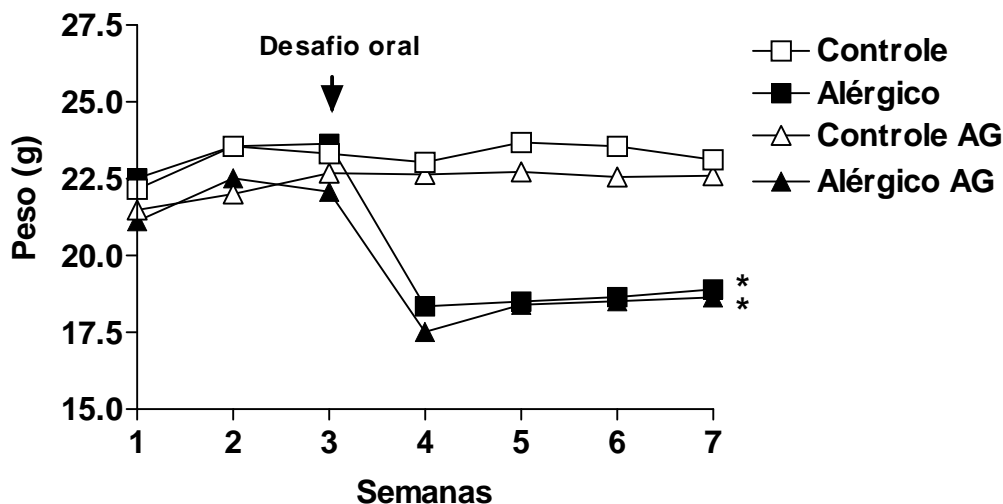


Figura 44: Avaliação do peso corpóreo (AG)

Peso corpóreo em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina (AG).

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

23. Avaliação do consumo de ração

A Figura 45 representa a avaliação semanal do consumo de ração dos animais tratados e não tratados com aminoguanidina (AG).

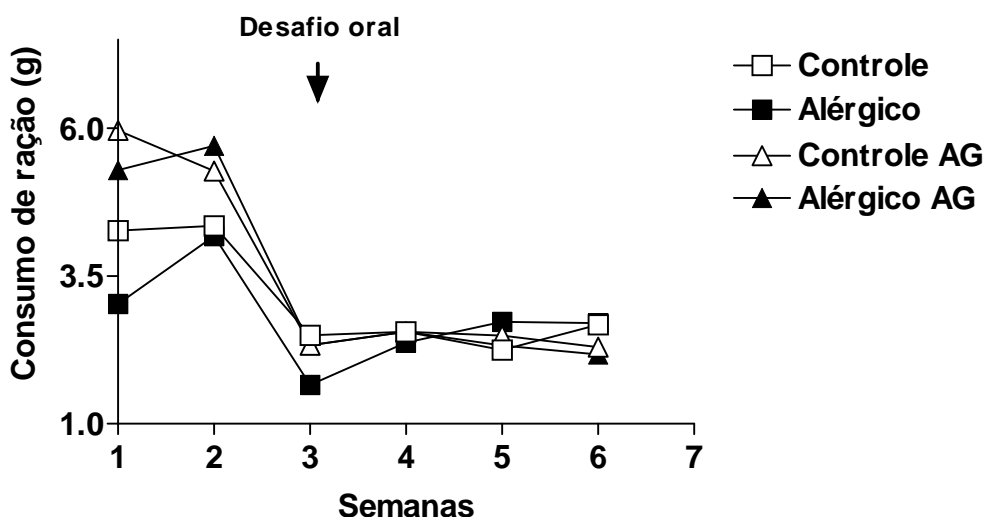


Figura 45: Avaliação do peso corpóreo (AG)

Consumo de ração em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina (AG). Até a terceira semana todos os grupos receberam ração balanceada, suplementada ou não com vitamina E, à base de caseína. A partir da semana 3 todos os grupos foram desafiados com uma ração balanceada à base de ovalbumina, suplementada ou não com aminoguanidina (AG).

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Podemos observar que não houve diferença estatística no consumo de ração dos grupos mostrados no gráfico acima. Apesar de apresentarem uma diminuição do consumo de ração depois do desafio, ou seja, quando ocorre a troca da dieta, essa diminuição ocorreu em todos os grupos.

24. Avaliação dos anticorpos dos isotipos IgE e IgG1

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo alérgico é a dosagem de anticorpos dos isotipos IgE e IgG1. Como mostram as Figuras 46 e 47, a produção da IgE e da IgG1 dos grupos alérgico e alérgico tratado com aminoguanidina, foi estatisticamente maior quando comparada aos seus respectivos grupos controles com 1 e 4 semanas de desafio.

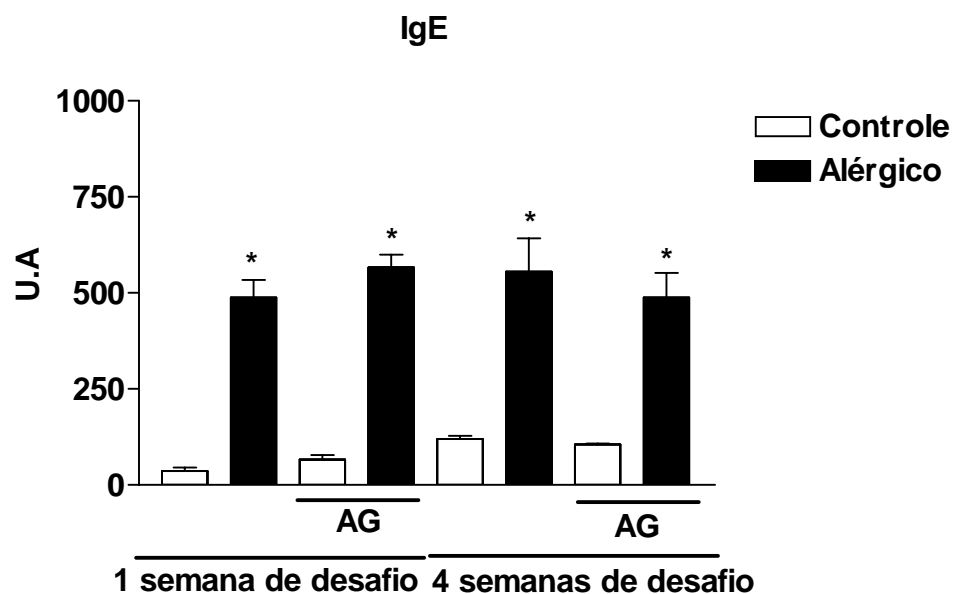


Figura 46: Avaliação da produção da imunoglobulina E (AG)
 Quantificação, da imunoglobulina E (IgE) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina (AG).

*p<0,05 em relação aos grupos controles

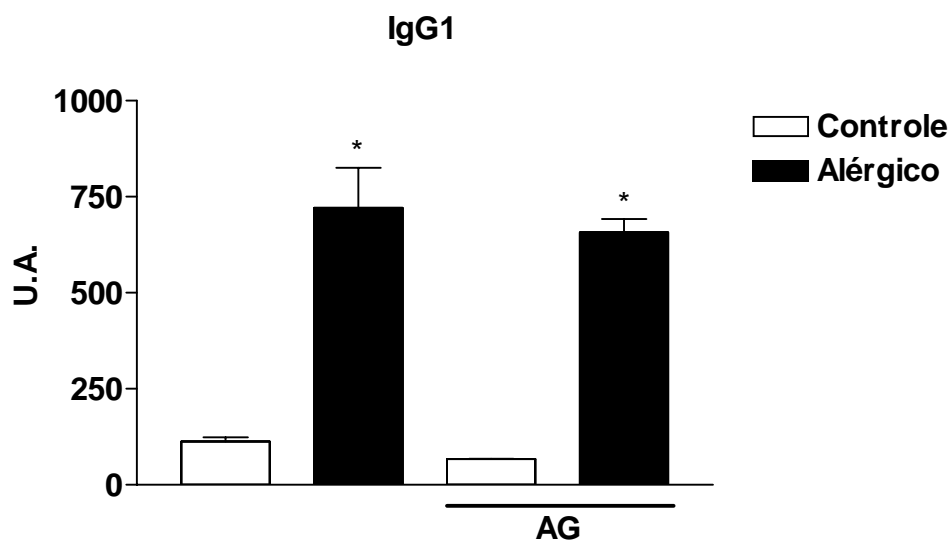


Figura 47: Avaliação da produção da imunoglobulina G1 (AG)
 Quantificação, da imunoglobulina G1 (IgG1) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina (AG).

*p<0,05 em relação aos grupos controles

25. Avaliação da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

Um outro parâmetro da alergia alimentar avaliado foi a produção de muco pelas células caliciformes, situadas nas vilosidades de todo o intestino delgado. O intestino foi segmentado em 4 partes designadas duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram selecionados, aleatoriamente, 3 campos de cada um desses segmentos de cinco animais de cada grupo. Esses campos foram analisados através de um programa de computador (KS300) que quantifica através da medida da área desejada, nesse caso, a área onde verificamos a presença de muco através da coloração de P.A.S.. As Figuras 48, 49, 50 e 51 representam a área de muco em micrômetros quadrados por campo de cada segmento do intestino delgado.

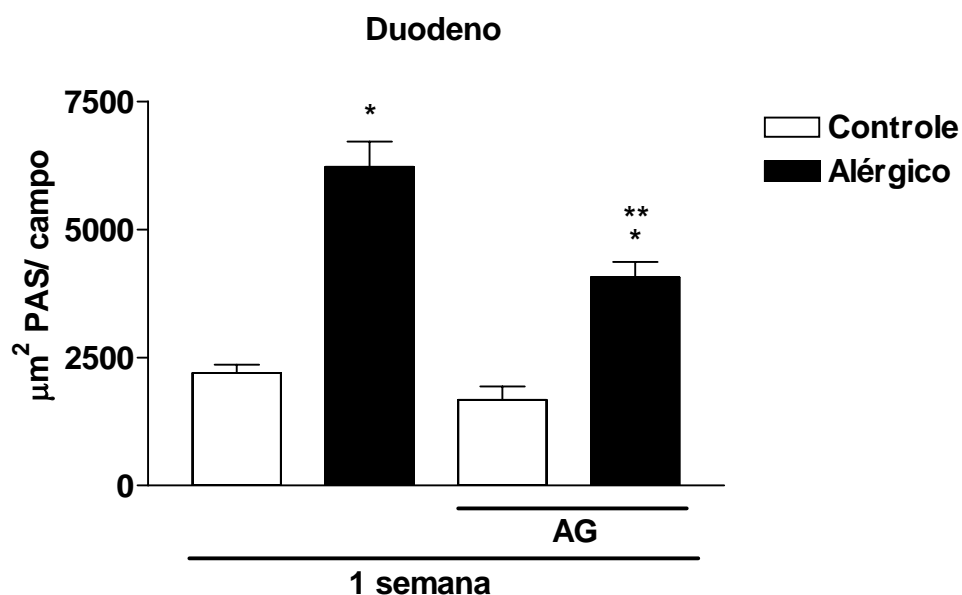


Figura 48: Avaliação da produção de muco no duodeno (AG)

Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina (AG) em um tempo: 1 semana de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

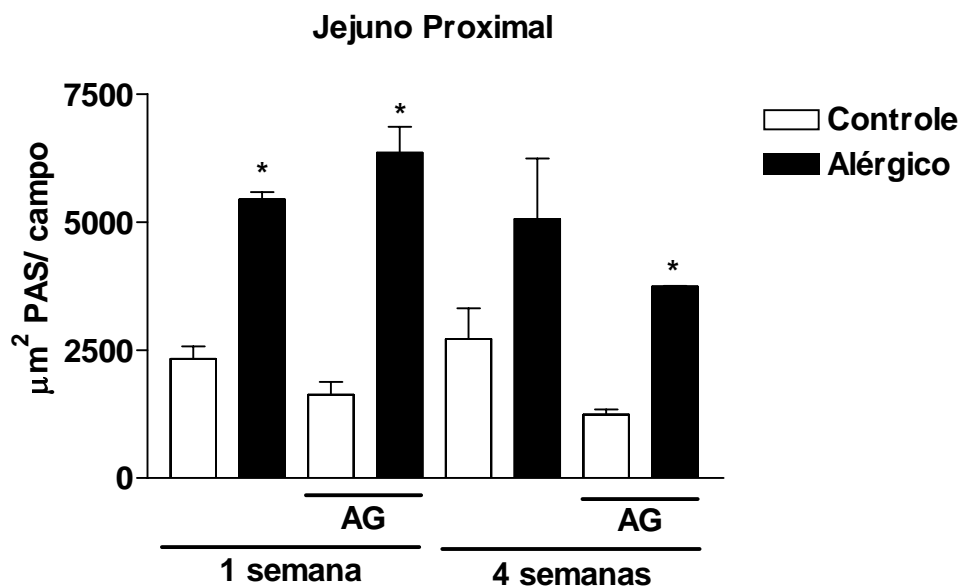


Figura 49: Avaliação da produção de muco no jejuno proximal (AG)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina (AG) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

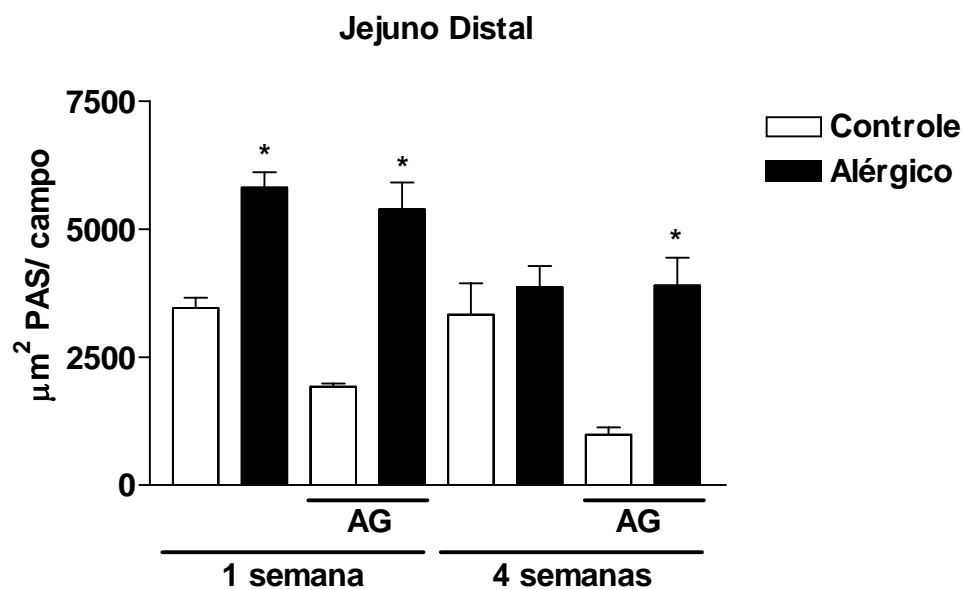


Figura 50: Avaliação da produção de muco no jejuno distal (AG)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina (AG) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

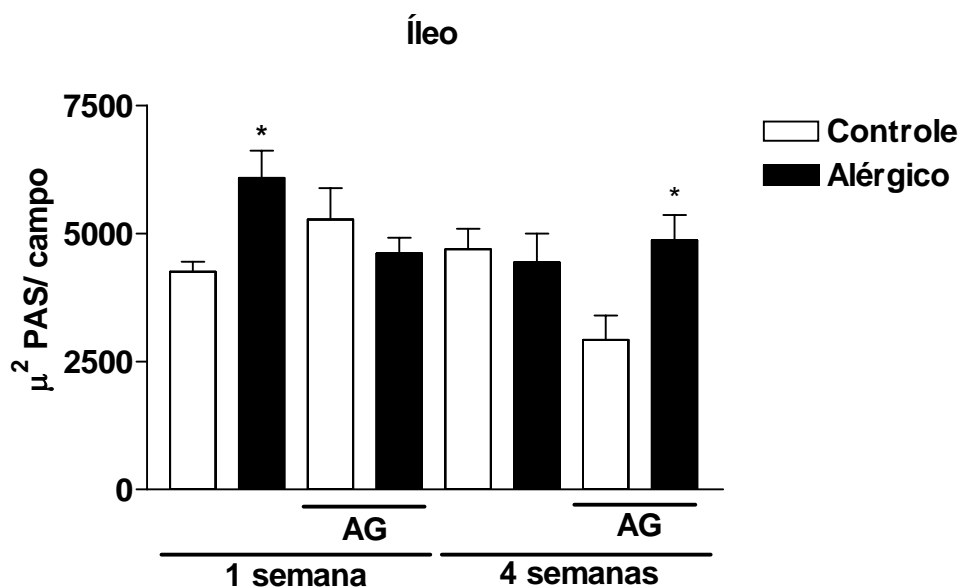


Figura 51: Avaliação da produção de muco no íleo (AG)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle tratado com aminoguanidina (AG) e alérgico tratado com aminoguanidina em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar um aumento na quantidade de muco produzido pelas células caliciformes do duodeno dos animais alérgicos e alérgicos tratados com aminoguanidina (AG), em relação aos seus respectivos grupos controles, com uma semana de desafio. Quando comparamos os dois grupos alérgicos observamos uma diminuição do muco nos animais alérgicos tratados com AG.

No jejuno proximal e distal, observa-se um aumento de muco nos animais alérgicos e alérgicos tratados com AG quando comparados aos seus controles, com uma semana de desafio. A avaliação histológica do muco no jejuno proximal pode ser observada na Figura 68. Já com quatro semanas de desafio observamos um aumento de muco somente nos animais alérgicos tratados com AG.

No íleo, ocorreu aumento de muco somente no grupo alérgico com uma semana de desafio. E no grupo alérgico tratado com AG com quatro semanas de desafio.

26. Avaliação do infiltrado de eosinófilos na mucosa do intestino delgado

O número de eosinófilos na mucosa intestinal é um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo inflamatório na alergia alimentar. Para essa análise, o intestino delgado foi dividido em 4 segmentos: duodeno, jejuno proximal, jejuno

distal e íleo. Foram analisados 10 campos aleatórios de cada segmento de cinco animais de cada grupo. As Figuras 52, 53 e 54 representam o número de eosinófilos por campo de cada segmento do intestino delgado.

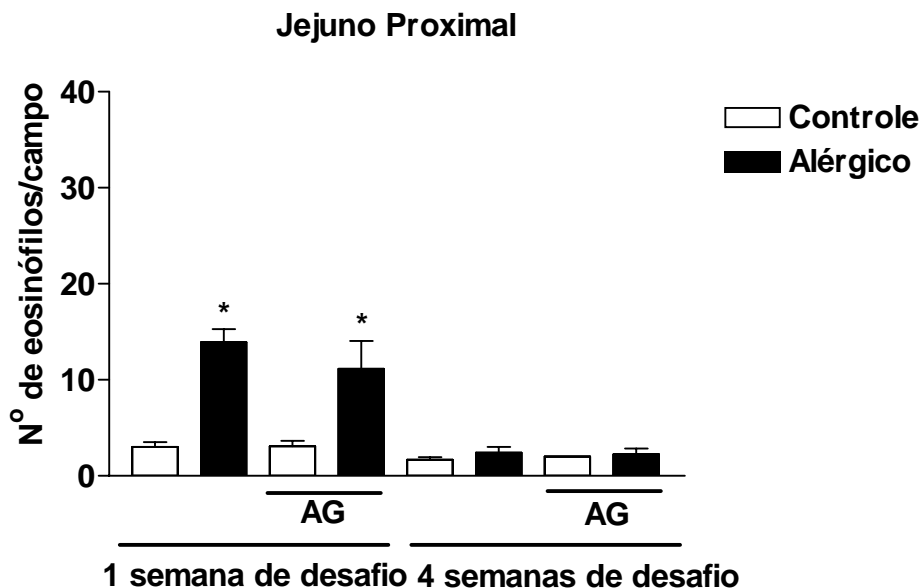


Figura 52: Avaliação de eosinófilos no jejuno proximal (AG)
 Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0), realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com aminoguanidina (AG) e alérgico suplementado com aminoguanidina (AG) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

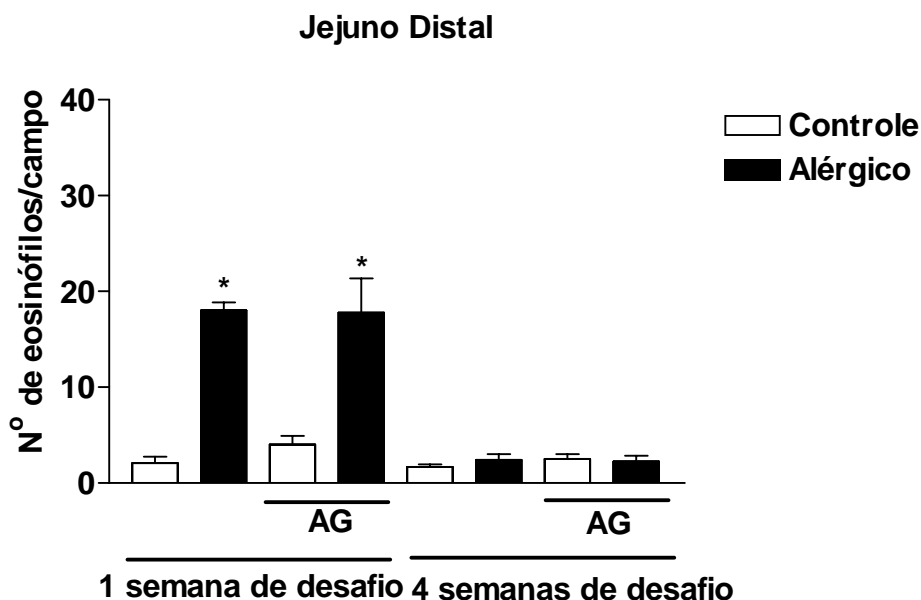


Figura 53: Avaliação de eosinófilos no jejuno distal (AG)
 Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0), realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com aminoguanidina (AG) e alérgico suplementado com aminoguanidina (AG) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

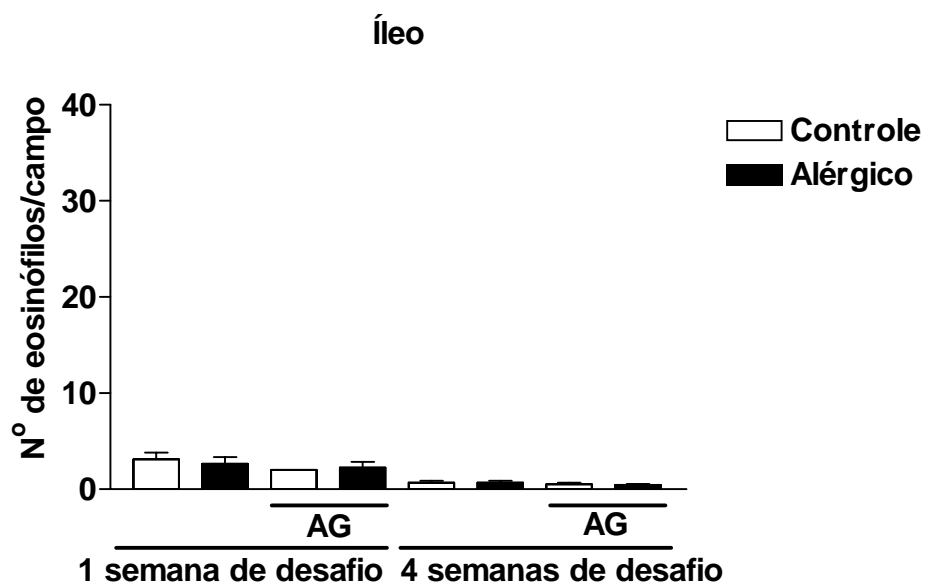


Figura 54: Avaliação de eosinófilos no íleo (AG)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0), realizada no Íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com aminoguanidina (AG) e alérgico suplementado com aminoguanidina (AG) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar que ocorreu um aumento no número de eosinófilos no jejuno proximal e distal dos animais dos grupos alérgico e alérgico tratado com aminoguanidina (AG) na primeira semana de desafio. Na quarta semana de desafio não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

No íleo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tanto na primeira quanto na quarta semana de desafio.

27. Avaliação de neutrófilos na mucosa do intestino delgado

A Figura 55 refere-se à avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal.

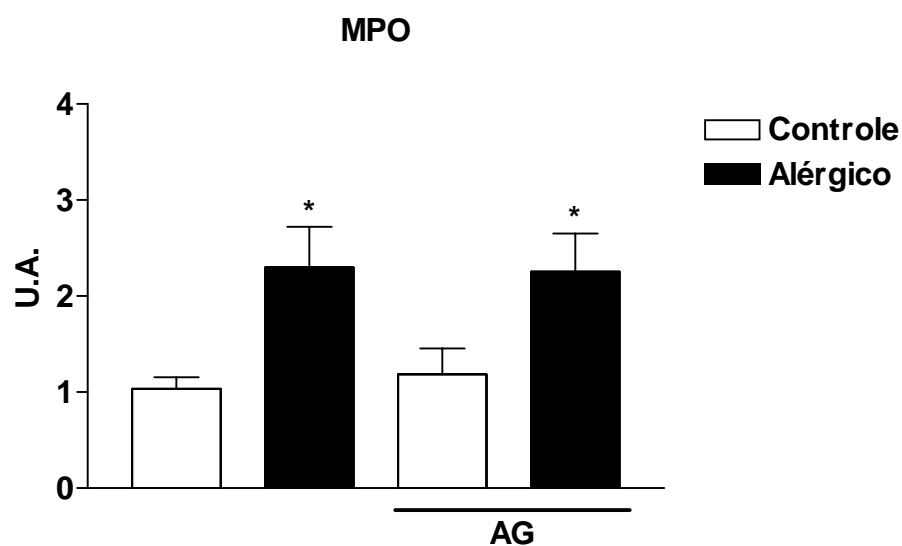


Figura 55: Avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal (AG)
 Quantificação, da mieloperoxidase (MPO) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com aminoguanidina e alérgico suplementado com aminoguanidina com 1 semana de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Observa-se um aumento significativo da mieloperoxidase tanto no grupo alérgico como no alérgico suplementado com aminoguanidina.

Todas as suplementações juntas teriam algum efeito no modelo de alergia alimentar?

6 - RESULTADOS

Todas as Suplementações (TS) Juntas (selênio orgânico, vitamina E e aminoguanidina)

28. Avaliação do peso corpóreo

O peso dos animais, que foram tratados com uma dieta balanceada e suplementada com todas as suplementações (TS) (selênio orgânico, vitamina E e aminoguanidina), foi avaliado semanalmente durante 7 semanas.

A Figura 56 representa a avaliação semanal do peso corpóreo dos animais suplementados em relação aos não suplementados.

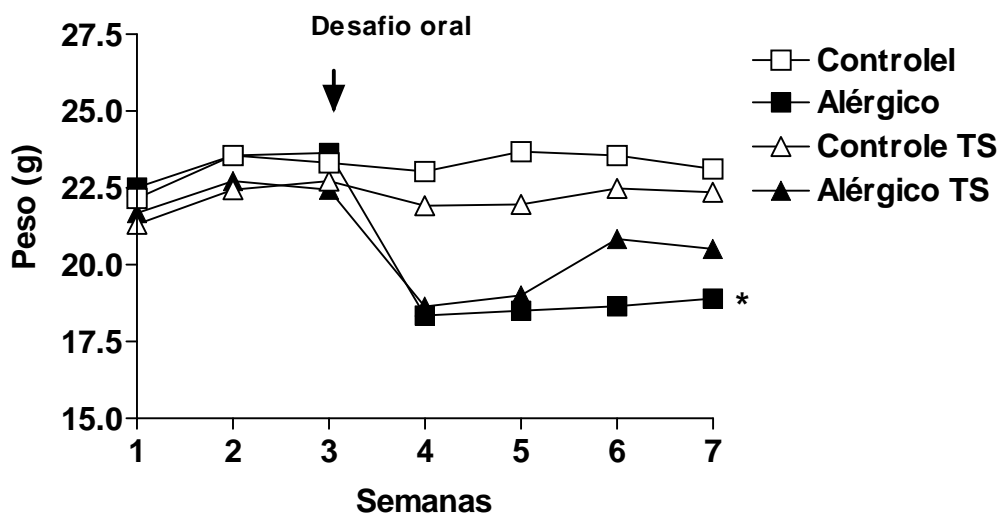


Figura 56: Avaliação do peso corpóreo (TS)

Peso corpóreo em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS).

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Os animais alérgicos e alérgicos suplementados com TS apresentaram uma acentuada perda de peso a partir da terceira semana, que corresponde à primeira semana após o desafio com o antígeno. O grupo alérgico manteve o emagrecimento

até o final do experimento (sétima semana). Já o grupo alérgico, suplementado, apresentou uma recuperação, estatisticamente significativa, do peso corpóreo, a partir da quarta semana e manteve essa recuperação até a última semana de avaliação.

29. Avaliação do consumo de ração

A Figura 57 representa a avaliação semanal do consumo de ração dos animais dos grupos controle e alérgico suplementados com TS (selênio orgânico, vitamina E e aminoguanidina) ou não.

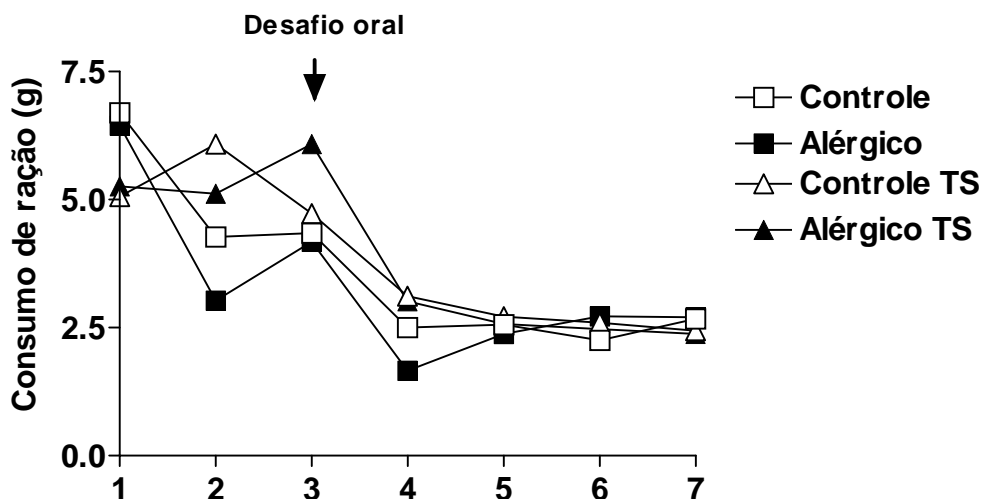


Figura 57: Avaliação do consumo de ração (TS)

Consumo de ração em gramas (g), avaliado por sete semanas, de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS). Até a terceira semana todos os grupos receberam ração balanceada, suplementada ou não, à base de caseína. A partir da semana 3 todos os grupos foram desafiados com uma ração balanceada à base de ovalbumina, suplementada ou não.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Podemos observar que não houve diferença estatística no consumo de ração dos grupos mostrados no gráfico acima. Apesar de apresentarem uma diminuição do consumo de ração depois do desafio, ou seja, quando ocorre a troca da dieta, essa diminuição ocorreu em todos os grupos.

30. Avaliação dos anticorpos dos isotipos IgE e IgG1

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo alérgico é a dosagem de anticorpos dos isotipos IgE e IgG1. Como mostram as Figuras 58 e 59, a produção da IgE e da IgG1 dos grupos alérgico e alérgico suplementado com TS, foi estatisticamente maior quando comparada aos seus respectivos grupos controles.

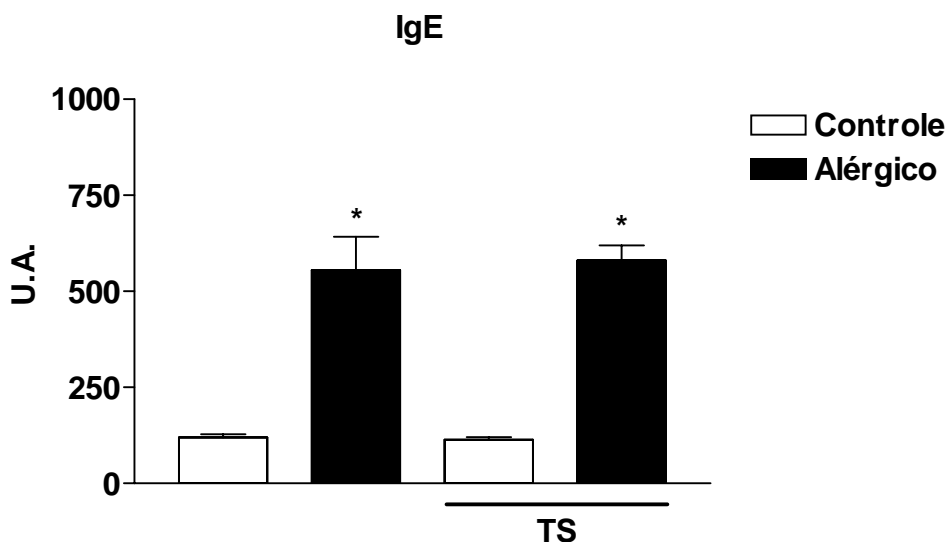


Figura 58: Avaliação da produção da imunoglobulina E (TS)
Quantificação, da imunoglobulina E (IgE) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS).
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

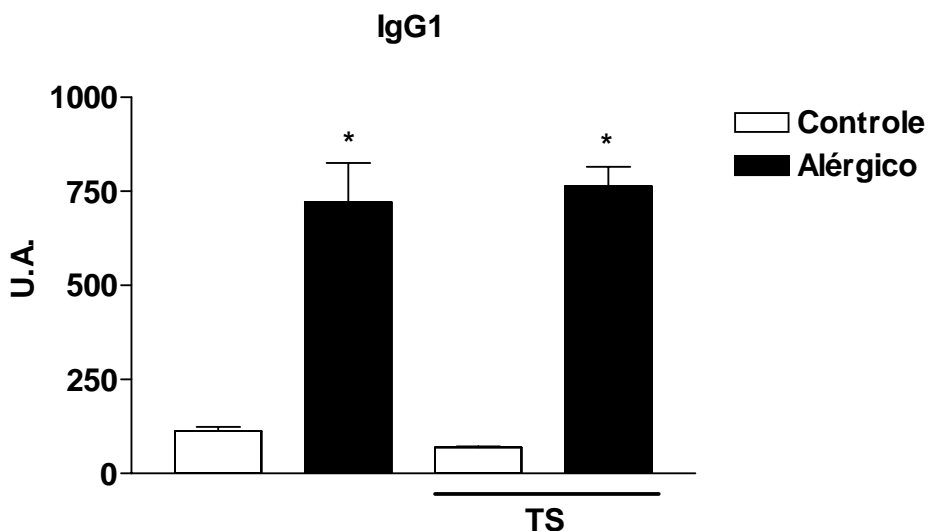


Figura 59: Avaliação da produção da imunoglobulina G1 (TS)
Quantificação, da imunoglobulina G1 (IgG1) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS). * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

31. Avaliação da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

Um outro parâmetro da alergia alimentar avaliado foi a produção de muco pelas células caliciformes, situadas nas vilosidades de todo o intestino delgado. O intestino foi segmentado em 4 partes designadas duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram selecionados aleatoriamente 3 campos de cada um desses segmentos de cinco animais de cada grupo. Esses campos foram analisados através de um programa de computador (KS300) que quantifica através da medida da área desejada, nesse caso, a área onde verificamos a presença de muco através da coloração de P.A.S.. As Figuras 60, 61, 62 e 63 representam a área de muco em micrômetros quadrados por campo de cada segmento do intestino delgado.

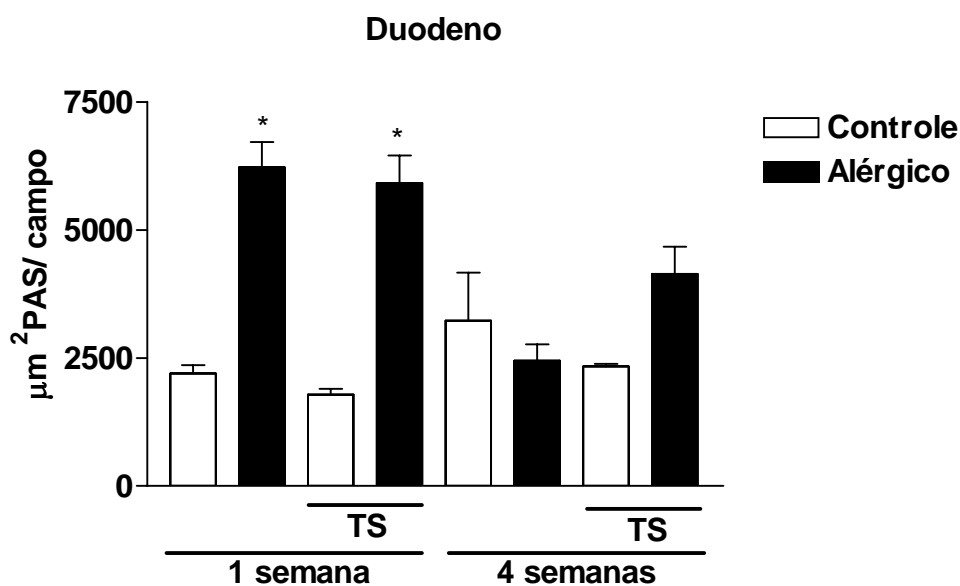


Figura 60: Avaliação da produção de muco no duodeno (TS)

Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no duodeno de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS) em um tempo: 1 semana de desafio

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

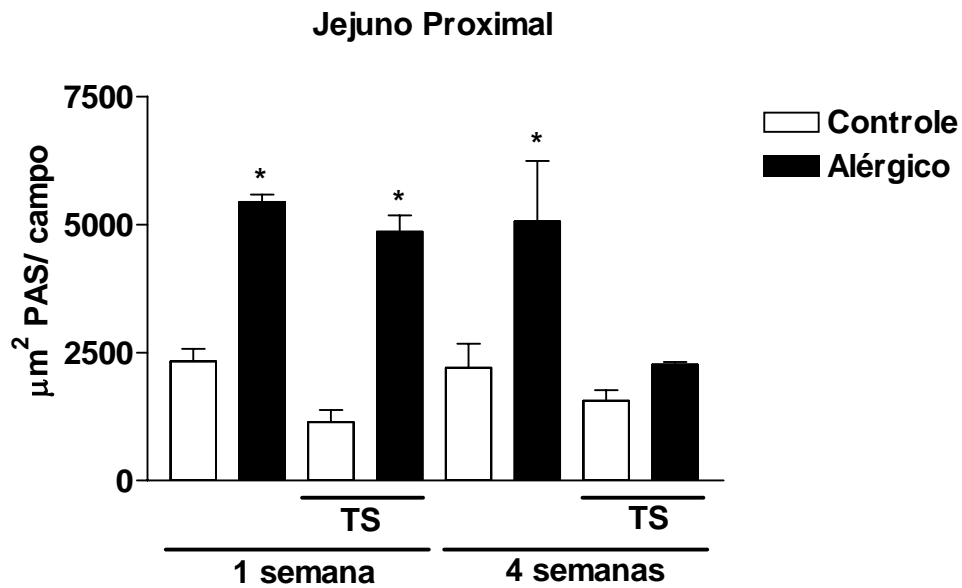


Figura 61: Avaliação da produção de muco no jejuno proximal (TS)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

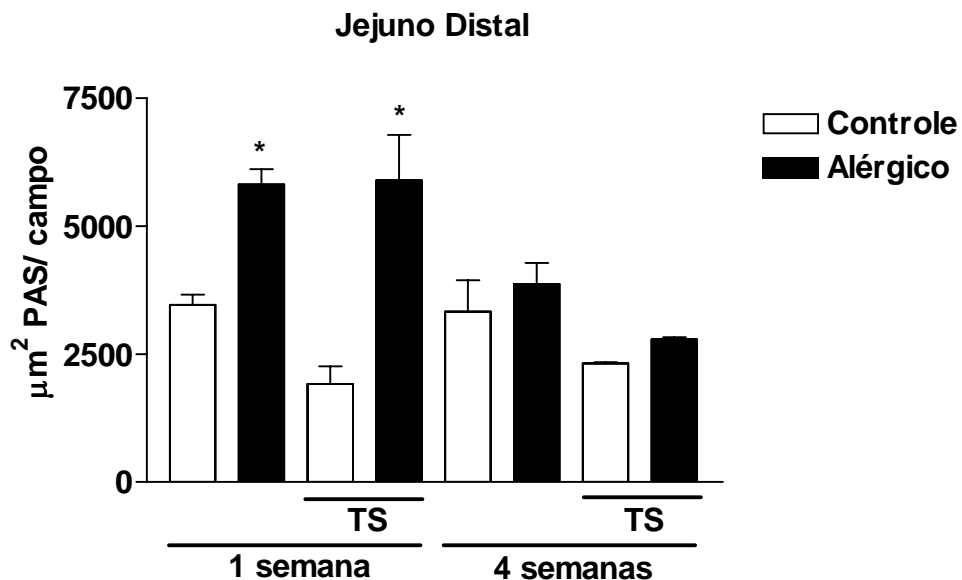


Figura 62: Avaliação da produção de muco no jejuno distal (TS)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

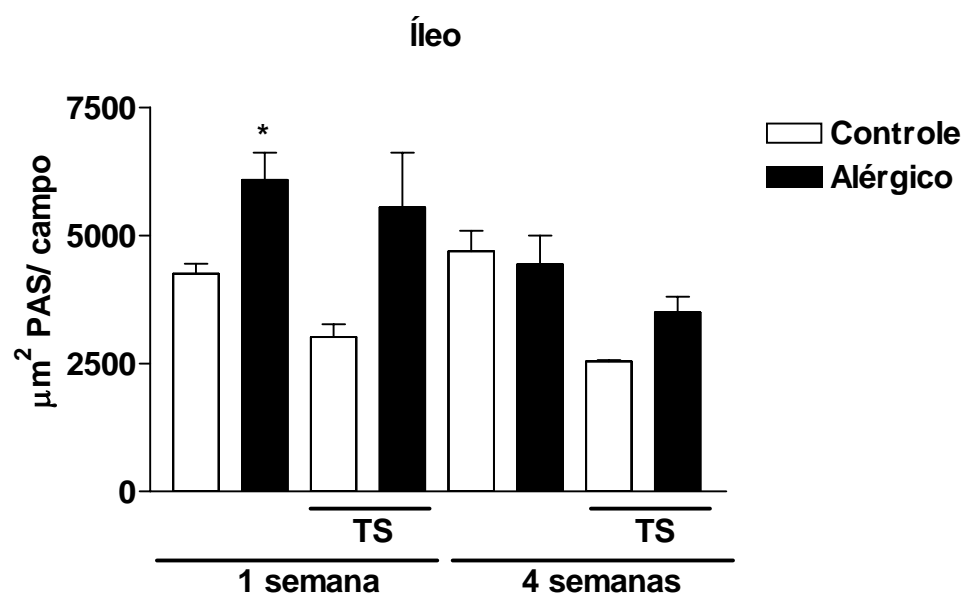


Figura 63: Avaliação da produção de muco no íleo (TS)

Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2) de PAS por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações (TS) e alérgico suplementado com todas as suplementações (TS) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

No duodeno observa-se um aumento significativo da quantidade de muco nos grupos alérgicos na primeira semana de desafio. Na quarta semana não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

O jejuno proximal apresenta um aumento significativo na quantidade de muco nos grupos alérgicos quando comparados com seus grupos controle, na primeira semana de desafio e no grupo alérgico, na quarta semana, quando comparado com seu controle. A avaliação histológica do muco no jejuno proximal com uma semana de desafio pode ser observada na Figura 68.

No jejuno distal observa-se um aumento significativo na quantidade de muco nos grupos alérgicos na primeira semana após o desafio. Na quarta semana não verificamos diferenças significativas entre os grupos.

Já na última porção do intestino delgado, observa-se um aumento significativo somente quando comparamos o grupo alérgico e controle na primeira semana após o desafio.

32. Avaliação do infiltrado de eosinófilos na mucosa do intestino delgado

O número de eosinófilos na mucosa intestinal é um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo inflamatório na alergia alimentar. Para essa análise, o intestino delgado foi dividido em 4 segmentos: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram analisados 10 campos aleatórios de cada segmento de cinco animais de cada grupo. As Figuras 64, 65 e 66 representam o número de eosinófilos por campo de cada segmento do intestino delgado.

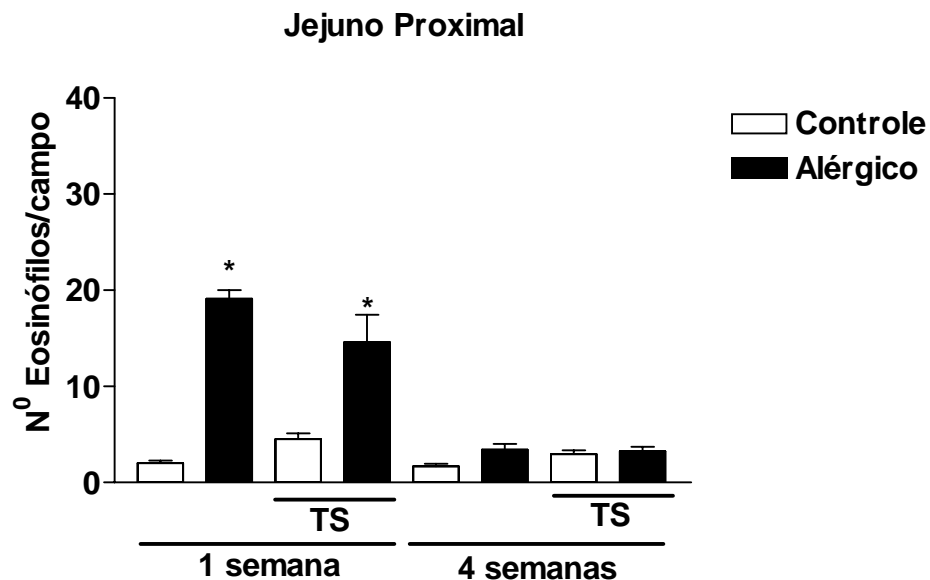


Figura 64: Avaliação de eosinófilos no jejuno proximal (TS)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle com todas as suplementações (TS) e alérgico com todas as suplementações (TS) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ controle em relação a outro controle

Jejuno Distal

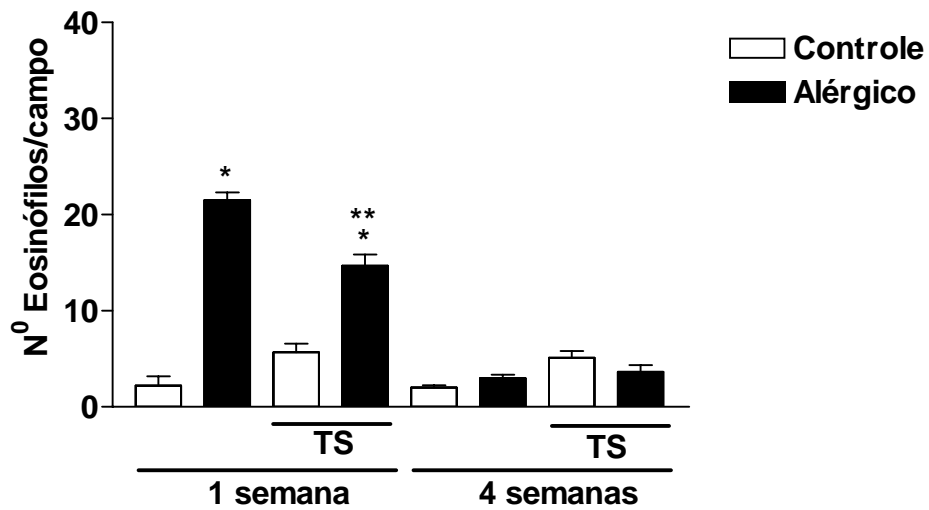


Figura 65: Avaliação de eosinófilos no jejuno distal (TS)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no jejuno distal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle com todas as suplementações (TS) e alérgico com todas as suplementações (TS) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

** $p < 0,05$ em relação a outro alérgico

Íleo

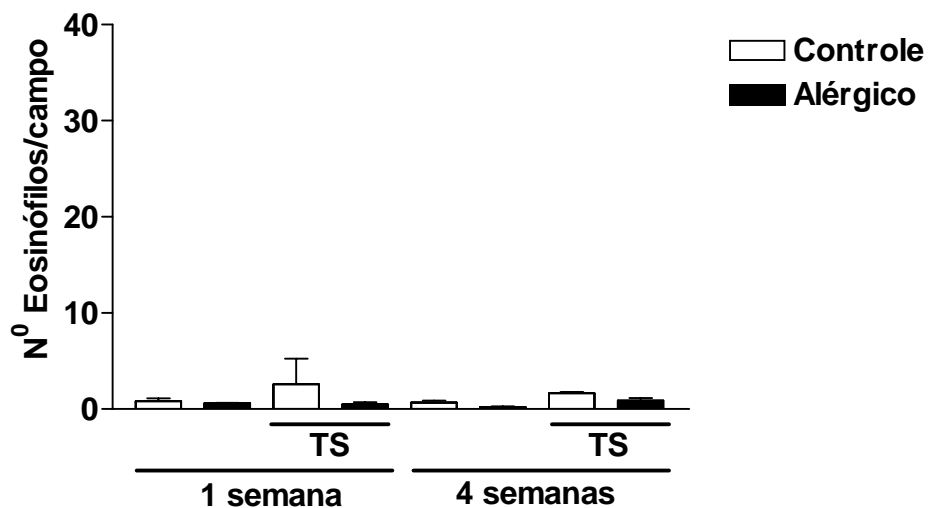


Figura 66: Avaliação de eosinófilos no íleo (TS)

Contagem de eosinófilos, expressa em número de eosinófilos (n^0) por campo, realizada no íleo de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle com todas as suplementações (TS) e alérgico com todas as suplementações (TS) em dois tempos distintos: 1 semana de desafio e 4 semanas de desafio.

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Pode-se observar que ocorreu um aumento no número de eosinófilos nos jejunos proximal e distal dos animais alérgicos e alérgicos que receberam todas as suplementações juntas (TS), quando analisados na primeira semana de desafio. Quando se comparou os grupos alérgicos nesse tempo, verificou-se uma menor quantidade de infiltrado eosinofílico no grupo que recebeu todas as suplementações juntas. Na quarta semana não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

No íleo não se observou diferença estatística tanto com uma semana de desafio quanto com quatro semanas de desafio. Foi observada uma diminuição expressiva no número de eosinófilos, em relação aos outros segmentos analisados, em todos os grupos nos dois tempos.

33. Avaliação de neutrófilos na mucosa do intestino delgado

A Figura 67 refere-se à avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal.

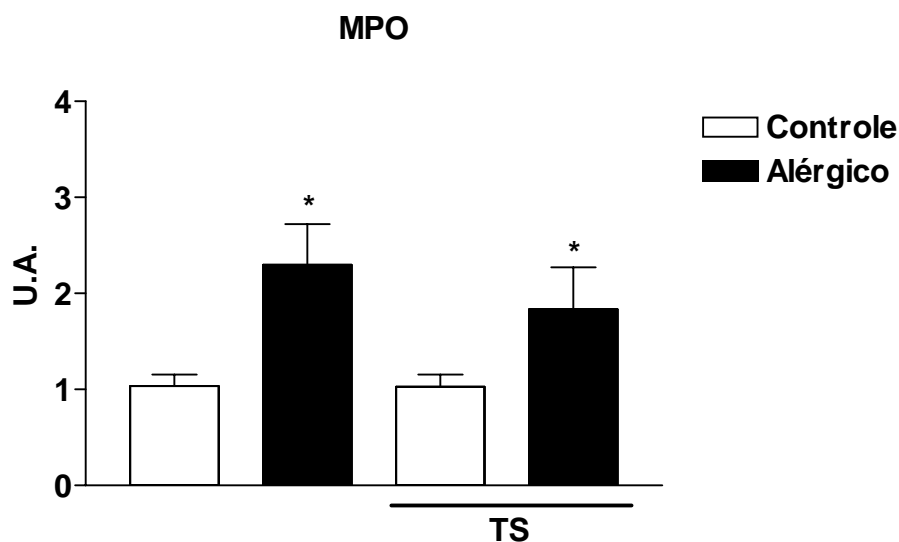
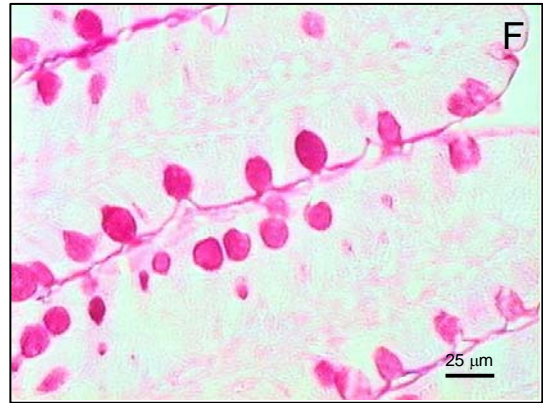
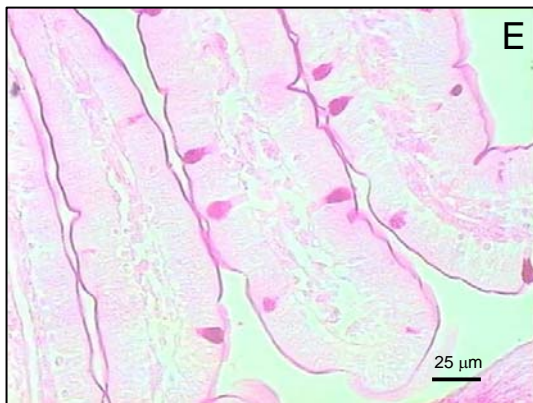
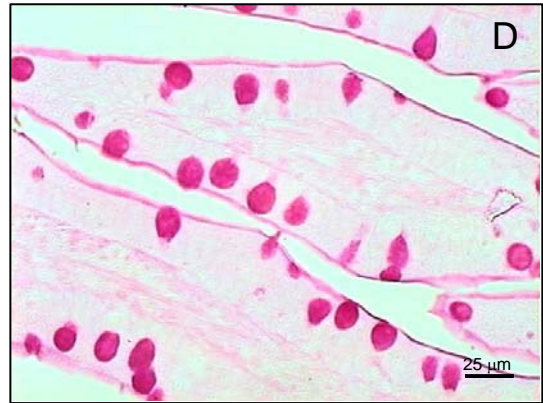
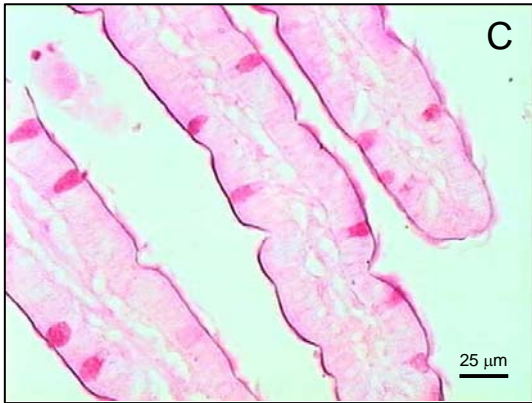
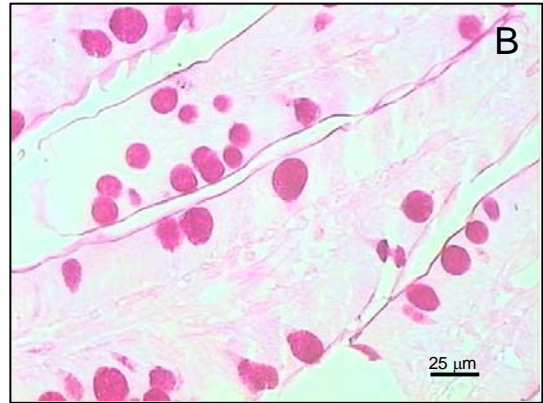
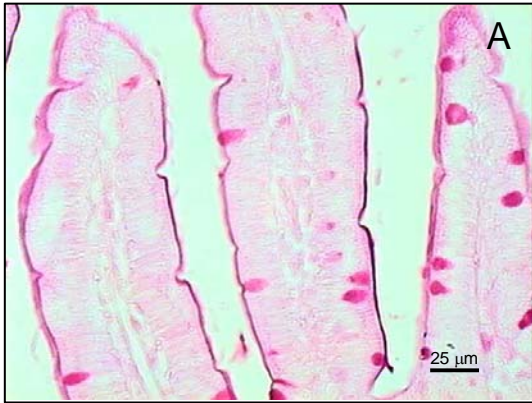


Figura 67: Avaliação da mieloperoxidase no jejuno proximal (TS)
Quantificação, da mieloperoxidase (MPO) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no jejuno proximal de camundongos da linhagem BALB/c divididos em grupos controle, alérgico, controle suplementado com todas as suplementações juntas e alérgico suplementado com todas as suplementações juntas, com 1 semana de desafio.
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Observa-se um aumento significativo da mieloperoxidase tanto no grupo alérgico como no alérgico suplementado com todas as suplementações juntas.

Avaliação histológica



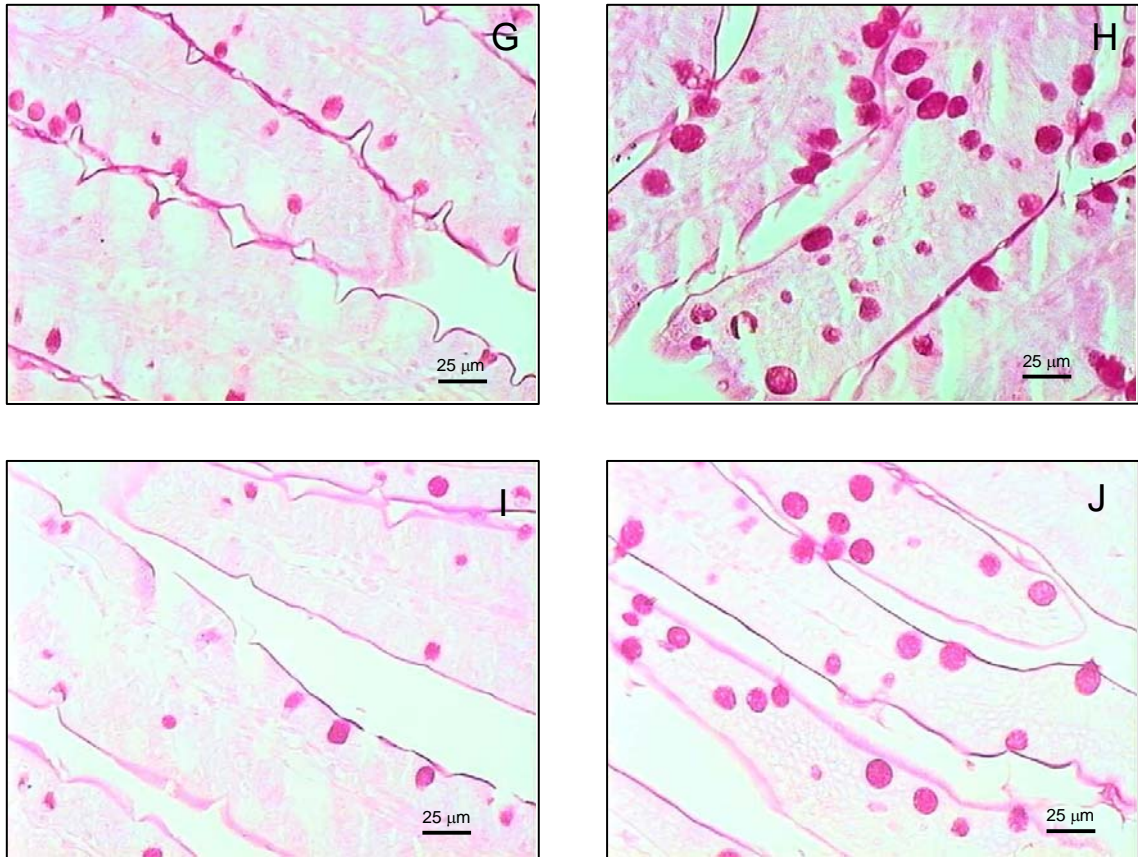


Figura 68: Avaliação histológica da quantidade de muco produzido pelas células caliciformes do jejuno proximal de camundongos BALB/c controles e alérgicos. Camundongos BALB/c dos grupos alérgicos foram sensibilizados com 10 µm de OVA + 1mg de Al(OH)₃ no dia 0 e 10 µm de OVA no dia 14. Os animais dos grupos controles receberam apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, a ração de todos os grupos foi substituída por uma ração balanceada à base de ovalbumina (desafio). Após uma semana de desafio, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através de coloração por P.A.S.. A: Camundongo Balb/c controle; B: Camundongo Balb/c alérgico; C: Camundongo Balb/c controle suplementado com selênio orgânico; D: Camundongo Balb/c alérgico suplementado com selênio orgânico; E: Camundongo Balb/c controle suplementado com vitamina E; F: Camundongo Balb/c alérgico controle suplementado com vitamina E; G: Camundongo Balb/c controle tratado com aminoguanidina; H: Camundongo Balb/c alérgico tratado com aminoguanidina. I: Camundongo Balb/c controle com todas as suplementações; J: Camundongo Balb/c alérgico com todas as suplementações. Aumento 40X.

Visto em estudos anteriores, que os animais da linhagem C57/BL6, se comportam de maneira diferente dos animais da linhagem Balb/c, frente ao protocolo de alergia alimentar, como os animais da linhagem Swiss se comportam?

7 - RESULTADOS

Avaliação de alguns parâmetros da alergia alimentar em animais da linhagem Swiss

34. Avaliação do peso corpóreo

O peso dos animais, da linhagem swiss, foi avaliado semanalmente. Esses animais foram divididos em 3 grupos: um controle e dois alérgicos. Os grupos controle e alérgico 1 foram tratados com uma dieta balanceada sem suplementações. O grupo alérgico 2 foi tratado com a mesma dieta, porém esta dieta passou por um processo de esterilização (autoclavagem). Os grupos alérgicos foram sensibilizados com OVA. Na Figura 69 podemos observar que os grupos alérgicos não perderam peso corpóreo como ocorre com os animais da linhagem Balb/c.

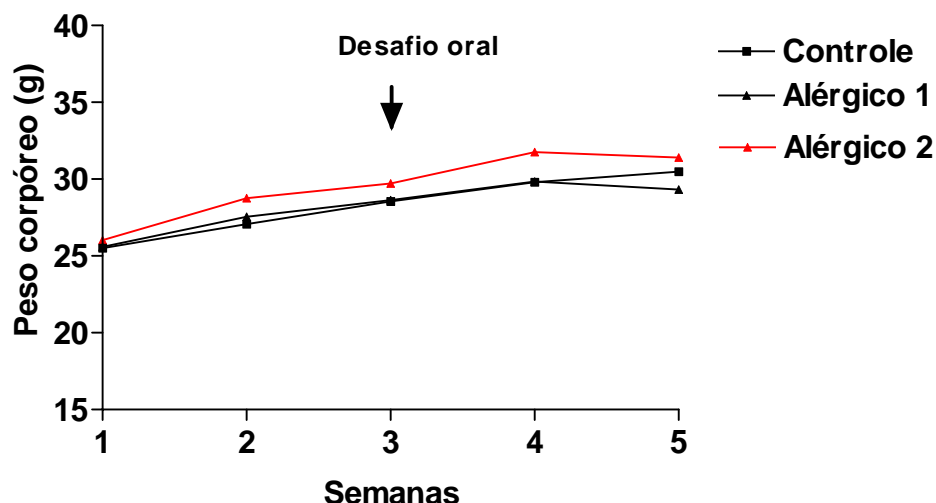


Figura 69 : Avaliação do peso corpóreo (Swiss)

Peso corpóreo em gramas (g), avaliado por cinco semanas, de camundongos da linhagem Swiss, divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

35. Avaliação dos anticorpos dos isotipos IgE e IgG1

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo alérgico é a dosagem de anticorpos dos isotipos IgE e IgG1. Como mostram as Figuras 70 e 71, a produção da IgE e da IgG1 dos grupos alérgico 1 e alérgico 2, foi estatisticamente maior quando comparada ao seu grupo controle e quando comparou-se os dois grupos alérgicos, também foi observada uma diferença, sendo a produção dessas imunoglobulinas maior no grupo alérgico 2.

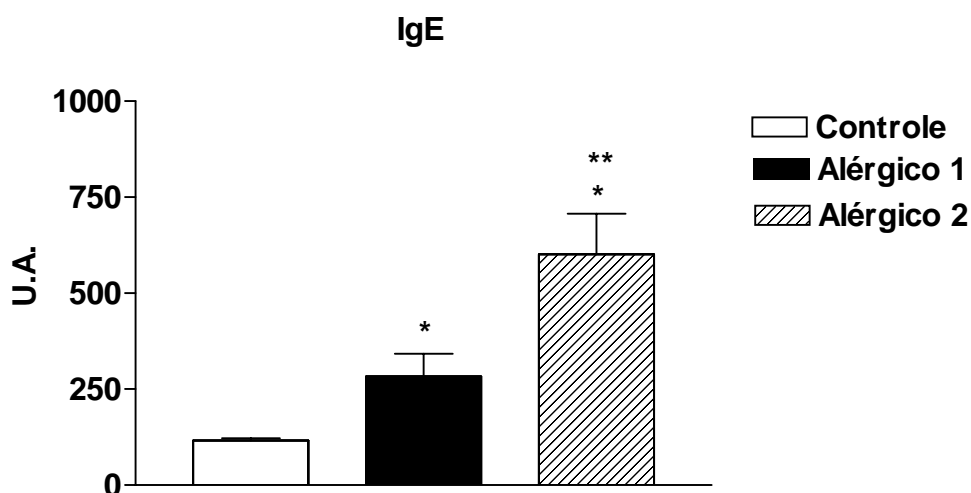


Figura 70: Avaliação da produção da imunoglobulina E (Swiss)
Quantificação, da imunoglobulina E (IgE) em unidade arbitrária (U.A.), através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem Swiss divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).
* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles
** $p < 0,05$ em relação ao outro alérgico

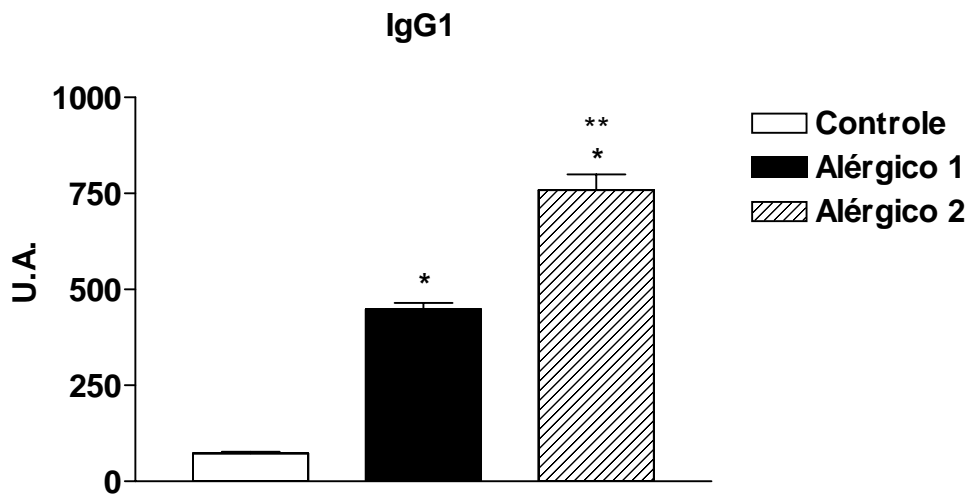


Figura 71: Avaliação da produção da imunoglobulina G1 (Swiss)
 Quantificação, da imunoglobulina G1 (IgG1) em unidade arbitrária (U.A.) , através do método de ELISA, no soro de camundongos da linhagem Swiss divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles
 ** $p < 0,05$ em relação ao outro alérgico

36. Avaliação da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado

Um outro parâmetro da alergia alimentar avaliado foi a produção de muco pelas células caliciformes, situadas nas vilosidades de todo o intestino delgado. O intestino foi segmentado em 4 partes designadas duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Foram selecionados 3 campos de cada um desses segmentos de cinco animais de cada grupo. Esses campos foram analisados através de um programa de computador (KS300) que quantifica através de medida da área desejada, nesse caso, a área onde verificamos a presença de muco através da coloração de P.A.S..

As Figuras 72, 73, 74 e 75 representam a área de muco em micrômetros quadrados por campo, de cada segmento do intestino delgado.

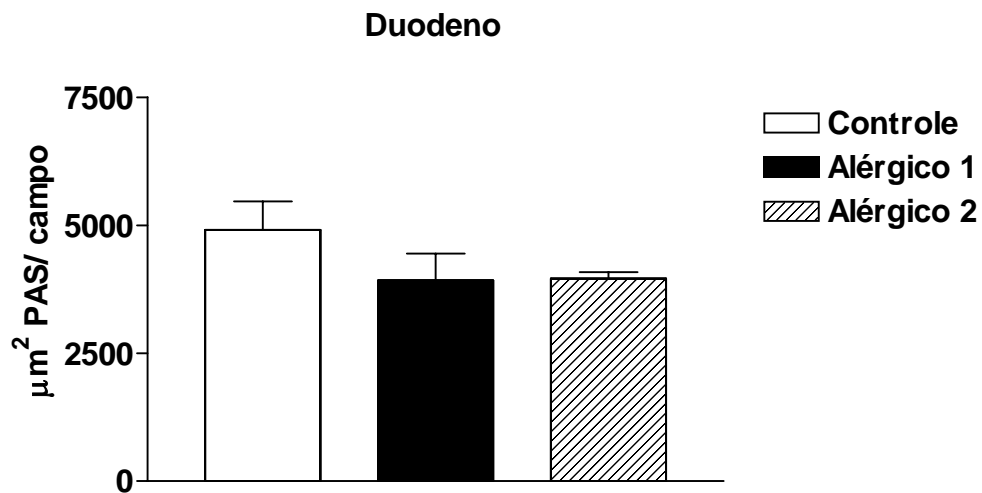


Figura 72: Avaliação da produção de muco no duodeno (Swiss)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2), realizada no duodeno de camundongos da linhagem swiss divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

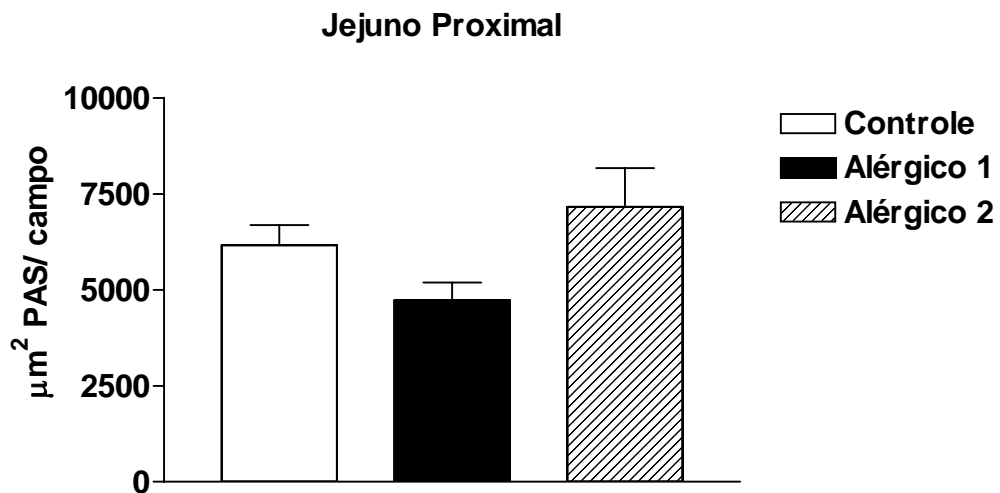


Figura 73: Avaliação da produção de muco no jejuno proximal (Swiss)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2), realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem swiss divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

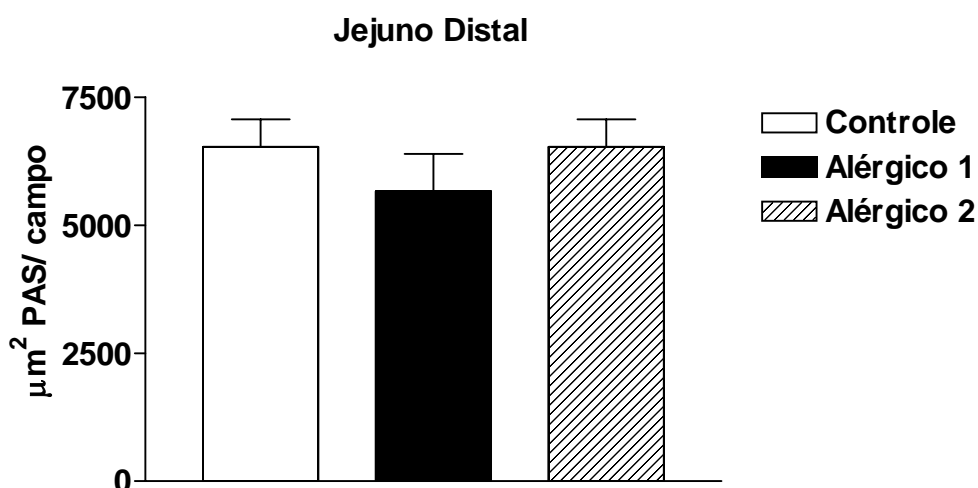


Figura 74: Avaliação da produção de muco no jejuno distal (Swiss)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2), realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem swiss divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

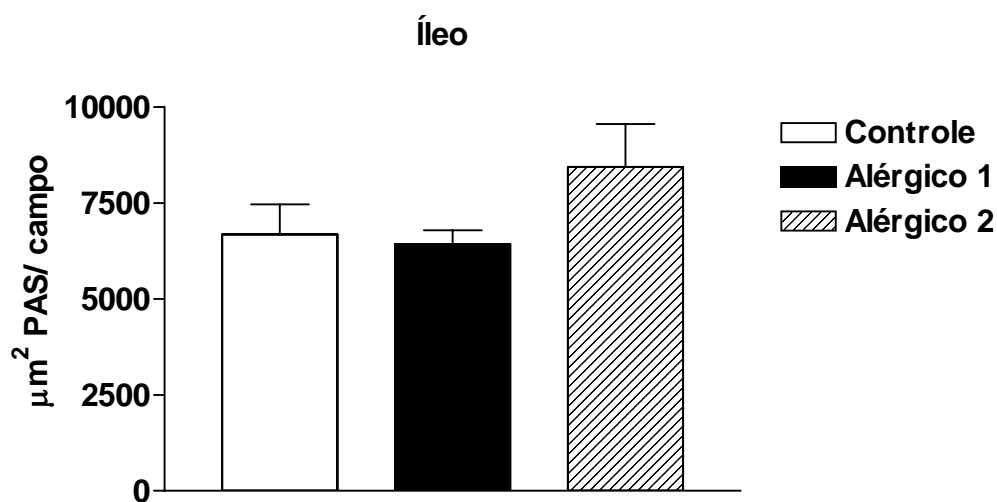


Figura 75: Avaliação da produção de muco no íleo (Swiss)
 Medida da área de muco em micrômetros quadrados (μm^2), realizada no jejuno proximal de camundongos da linhagem swiss divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).
 * $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

Foi observado que não houve diferenças, estatisticamente significativas na quantidade de muco produzido pelas células caliciformes, em todos os segmentos do intestino delgado.

37. Avaliação do peso da gordura abdominal

Para avaliar se a não perda de peso corpóreo dos animais alérgicos estava sendo mascarada por uma possível retenção de líquido, como ocorre quando animais da linhagem C57/BL6 são sensibilizados com OVA, fizemos uma avaliação do peso da gordura abdominal.

Como podemos observar na Figura 76 não verificamos diferenças, estatisticamente significativas, no peso da gordura abdominal em nenhum grupo analisado, apesar de os grupos alérgicos apresentarem uma tendência à redução do peso da gordura.

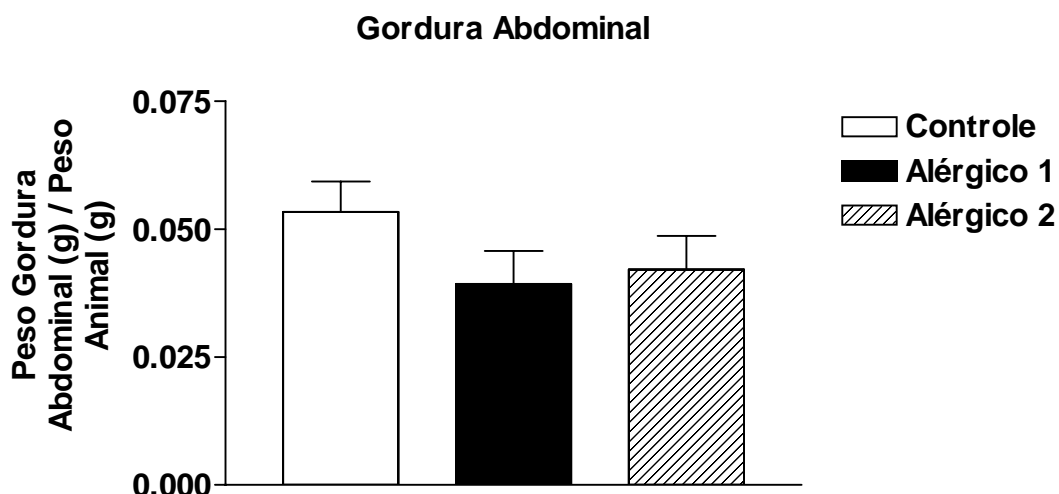


Figura 76: Avaliação do peso da gordura abdominal (Swiss)

Análise da gordura abdominal, avaliada pelo peso da gordura abdominal (g) dividido pelo peso do animal (g), realizada em camundongos da linhagem swiss divididos em grupos controle (ração balanceada), alérgico 1 (ração balanceada) e alérgico 2 (ração balanceada autoclavada).

* $p < 0,05$ em relação aos grupos controles

DISCUSSÃO

Nas últimas duas ou três décadas, houve um aumento significativo na prevalência de doenças alérgicas. A alergia alimentar, em particular, é uma doença que afeta 6-8% das crianças menores de 3 anos e aproximadamente 2% da população adulta no mundo industrializado (YAZDANBAKHSH et al., 2002). Nas últimas décadas, a alergia alimentar tem sido reconhecida como um problema de saúde pública (CREVEL, 2002). Durante a fase de crescimento, pode interferir de modo negativo, na estatura e peso corpóreo de crianças (CHRISTIE, 2002).

A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata do tipo I mediada por IgE. Os mastócitos são as células efetoras destas reações que ocorrem quando indivíduos entram em contato com os antígenos da dieta aos quais foram previamente sensibilizados. Ao realizar ligações cruzadas entre várias moléculas de IgE ligadas aos receptores na superfície dos mastócitos, o antígeno induz a ativação destas células e a liberação de vários mediadores que contribuem para as respostas alérgicas (BENOIST & MATHIS, 2002).

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.

Para estudar a alergia alimentar nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de alergia alimentar, à ovalbumina, em camundongos.

O protocolo desenvolvido gera o aumento dos níveis de IgE e IgG1 no soro dos animais, em todas as linhagens de camundongos estudadas. Um dos sintomas apresentados pelos camundongos BALB/c no nosso modelo de alergia alimentar é a perda de peso corpóreo (SALDANHA et al, 2004). Além da perda de peso, ocorre também diminuição da gordura abdominal. Mesmo em outra linhagem, como C57BL/6, em que não há a perda de peso, verifica-se aumento de Imunoglobulinas e diminuição da gordura abdominal nesse modelo de alergia (MOREIRA, 2006). Já camundongos não isogênicos, como o SWISS, embora haja aumento dos níveis de IgE e IgG1 anti-ovalbumina, não ocorre nem emagrecimento, nem diminuição da gordura abdominal.

A intenção de se reproduzir o modelo de alergia nos camundongos SWISS teve como objetivo verificar se a ausência de germes, nesses camundongos, teria

alguma interferência na alergia. Uma vez que os controles não isentos de germe não apresentaram sinais da alergia detectáveis nos parâmetros analisados (exceto produção de imunoglobulina) e não houve resultados que confirmassem a associação entre translocação bacteriana e perda de peso, não se prosseguiu aos experimentos com animais SWISS isentos de germes.

O emagrecimento observado nos camundongos BALB/c não foi associado a um menor consumo líquido, nem a um menor consumo de ração (SALDANHA, 2006). Experimentos anteriores realizados no nosso laboratório demonstraram ainda que a perda de peso corpóreo não tem como causa uma má absorção dos nutrientes provenientes da dieta, uma vez que a mucosa intestinal, analisada morfometricamente, apresentou-se íntegra. Além disso, não houve alteração dos níveis de albumina sérica. A desidratação também foi excluída como possível causa para este emagrecimento, visto que o teste de micro-hematócrito não se mostrou alterado.

Nesse trabalho podemos observar que os animais alérgicos que receberam suplementação com selênio orgânico, vitamina E e todas as suplementações juntas, perderam peso corpóreo na primeira semana de desafio oral. A partir da segunda semana de desafio, esses animais recuperaram o peso corpóreo, sendo a recuperação do grupo suplementado com vitamina E, a mais expressiva. No grupo alérgico tratado com aminoguanidina, não foi observada recuperação do peso corpóreo. Esse grupo manteve a perda de peso até o final do experimento. Essa substância mostrou-se ineficaz sobre esse parâmetro da alergia alimentar.

Nossa hipótese é que um maior estresse oxidativo e maior produção de óxido nítrico (NO), que ocorre na inflamação, poderia lesar a mucosa intestinal e dessa forma permitir translocação bacteriana do intestino para outros órgãos, levando a um quadro de infecção generalizada que poderia ser uma das causas do emagrecimento dos animais alérgicos.

O óxido nítrico pode agir como um radical livre em várias doenças inflamatórias, dentre elas as pulmonares, como a asma. (KHARITONOV et al, 1994).

Em estado fisiológico, o óxido nítrico (NO) tem papel protetor, mas sob condições de produção exacerbada, como no processo inflamatório, pode provocar danos teciduais através da reação com superóxidos para formar peróxido-nitrito (BURGNER et al., 1998; GAUT et al., 2002).

Inibidores da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) são capazes de reduzir a inflamação em vários estudos, sugerindo que a iNOS pode contribuir para a inflamação intestinal.

Pode-se observar no presente trabalho, que camundongos com alergia alimentar apresentam um aumento da iNOS na mucosa intestinal ($P= 0,0658$; Figura 6), apesar de a análise estatística não ser significativa, esse P tem importância biológica. Quando esses animais são suplementados com vitamina E, ocorre uma diminuição desta enzima, sugerindo que esse antioxidante possui um papel importante na expressão da iNOS.

Óxido nítrico e radicais livres estão intimamente relacionados com um processo bastante estudado, que é o de isquemia/reperfusão. Uma variedade de mecanismos pode ser responsável pelos danos causados pela reperfusão: a geração de radicais livres de oxigênio, perda de enzimas antioxidantes, grande infiltrado de neutrófilos, edema tecidual, dentre outros (HUDSON,1994).

Öztürk et al 2002 demonstraram em modelo experimental de isquemia/reperfusão intestinal que, no epitélio da mucosa existe uma maior produção de espécies de oxigênio reativo que estão relacionados com lesões na mucosa. Essas lesões favorecem translocação bacteriana (TB) do intestino para outros órgãos e quando esses animais são pré-tratados com selênio, a translocação bacteriana não ocorre, mostrando o efeito benéfico desse mineral na restauração da integridade da mucosa intestinal (ÖZTÜRK et al., 2002).

Quando analisamos uma possível translocação bacteriana, do intestino para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado, que seria uma possível causa do emagrecimento dos animais alérgicos, verificamos que ocorreu translocação em alguns animais dos grupos controle e alérgico, porém não foi estatisticamente significativa. Esses dados mostraram que a perda de peso dos animais alérgicos não está relacionada com translocação bacteriana.

Visto que a perda de peso não está relacionada com translocação bacteriana e visto que o selênio orgânico e a vitamina E, são capazes de reverter essa perda de peso dos animais alérgicos, após a segunda semana de desafio, pode-se sugerir que essas substâncias agem modulando o sistema imune e por mecanismos desconhecidos revertendo a perda de peso desses animais.

O protocolo de sensibilização com OVA utilizado neste estudo foi capaz de desencadear a produção de IgE e IgG1 anti-OVA nos animais dos grupos alérgicos

tratados ou não com selênio orgânico, vitamina E ou aminoguanidina. Bando e colaboradores 2003 demonstraram, em camundongos BALB/c imunizados com OVA e na ausência de adjuvante, que a suplementação com vitamina E, na proporção de 500 mg/kg de dieta, foi suficiente para suprimir a produção da imunoglobulina E (IgE), podendo dessa forma, prevenir a reação alérgica do tipo 1 (BANDO et al, 2003).

Nossos achados divergem dos achados de BANDO, pois no nosso grupo alérgico, suplementado com vitamina E (1000 mg/kg de dieta), não observamos supressão da produção de IgE, antes nem depois do desafio oral, muito pelo contrário, observamos um aumento expressivo, próximo do que ocorre no grupo alérgico não suplementado. Podemos sugerir que a produção de IgE é dependente da presença de adjuvante, uma vez que, em nosso protocolo de sensibilização o hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] é utilizado como adjuvante.

Podemos observar que a vitamina E tem efeito em diversos sistemas. Na dose e nas condições que trabalhamos conseguimos diferenciar dois momentos. Um, da produção de IgE e outro das conseqüências após sua ligação com o antígeno. Isso reforça seu papel antialérgico. Esse papel ainda está sendo investigado e a associação com NO na mucosa e outros tecidos é um caminho provável.

Observamos nesse trabalho que a vitamina E foi capaz de reduzir o infiltrado eosinofílico, na mucosa intestinal de camundongos alérgicos suplementados com esta vitamina.

Em doenças alérgicas crônicas, os eosinófilos são ativados e atraídos para o local da inflamação. Essas células são responsáveis pela fase tardia da reação alérgica imediata, produzindo proteína básica que é tóxica ao epitélio (CARA *et al.*, 2000).

A IL-5 e a eotaxina induzem infiltração de eosinófilos na mucosa intestinal durante a reação alérgica (BAE et al., 1999).

Saldanha em 2004 observou uma maior infiltração de eosinófilos na mucosa intestinal de camundongos alérgicos, tendo início com 6 horas de desafio e mantendo-se até três semanas de desafio (SALDANHA, 2004).

É descrito na literatura que 4,5% dos pacientes que fazem hemodiálise, apresentam reações alérgicas a materiais utilizados nesse procedimento. Kojima em 2005 demonstrou que quando se utilizou vitamina E associada à membrana utilizada

na diálise, ocorreu uma melhora na eosinofilia em todos os pacientes testados e uma redução no nível da interleucina 5 (IL-5) no soro desses pacientes (KOJIMA et al, 2005). Em reações alérgicas nasais também foi demonstrado um efeito supressor da vitamina E na produção da IL-5 (ZHENG, 1999).

Podemos sugerir que um dos prováveis mecanismos pelo qual a vitamina E reduz o infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal é através da redução da produção da IL-5, como foi observado em outros trabalhos, mas o mecanismo pelo qual a vitamina E reduz a produção da IL-5, ainda é desconhecido.

Nos grupos tratados com selênio orgânico e aminoguanidina não foram observadas alterações significativas no infiltrado eosinofílico.

No nosso modelo de alergia alimentar, camundongos BALB/c apresentam aumento da produção de muco pelas células caliciformes do intestino delgado (SALDANHA *et al.*, 2004). A produção de muco tem sido associada como um mecanismo protetor da mucosa intestinal. Certamente a entrada de antígenos pela mucosa de um animal sensibilizado causa irritação. No entanto, tal provável irritação não repercute em modificações morfológicas drásticas da mucosa intestinal, como erosão do epitélio, por exemplo. É provável, então, que o muco produzido atue como protetor nessa mucosa. Se a vitamina E atua, por mecanismo ainda desconhecido, como um anti-alérgico, a produção de muco não é mais necessária, ou mesmo pode ser mais variável, como mostra a Figura 11.

Portanto, diante dos dados obtidos nesse trabalho podemos dizer que as suplementações com selênio orgânico e vitamina E foram eficientes para reverter a perda de peso dos camundongos alérgicos e a vitamina E diminuiu o infiltrado de eosinófilos nos animais alérgicos. Os mecanismos pelos quais essa vitamina age melhorando a alergia alimentar, será investigado.

SUMÁRIO DE RESULTADOS E CONCLUSÕES

- O protocolo de alergia alimentar em camundongos SWISS foi capaz de aumentar os níveis séricos de IgE e IgG1 anti-ovalbumina, mas não interferiu no peso corpóreo e no peso da gordura abdominal.
- O protocolo de alergia alimentar em camundongos BALB/c foi capaz de diminuir o peso corporal, aumentar os níveis séricos de IgE e IgG1 anti-ovalbumina, aumentar o infiltrado de neutrófilos e eosinófilos na mucosa intestinal e aumentar a produção de muco. O consumo de ração não foi alterado nesses animais.
- Os sinais encontrados neste modelo de alergia alimentar não foram associados com infecção secundária, uma vez que não houve translocação bacteriana do intestino para o fígado, baço e linfonodos mesentéricos.
- O tratamento com vitamina E foi eficiente para reverter a diminuição de peso, o infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, e o aumento da produção de muco encontrados em camundongos BALB/c com alergia alimentar . O tratamento com vitamina E não interferiu no infiltrado de neutrófilos encontrado inicialmente na mucosa intestinal.
- O tratamento com selênio foi eficiente para reverter apenas o peso diminuído dos animais alérgicos.
- O tratamento com aminoguanidina não foi eficiente para reverter nenhum dos parâmetros analisados da alergia alimentar em camundongos BALB/c:
- É provável que a produção de óxido nítrico participe do mecanismo de ação da vitamina E no tratamento da alergia alimentar.

BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K. e A. H. Lichtman. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 576 p.

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

Bae, S. J., Y. Tanaka, *et al.* Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. J Dermatol Sci, v.21, n.1, Sep, p.1-7. 1999.

Bando, N., R. Yamanishi, *et al.* Inhibition of immunoglobulin E production in allergic model mice by supplementation with vitamin E and beta-carotene. Biosci Biotechnol Biochem, v.67, n.10, Oct, p.2176-82. 2003.

Benoist, C. e D. Mathis. Mast cells in autoimmune disease. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.875-8. 2002.

Bienvenu, K. e D. N. Granger. Leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. Blood Cells, v.19, n.2, p.279-88; discussion 288-9. 1993.

Bischof, R. J. e E. N. Meeusen. Cellular kinetics of an allergic-type response in a sheep mammary gland model of inflammation. Clin Exp Allergy, v.32, n.4, Apr, p.619-26. 2002.

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

Bradley, D. Linking isocyanates and asthma. Anal Chem, v.69, n.11, Jun 1, p.339A. 1997.

Bufe, A. The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? Int Arch Allergy Immunol, v.117, n.4, Dec, p.215-9. 1998.

Bulger, E. M. e R. V. Maier. Antioxidants in critical illness. Arch Surg, v.136, n.10, Oct, p.1201-7. 2001.

Burgner, D., Rockett, K., Kwiatkowski, D. Nitric oxide and infectious diseases. Archives Disease in Childhood, v.81, n.1, p.185-188. 1998.

Cara, D. C., D. Negrao-Correa, *et al.* Mechanisms underlying eosinophil trafficking and their relevance in vivo. Histol Histopathol, v.15, n.3, Jul, p.899-920. 2000.

Christie, L., R. J. Hine, *et al.* Food allergies in children affect nutrient intake and growth. J Am Diet Assoc, v.102, n.11, Nov, p.1648-51. 2002.

Crevel, R. Industrial dimensions of food allergy. Biochem Soc Trans, v.30, n.Pt 6, Nov, p.941-4. 2002.

Denning, T. L., N. A. Campbell, *et al.* Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. Int Immunol, v.12, n.2, Feb, p.133-9. 2000.

Dourado, L. P. A. Participação das citocinas na aversão e alergia alimentar induzida à ovalbumina em camundongos. (Mestrado). Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 80 p.

Ferraris, R. P., S. A. Villenas, *et al.* Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. Am J Physiol, v.262, n.6 Pt 1, Jun, p.G1047-59. 1992.

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

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

Fuleihan, R. L. Allergy, immunology, and related disorders. Curr Opin Pediatr, v.10, n.6, Dec, p.581-3. 1998.

Fuleihan, R. L. Allergy, immunology, and related disorders. Curr Opin Pediatr, v.10, n.6, Dec, p.581-3. 1998.

Galli, S. J. e B. K. Wershil. The two faces of the mast cell. Nature, v.381, n.6577, May 2, p.21-2. 1996.

Gaut, J. P., J. Byun, *et al.* Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. J Clin Invest, v.109, n.10, May, p.1311-9. 2002.

Habib, A., C. Bernard, *et al.* Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. J Immunol, v.158, n.8, Apr 15, p.3845-51. 1997.

Halliwell, B., K. Zhao, *et al.* The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? Free Radic Res, v.33, n.6, Dec, p.819-30. 2000.

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

Helm, R. M. e A. W. Burks. Mechanisms of food allergy. Curr Opin Immunol, v.12, n.6, Dec, p.647-53. 2000.

Hudson, K. F. A phenomenon of paradox: myocardial reperfusion injury. Heart Lung, v.23, n.5, Sep-Oct, p.384-93; quiz 394-6. 1994.

Janeway, C., P. Travers, *et al.* Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença. São Paulo: Artmed. 2006. 767 p.

Kay, A. B. Overview of 'allergy and allergic diseases: with a view to the future'. Br Med Bull, v.56, n.4, p.843-64. 2000.

Khanduja, K. L., P. K. Avti, *et al.* Inhibitory effect of vitamin E on proinflammatory cytokines-and endotoxin-induced nitric oxide release in alveolar macrophages. Life Sci, v.76, n.23, Apr 22, p.2669-80. 2005.

Kharitonov, S. A., D. Yates, *et al.* Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. Lancet, v.343, n.8890, Jan 15, p.133-5. 1994.

Kojima, K., K. Oda, *et al.* Effect of vitamin E-bonded dialyzer on eosinophilia in haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, v.20, n.9, Sep, p.1932-5. 2005.

Kuhn, R., J. Lohler, *et al.* Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell, v.75, n.2, Oct 22, p.263-74. 1993.

Lamont, J. T. Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. Ann N Y Acad Sci, v.664, p.190-201. 1992.

Leung, D. Y. Molecular basis of allergic diseases. Mol Genet Metab, v.63, n.3, Mar, p.157-67. 1998.

Liu, X., T. H. Beaty, *et al.* Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. J Allergy Clin Immunol, v.113, n.3, Mar, p.489-95. 2004.

Lorentz, A. e S. C. Bischoff. Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. Immunol Rev, v.179, Feb, p.57-60. 2001.

Matysiak-Budnik, T. e M. Heyman. Food allergy and Helicobacter pylori. J Pediatr Gastroenterol Nutr, v.34, n.1, Jan, p.5-12. 2002.

Mestecky, J., M. W. Russell, *et al.* The human IgA system: a reassessment. Clin Immunol Immunopathol, v.40, n.1, Jul, p.105-14. 1986.

Metcalf, D. D. Food allergy. Prim Care, v.25, n.4, Dec, p.819-29. 1998.

Moncada, S., R. M. Palmer, *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, v.43. 1991. 109-42 p. (Pharmacol Rev)

Moreira, L. F. Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar. (Mestrado). Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 99 p.

Musik, I., M. Koziol-Montewka, *et al.* Immunomodulatory effect of selenosemicarbazides and selenium inorganic compounds, distribution in organs after selenium supplementation. Biometals, v.12, n.4, Dec, p.369-74. 1999.

Comparison of selenium distribution in mice organs after the supplementation with inorganic and organic selenium compound selenosemicarbazide. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med], v.57, n.1, p.15-22. 2002.

Nachbar, F. e H. C. Korting. The role of vitamin E in normal and damaged skin. J Mol Med, v.73, n.1, Jan, p.7-17. 1995.

Nakamura, H., H. Tsukada, *et al.* Aminoguanidine has both an anti-inflammatory effect on experimental colitis and a proliferative effect on colonic mucosal cells. Scand J Gastroenterol, v.34, n.11, Nov, p.1117-22. 1999.

Nathan, C. e Q. W. Xie. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem, v.269, n.19, May 13, p.13725-8. 1994.

Oliveira, A. R., Smpm; Moraes, Cmb;. The use of soy oil deodorization distillate as an alternative source of vitamin E reduced the weight gain of rats. Rev. Nutr, v.18, n.5. 2005.

Ozturk, C., D. Avlan, *et al.* Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. Pharmacol Res, v.46, n.2, Aug, p.171-5. 2002.

Parnham, M. J. e E. Graf. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. Biochem Pharmacol, v.36, n.19, Oct 1, p.3095-102. 1987.

Piccinni, M. P., E. Maggi, *et al.* Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects. Ann N Y Acad Sci, v.917, p.844-52. 2000.

Plaut, M. New directions in food allergy research. J Allergy Clin Immunol, v.100, n.1, Jul, p.7-10. 1997.

Rocksén, D., Ekstrand-Hammarström, B., Johansson, L., Bucht A. Vitamin E reduces transendotelial migration of neutrophils and prevent lung injury in endotoxin-induced airway inflammation. Journal of Respiratory Cell, and Molecular Biology, v.28, p.199-207. 2003.

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

Salvemini, D., Z. Q. Wang, *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. Br J Pharmacol, v.118, n.4, Jun, p.829-38. 1996.

Sampson, H. A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. J

Allergy Clin Immunol, v.103, n.5 Pt 1, May, p.717-28. 1999.

Seibold, F. Food-induced immune responses as origin of bowel disease? Digestion, v.71, n.4, p.251-60. 2005.

Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell, v.76, n.2, Jan 28, p.301-14. 1994.

Tepper, R. I., P. K. Pattengale, *et al.* Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. Cell, v.57, n.3, May 5, p.503-12. 1989.

Tulic, M. K., J. L. Wale, *et al.* Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors in an in vivo allergic rat model. Eur Respir J, v.15, n.5, May, p.870-7. 2000.

Wasserman, S. I. Mediators of immediate hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol, v.72, n.2, Aug, p.101-19. 1983.

Willerson, J. T. Pharmacologic approaches to reperfusion injury. Adv Pharmacol, v.39, p.291-312. 1997.

Xu, J., D. S. Postma, *et al.* Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. Am J Hum Genet, v.67, n.5, Nov, p.1163-73. 2000.

Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, *et al.* Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science, v.296, n.5567, Apr 19, p.490-4. 2002.

Yu, L. C. e M. H. Perdue. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. Immunol Rev, v.179, Feb, p.61-73. 2001.

Zheng, K., A. A. Adjei, *et al.* Effect of dietary vitamin E supplementation on murine nasal allergy. Am J Med Sci, v.318, n.1, Jul, p.49-54. 1999.