

**Ariane Barros Diniz**

**Interferência do consumo de dieta hiperlipídica nos  
sinais de alergia alimentar experimental**

**Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde  
Escola de Enfermagem  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte / 2015**

**Ariane Barros Diniz**

**Interferência do consumo de dieta hiperlipídica nos sinais de alergia  
alimentar experimental**

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-graduação em  
Nutrição e Saúde da Escola de  
Enfermagem da Universidade  
Federal de Minas Gerais como  
requisito para obtenção do  
título de mestre em Nutrição e  
Saúde.

Linha de pesquisa: Bioquímica  
e Imunologia

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Carmona Cara Machado**

Departamento de Morfologia – ICB/UFMG

**Co-orientadora: Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira**

Escola de Enfermagem - UFMG

**Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde**

**Escola de Enfermagem**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte 2015**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me colocar no lugar certo, na hora certa, com as pessoas certas e por guiar todos os meus passos até aqui.

À minha mãe, por cada um de seus esforços para que eu ficasse bem, mesmo nos dias mais difíceis.

À minha irmã Isabela, que está sempre ao meu lado de braços e ouvidos abertos.

À toda minha família pelo apoio e incentivo incondicional.

À minha orientadora Denise por ter me recebido de braços abertos e ter me acolhido com todo coração e por me ensinar tanto em tão pouco tempo.

À minha co-orientadora, Adaliene, por todos os ensinamentos e por todo carinho.

As meninas do NEI por me receberem de maneira inexplicável, por se tornarem essenciais na minha vida, por ensinarem tudo do laboratório, por tudo que fizeram por mim.

A todo grupo do NEI, em especial ao Gustavo, que me receberam e acolheram imensamente bem e me ensinaram muito.

As minhas amigas que mesmo de longe acompanharam meus passos e me deram apoio e carinho sempre.

A Bárbara minha querida IC e a Luísa do LIB pelos ensinamentos e por todas as ajudas durante os experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Nutrição e Saúde pelos ensinamentos.

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

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade e por todos os aprendizados.

Este trabalho foi realizado no Laboratório Núcleo de Estudos em Inflamação do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro da CAPES, CNPq e da FAPEMIG.

## RESUMO

A alergia alimentar é considerada uma manifestação exacerbada da resposta imune a antígenos que chegam ao organismo por via oral, sendo a maioria delas mediadas por IgE. Estudos anteriores mostraram que diversos componentes nutricionais são capazes de afetar essa resposta negativa ou positivamente. Utilizando modelo experimental de alergia alimentar é possível observar diversos sintomas, incluindo perda de peso drástica associada a inflamação do tecido adiposo. Desta forma, o presente trabalho teve o objetivo de investigar as consequências da dieta hiperlipídica nesse processo. Para tal, foram utilizados camundongos BALB/c separados em quatro grupos experimentais: SDC (dieta padrão, não sensibilizado), SDS (dieta padrão, sensibilizado), HFC (dieta hiperlipídica, não sensibilizado), HFS (dieta hiperlipídica, sensibilizado). Depois de cinco semanas de consumo da dieta, os animais foram sensibilizados com injeção subcutânea de ovalbumina (OVA) com  $Al(OH)_3$ , e receberam um reforço (apenas OVA) duas semanas depois. Uma semana após o reforço, todos os animais foram submetidos ao desafio oral com solução de OVA durante uma semana. Animais não sensibilizados que receberam dieta HF apresentaram maior índice de adiposidade e área de adipócitos, maiores níveis de leptina e adiponectina. Animais sensibilizados independente da dieta ofertada consumiram menor quantidade da solução de OVA. A ingestão de OVA por animais sensibilizados foi capaz de gerar alterações na morfologia intestinal, porém não alterou os níveis de glicose, colesterol e IgA secretória. Camundongos alérgicos recebendo dieta HF exibiram menores valores de IgE anti-ovalbumina sérica. Animais sensibilizados que receberam dieta HF tiveram um aumento do consumo alimentar; uma maior perda de peso após o desafio oral; redução nos níveis de triglicérides sérico; alterações hepáticas, na adesão e rolamento de leucócitos no tecido adiposo e acúmulo de gordura nos enterócitos. Porém, não interferiu na contagem total e diferencial de células sanguíneas e na relação vilos/crípta intestinal. Conclusão: O

consumo de dieta hiperlipídica tem impacto negativo sobre a alergia alimentar experimental.

## ABSTRACT

Introduction and Objective: Food allergy can be considered a manifestation of exacerbated immune response to antigens that reach the body orally, most of which are mediated by IgE. It has been shown that several nutritional components can affect positively or negatively this response. Using an experimental food allergy model, we have observed a several signals, including a drastic weight loss associated to adipose tissue inflammation. In this work, our objective was investigated the consequences of a high-fat diet in this process. Methods and Results: BALB/c male mice were separated into four experimental groups: SDC (standard diet, not sensitized), SDS (standard diet, sensitized), HFC (high-fat diet, not sensitized) and HFS (high-fat diet, sensitized). After five weeks of each diet, animals were sensitized subcutaneously with ovalbumin (OVA) with Al(OH)<sub>3</sub>, with a booster (only OVA) two weeks later. One week after the booster, all animals received an oral challenge with OVA, for one week. Non-sensitized animals receiving the HF diet had higher fat index area and adipocytes, increased leptin and adiponectin levels. Sensitized animals independent of diet offered consume less of the OVA solution. The isolated allergy was able to generate changes in intestinal morphology but did not affect glucose, cholesterol and secretory IgA levels. Allergic mice receiving the HF diet showed lower serum anti-ovalbumin IgE levels. The food allergy in conjunction with the HF diet caused an increase of food intake; more weight loss after oral challenge; reduction in levels of serum triglycerides; liver changes, adhesion and rolling of leukocyte in adipose tissue and accumulation of fat in the enterocytes. However, did not affect the total count and differential blood cell and the relationship villus/crypt intestinal. Conclusion: The consumption of high-fat diet has negative impact on food allergy.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Classificação das reações adversas aos alimentos.....               | 13 |
| Figura 2: Imunopatogênese da alergia.....                                     | 15 |
| Figura 3: Esquema dos procedimentos.....                                      | 27 |
| Figura 4: Consumo alimentar.....  | 36 |
| Figura 5: Evolução do peso corporal.....                                      | 37 |
| Figura 6: Consumo da solução de Ovalbumina.....                               | 38 |
| Figura 7: Evolução do peso corporal durante o desafio oral.....               | 39 |
| Figura 8: Índice de adiposidade.....  | 40 |
| Figura 9: Área de adipócitos.....   | 41 |
| Figura 10: Lâminas histológicas de tecido adiposo epididimal.....             | 42 |
| Figura 11: Adesão e rolamento de leucócitos no tecido adiposo epididimal...43 |    |
| Figura 12: Concentração sérica de glicose.....                                | 44 |
| Figura 13: Concentração sérica de colesterol.....                             | 44 |
| Figura 14: Concentração sérica de triglicérides.....                          | 45 |
| Figura 15: Concentração de leptina sérica.....                                | 46 |
| Figura 16: Concentração de adiponectina sérica.....                           | 46 |
| Figura 17: Concentração de resistina sérica.....                              | 47 |
| Figura 18: Contagem total e diferencial de células sanguíneas.....            | 48 |
| Figura 19: Tamanho da mucosa.....   | 49 |
| Figura 20: Lâminas histológicas do intestino delgado.....                     | 49 |
| Figura 21: Relação Vilosidade/Cripta.....                                     | 50 |
| Figura 22: IgA secretória do lavado intestinal.....                           | 51 |
| Figura 23: Área de enterócitos gordurosos.....                                | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 24: Lâminas histológicas do intestino delgado..... | 52 |
| Figura 25: Lâminas histológicas de fígado.....            | 53 |
| Figura 26: Níveis séricos de IgE anti-ovalbumina.....     | 54 |

## **LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Composição das dietas utilizadas.....   | 24 |
| <b>Tabela 2</b> – Composição Groselha Cereser®.....   | 24 |
| <b>Tabela 3</b> - Distribuição calórica (% do valor calórico total) e densidade calórica da dieta AIN-93M e dieta hiperlipídica (HF)..... | 25 |
| <b>Tabela 4</b> – Grupos Experimentais.....   | 26 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

IL- interleucina

APC – Célula apresentadora de antígenos

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

PAF – Fator de ativação de plaquetas

HRF – Fator de ativação de histamina

OVA – Ovalbumina

IMC – Índice de massa corporal

CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas

CETEA - Comitê de Ética Animal

HF – High fat

PBS - Tampão salina fosfato

OPD - ortofenileno-diamino

HE - Hematoxilina- Eosina

TNF – fator de necrose tumoral

CLD – gotículas lipídicas citoplasmáticas

SDC – Standard diet control

SDS – Standard diet sensitized

HFC – High fat control

HFS – High fat sensitized

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 12 |
| 1.1. Alergia Alimentar .....                                     | 12 |
| 1.2. Alergia alimentar e obesidade .....                         | 18 |
| 1.3. Dieta Hiperlipídica .....                                   | 19 |
| 2. OBJETIVOS .....   | 22 |
| 2.1. Objetivo geral .....  | 22 |
| 2.2. Objetivos Específicos .....                                 | 22 |
| 3. METODOLOGIA.....  | 23 |
| 3.1 Animais.....   | 23 |
| 3.2. Preparo e composição das rações .....                       | 23 |
| 3.3. Protocolo de indução de alergia alimentar a ovalbumina..... | 25 |
| 3.4. Protocolo de Indução de obesidade .....                     | 25 |
| 3.5. Delineamento experimental .....                             | 26 |
| 3.6. Eutanásia .....   | 27 |
| 3.7. Obtenção do sangue e do soro .....                          | 28 |
| 3.8. Avaliação da Alergia Alimentar a ovalbumina.....            | 28 |
| 3.8.1 Dosagem de IgE anti-ovalbumina (soro) .....                | 28 |
| 3.9. Avaliação dos parâmetros clínicos .....                     | 29 |
| 3.9.1 Avaliação do consumo de ração .....                        | 29 |
| 3.9.2 Avaliação do consumo da solução de ovalbumina (OVA) .....  | 29 |
| 3.9.3 Avaliação do peso corpóreo .....                           | 29 |
| 3.10. Avaliação do Tecido Adiposo .....                          | 29 |
| 3.10.1 Avaliação do peso do tecido adiposo.....                  | 29 |
| 3.10.2 Índice de Adiposidade .....                               | 30 |
| 3.10.3 Avaliação histológica do tecido adiposo .....             | 30 |
| 3.10.4 Microscopia intravital no tecido adiposo .....            | 30 |
| 3.11. Dosagens Séricas .....                                     | 31 |
| 3.11.1 Dosagem de leptina, adiponectina e resistina .....        | 31 |
| 3.11.2 Dosagem de colesterol total .....                         | 31 |
| 3.11.3 Dosagem de triglicérides.....                             | 32 |
| 3.11.4 Dosagem de glicose .....                                  | 32 |
| 3.12. Avaliação do Intestino.....                                | 32 |
| 3.12.1 Coleta do lavado intestinal.....                          | 32 |

|  |    |
|--|----|
| 3.12.2 ELISA para sIgA do Muco do Intestino Delgado .....  | 32 |
| 3.12.3 Preparo do intestino delgado para análise histológica.....  | 34 |
| 3.12.4 Morfometria dos vilos e criptas intestinais.....  | 34 |
| 3.12.5 Avaliação de enterócitos gordurosos .....   | 34 |
| 3.13. Avaliação histológica do fígado.....   | 35 |
| 3.14. Contagem total e diferencial de leucócitos.....  | 35 |
| 3.15. Análise estatística.....   | 35 |
| 4. RESULTADOS .....  | 36 |
| 4.1. Sensibilização em conjunto com dieta HF aumenta o consumo alimentar .....                           | 36 |
| 4.2 Sensibilização juntamente com consumo de dieta HF altera o peso corporal ....                        | 37 |
| 4.3 Animais sensibilizados consomem menor quantidade da solução de ovalbumina .....                      | 37 |
| 4.4 Animais alérgicos com dieta HF tem maior redução de peso durante o desafio oral .....                | 38 |
| 4.5 Dieta hiperlipídica associa da a alergia alimentar reduz o índice de adiposidade .....               | 39 |
| 4.6 Dieta hiperlipídica associa da a alergia alimentar reduz a área de adipócitos ....                   | 40 |
| 4.7 A sensibilização e a dieta interferem na adesão e no rolamento de leucócitos no tecido adiposo ..... | 42 |
| 4.8 Dosagens Séricas.....  | 43 |
| 4.8.1 Sensibilização não altera os níveis de glicose e colesterol sérico .....                           | 43 |
| 4.8.2 Animais sensibilizados recebendo dieta HF apresentam menores níveis de triglicérides sérico .....  | 45 |
| 4.8.3 Animais não sensibilizados com dieta HF apresentam maiores níveis de leptina e adiponectina .....  | 45 |
| 4.9 A dieta e a sensibilização não interferem no número total e diferencial de células sanguíneas .....  | 47 |
| 4.10. Avaliação do intestino .....   | 48 |
| 4.10.1. A alergia interfere na morfologia intestinal .....   | 48 |
| 4.10.2. A dieta e a alergia não interferem na relação vilosidade/cripta .....                            | 50 |
| 4.10.3. Sensibilização não interfere nos níveis de IgA secretória .....                                  | 50 |
| 4.10.4 Dieta HF leva ao acúmulo de gordura nos enterócitos .....   | 51 |
| 4.11. Dieta HF e alergia causam alterações no fígado .....   | 53 |
| 4.12. Animais com dieta HF expressam menores níveis de IgE anti-ovalbumina sérica .....                  | 54 |
| 5. DISCUSSÃO .....   | 55 |

|                      |    |
|----------------------|----|
| 6. CONCLUSÃO .....   | 64 |
| 7. REFERÊNCIAS ..... | 65 |

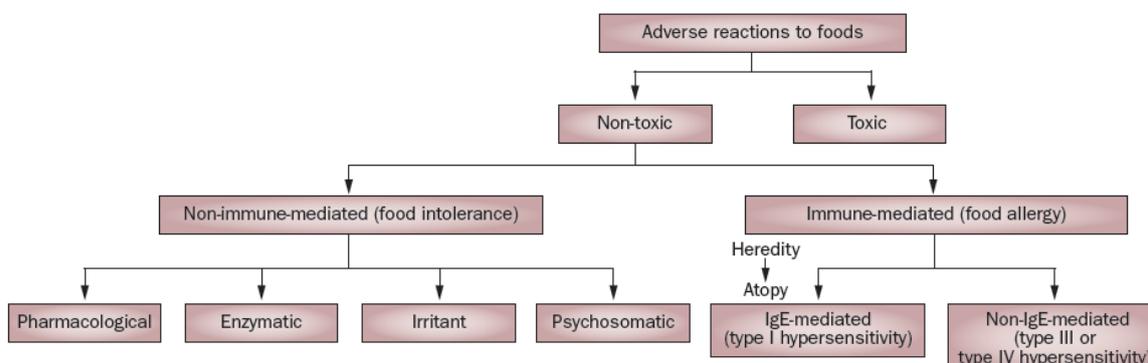
## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Alergia Alimentar**

A alergia alimentar pode ser considerada uma manifestação exacerbada da resposta imunológica aos antígenos que chegam ao organismo pela via oral (Wang e Sampson, 2009; Sicherer e Sampson, 2010; Sicherer, 2011). Segundo o National Institute of Allergy and Infectious Diseases, alergia alimentar é definida como “Um efeito adverso à saúde decorrente de uma resposta imunológica específica que ocorre de forma reprodutível sobre a exposição a um dado alimento” (Sicherer, 2011).

Reações adversas aos alimentos podem ser divididas primariamente em tóxicas e não-tóxicas (Untersmayr e Jensen-Jarolim, 2006). As consideradas tóxicas podem ocorrer devido a componentes tóxicos naturalmente presente em alguns alimentos ou pela presença de agentes contaminantes (Untersmayr e Jensen-Jarolim, 2006). Já as reações não-tóxicas dependem da susceptibilidade de cada indivíduo e podem ser classificadas em não-ímmunes e ímmunes. As não-ímmunes podem ser nomeadas como intolerâncias e dependem das características metabólicas individuais como por exemplo a deficiência em lactase; as propriedades farmacológicas do alimento (presença de mono ou diaminas vasoativas); liberação de histamina não específicas de alimentos (por exemplo alta conteúdo de lectinas, prolaminas, peptonas, poliaminas); e intolerâncias indeterminadas devido a respostas psicossomáticas (Untersmayr e Jensen-Jarolim, 2006; Brandtzaeg, 2010). As reações imunológicas são conhecidas como alergia ou hipersensibilidade e podem ser ou não mediadas por IgE. Aquelas mediadas por IgE constituem a hipersensibilidade tipo I, já as não-mediadas por IgE podem ser consideradas tipo III e IV, sendo o tipo III reações ímmunes complexas envolvendo IgM ou IgG, e as do tipo IV resposta imunológica tardia mediada por células. Existe ainda a atopia que é um traço hereditário que leva a produção de níveis excessivos de anticorpos IgE, predispondo a hipersensibilidade

tipo I (Brandtzaeg, 2010). A figura 1 resume a classificação das reações adversas aos alimentos (Brandtzaeg, 2010).



**Figura 1:** Classificação das reações adversas aos alimentos. Adaptado de BRANDTZAEG, 2010.

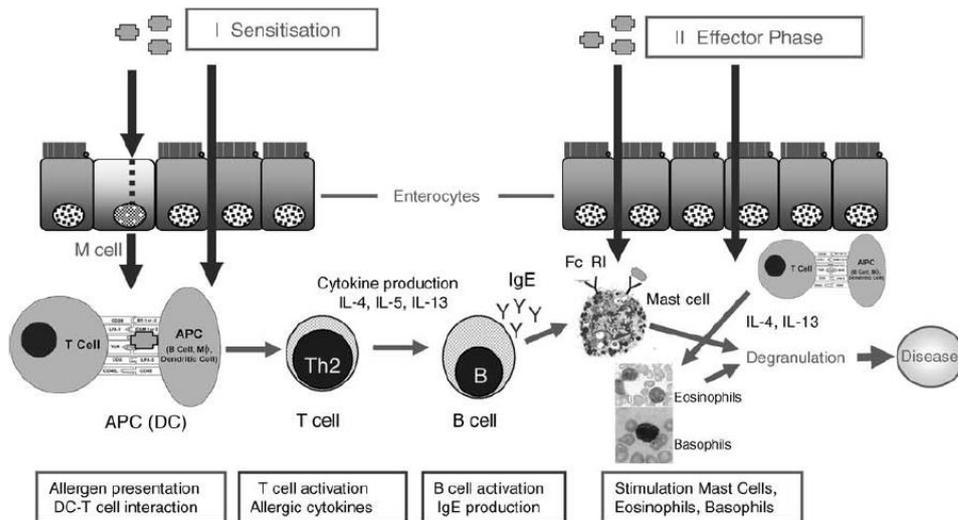
No decorrer desta dissertação o termo alergia será utilizado para fazer referencia à hipersensibilidade tipo I, ou seja, medida por IgE.

O aparecimento e desenvolvimento de alergias envolvem interações complexas entre fatores exógenos (exposição aos alérgenos), infecções, estímulos ambientais, e podem ser determinadas por fatores genéticos (Herz, 2008).

O desenvolvimento da alergia pode ser dividido em duas fases: sensibilização e efetora. A fase de sensibilização é caracterizada pela resposta de imunoglobulinas específicas ao alérgeno e desenvolvimento da imunoglobulina E (IgE) específica. Onde inicialmente, os alérgenos são captados pelas células apresentadoras de antígenos (APC), que estão localizadas no intestino. Em seguida, essas células migram para os linfonodos que drenam esses órgãos e, lá processam as moléculas alergênicas e apresentam as mesmas para os linfócitos T helper ou auxiliares (Th), por via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II). Essa apresentação leva à proliferação de linfócitos T e à síntese de citocinas que, por sua vez, promovem uma resposta característica de linfócitos Th2 (Herz, 2008; Eigenmann, 2009; Leung, Beukema e Shen, 2015). As células Th2 secretam citocinas como interleucina IL-4, IL-

5, IL-13 que estimulam as células B a produzirem as imunoglobulinas IgE (Herz, 2008). Cada uma das citocinas está envolvida em algum fenômeno imunológico, como recrutamento de mastócitos (IL-4,IL-9,IL-13), maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF), maturação de basófilos (IL-3 e IL-4) e diferenciação, proliferação de imunoglobulinas E (IgE) no lugar de imunoglobulinas A (IgA) nos linfócitos B (IL-3 e IL-4) (Holgate e Polosa, 2008). Outra citocina que tem sido associada com a fisiopatologia da alergia é a IL-33 que atua não apenas como uma citocina indutora da resposta Th2, mas também como uma citocina pró-inflamatória em diversas respostas imunes assim como IL-1 e IL-18. (Saluja *et al.*, 2015).

A fase efetora é onde ocorre o processo inflamatório e acontece quando o organismo entra em contato novamente com o antígeno ocorrem ligações com várias moléculas de IgE (*crosslinking*) ligadas aos mastócitos, desencadeando a liberação de histamina e resultando na ativação e liberação de mediadores inflamatórios que causam o recrutamento de células inflamatórias. Dessa forma, ocorre o aparecimento dos sintomas, que podem ser imediatos (de 1 a 30 minutos) ou tardios (entre 6 a 72 horas) (Herz, 2008; Holgate e Polosa, 2008; Martorell *et al.*, 2013). Nas primeiras 4 a 8 horas, neutrófilos e eosinófilos invadem o local da inflamação e liberam diferentes mediadores, tais como o fator de ativação de plaquetas (PAF) e peroxidases. Nas horas tardias (24 a 48 horas) pode ser observada uma inflamação crônica nas áreas afetadas com infiltração de linfócitos e monócitos. Essas células são capazes de liberar o fator de liberação de histamina (HRF), que parece ser responsável pela hiper-responsividade brônquica e cutânea das reações alérgicas (Martorell *et al.*, 2013). (Herz, 2008; A. *et al.*, 2013; Martorell *et al.*, 2013; Martorell, 2013). A Figura 2 representa de maneira resumida as duas fases da alergia alimentar descritas acima.



**Figura 2: Immunopatogênese da alergia.** APC: Células apresentadoras de antígeno, DC: células dendríticas, Imunoglobulina E (IgE), Interleucinas (IL). A alergia alimentar pode ser dividida em duas fases: I – sensibilização e II – efetora. Na fase inicial ocorre um primeiro contato do antígeno como o organismo e é onde são produzidas as imunoglobulinas específicas. Na fase seguinte é quando acontece um novo contato como o antígeno gerando uma resposta inflamatória, adaptado de Herz, 2008.

Os alérgenos alimentares geralmente são proteínas naturalmente presentes nos alimentos e apresentam alguns fatores que podem ser relacionados à sua alergenicidade como; resistência ao trânsito gástrico, à proteólise e a atividade enzimática (Helm e Burks, 2000; Untersmayr e Jensen-Jarolim, 2006).

Os principais alimentos causadores de alergias são: leite de vaca, ovos, amendoim, nozes, camarão, frutos do mar, trigo e soja (Wang e Sampson, 2009; Sicherer e Sampson, 2010; Turnbull, Adams e Gorard, 2015). A maioria das alergias desenvolvidas na infância persistem até a vida adulta, porém algumas crianças desenvolvem tolerância a esses alimentos durante a adolescência (Wang e Sampson, 2009).

No caso do ovo, as proteínas causadoras de alergia são ovomucóide e ovalbumina, ambas presentes na clara do ovo (Martorell *et al.*, 2013). A ovomucóide é a proteína mais alergênica por apresentar resistência ao calor e a digestão enzimática. Já a ovalbumina é a proteína mais abundante na clara do ovo, porém ela é mais sensível ao calor, perdendo a sua capacidade alergênica quando submetida a altas

temperaturas. Sendo assim, pacientes sensibilizados apenas para ovalbumina são capazes de tolerar bem alimentos contendo ovos que foram submetidos a altas temperaturas (Martorell *et al.*, 2013).

As reações alérgicas podem se manifestar em diversos sistemas do organismo como: pele, trato gastrointestinal e trato respiratório (Wang e Sampson, 2009; Sicherer e Sampson, 2010; Martorell *et al.*, 2013). As reações cutâneas podem incluir eritema, prurido, urticária, angioedema ou ainda uma combinação de todas essas manifestações. Os sintomas gastrointestinais mais comuns são náuseas, vômitos, dor abdominal tipo cólica e refluxo nas primeiras horas após a alimentação. Em lactentes as manifestações gastrointestinais podem gerar irritabilidade. No trato respiratório os sintomas podem ser de rinorreia, pieira, dificuldade em respirar e anafilaxia (Wang e Sampson, 2009; Sicherer e Sampson, 2010; Martorell *et al.*, 2013).

A alergia alimentar já tem sido considerada um problema de saúde pública uma vez que ela afeta mais do que 1% a 2% da população, porém não chega a atingir 10% da população mundial (Sicherer e Sampson, 2014). Diversos estudos tem mostrado que a prevalência da alergia alimentar é de aproximadamente 5% a 8% em crianças e jovens e de 2% a 4% em adultos, considerando-se uma prevalência acumulativa de 3% a 6% (Cianferoni e Spergel, 2009; Sicherer e Sampson, 2010; Sicherer, 2011). Além disso, estudos apontam que vem ocorrendo aumento mundial das alergias alimentares (Branum e Lukacs, 2009; Cianferoni e Spergel, 2009; Sicherer e Sampson, 2010). Segundo o US Centers for Disease Control and Prevention a prevalência de alergias alimentares em crianças com idade entre 0 e 17 anos aumentou de 3,4% em 1997-1999 para 5,1% em 2009-2011 (Sicherer e Sampson, 2014). Esse aumento impacta diretamente na qualidade de vida desses pacientes e nos custos para tratamentos (Sicherer, 2011).

Tendo em vista a magnitude das alergias alimentares, tornou-se necessário o desenvolvimento de um modelo experimental que possibilitasse aprofundar os estudos de seus mecanismos, bem com traçar estratégias de tratamento para tal condição

patológica. Os modelos animais são ferramentas poderosas para ajudar a responder algumas das difíceis questões que permeiam a epidemia da alergia alimentar. As pesquisas em humanos ainda são muito limitadas por questões éticas e a chance de se gerar uma reação anafilática fatal no indivíduo estudado é preocupante (Bock, Muñoz-Furlong e Sampson, 2001). Camundongos são os animais predominantemente utilizados no estudo de várias doenças, devido a seu tamanho relativamente pequeno, são animais prolíficos de ciclo reprodutivo rápido, fáceis de serem acondicionados e podem também ser manipulados geneticamente (Aldemir, Bars e Herouet-Guichenev, 2009; Meeusen *et al.*, 2009). O uso de espécies murinas na pesquisa por muitas décadas levou ao contínuo desenvolvimento de ferramentas moleculares que permitiram melhor compreensão dos fenômenos investigados. A caracterização da biologia, imunologia e genética dos camundongos já é bem estabelecida. Todo esse conhecimento fez com que as espécies murinas se tornassem modelos para estudar alergia alimentar. Várias linhagens já foram utilizadas nesses estudos, incluindo C3H/Hej, BALB/c, C57/BL6 e DBA/2 (Mcclain e Bannon, 2006). Uma das maiores barreiras envolvendo modelos murinos no estudo da alergia alimentar é a forte tendência do sistema imune dos animais escolhidos desenvolver tolerância oral aos antígenos ingeridos (Thang *et al.*, 2011; Bailón *et al.*, 2012). Para evitar esse fato, as pesquisas têm se concentrado em certas linhagens que mais rapidamente desenvolvem resposta Th2, a saber: C3H/Hej (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Morafo *et al.*, 2003) e BALB/c (Morafo *et al.*, 2003; Gonipeta *et al.*, 2010; Thang *et al.*, 2011; Bailón *et al.*, 2012).

Dentro desse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo experimental para estudo da alergia a proteína do ovo, a ovalbumina (OVA). Nesse modelo foram utilizados camundongos BALB/c, adultos jovens de ambos os sexos, que foram sensibilizados com injeção subcutânea contendo 10 µg de OVA e 1 mg de adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>. Após a sensibilização os animais receberam solução oral ou

ração contendo OVA (Cara, Conde e Vaz, 1994; Saldanha *et al.*, 2004; Dourado *et al.*, 2011). Após passarem pelo desafio oral, os animais apresentaram diversos sinais característicos da alergia alimentar como: perda de peso corporal acompanhada de diminuição da massa do tecido adiposo; aumento das concentrações sorológicas de IgG1 e IgE anti-ovalbumina; edema no jejuno com infiltração de eosinófilos, hiperplasia celular e aumento da produção de muco; (Saldanha *et al.*, 2004; Dourado *et al.*, 2011). A partir desses estudos foi possível afirmar que esse modelo experimental é capaz de reproduzir alterações clínicas e patológicas da alergia alimentar, sendo uma ferramenta útil para estudos dessa condição clínica (Saldanha *et al.*, 2004).

## **1.2. Alergia alimentar e obesidade**

Diversos estudos tem mostrado que a obesidade aumenta o risco do desenvolvimento de asma atópica e de doenças autoimunes (Hancox *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2005; Hersoug e Linneberg, 2007; Dixon *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado em 2004, o índice de massa corporal (IMC) foi positivamente associado com asma, chiado, atopia e níveis aumentados de IgE, podendo-se concluir que IMC elevado está associado ao desenvolvimento de asma e atopia em mulheres (Hancox *et al.*, 2004).

Acredita-se que essa relação deve-se a diminuição da tolerância imunológica como consequência de alterações do sistema imune induzidas por adipocinas (leptina e adiponectina) e citocinas (IL-6, fator de necrose tumoral (TNF), secretadas pelo tecido adiposo. A obesidade leva a alterações imunológicas resultando em redução da tolerância aos antígenos e induzindo o sistema imune a gerar uma resposta Th2, o que aumenta o risco do aparecimento de alergias e outras doenças imuno-mediadas (Vieira *et al.*, 2005; Hersoug e Linneberg, 2007).

O tecido adiposo produz um grande numero de hormônios que atuam localmente ou em locais distantes, sendo esses capazes de modular respostas imunes, inflamação, funções endócrinas e metabólicas (Gambero *et al.*, 2007). A inflamação crônica do

tecido adiposo está diretamente associada à obesidade e essa inflamação envolve a ativação tanto da resposta imune inata como adaptativa. Sinais de MHC classe II-restritas a macrófagos e células dendríticas contribuem para a ativação das células T em resposta a ações “obesogênicas” e contribuem para a disfunção metabólica. Macrófagos do tecido adiposo e células dendríticas podem funcionar como células apresentadoras de antígenos e fornecem importantes informações para gerar sinais pró-inflamatórias, que incluem a ativação de células T-CD4<sup>+</sup> do tecido adiposo em direção a uma resposta Th1. A obesidade também tem sido relacionada com a indução de células T-CD8<sup>+</sup> no tecido adiposo e a uma diminuição na Tregs que contribuem para um ambiente pró-inflamatório (Morris *et al.*, 2015).

Segundo Visness *et al.*, a obesidade parece estar contribuindo para o aumento da prevalência de doenças alérgicas em crianças, especialmente as alergias alimentares, tendo em vista que a inflamação sistêmica pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento de doenças alérgicas (Visness *et al.*, 2009).

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, a obesidade foi induzida em camundongos através de uma dieta rica em carboidratos simples e foi mostrado que camundongos com obesidade de grau leve e alérgicos apresentam características patológicas semelhantes aos camundongos que consomem dieta padrão e são alérgicos, não apresentando exacerbação do processo de inflamação alérgica. Foi também enfatizada a importância de compreender o efeito de diferentes graus de obesidade e da composição da dieta sobre a resposta alérgica (Yamada *et al.*, 2015).

### **1.3. Dieta Hiperlipídica**

A obesidade é um problema global crescente. Estima-se que, mais de 1 bilhão de adultos no mundo estão acima do peso, sendo que desses 500 milhões serão obesos no futuro. A obesidade tem sido vista como um dos desafios mais graves e onerosos de saúde no mundo moderno, custando à economia mundial cerca de 2 trilhões

anuais, o que é equivalente a 2,8% do produto interno bruto mundial (Beilharz, Maniam e Morris, 2015; Kim *et al.*, 2015; Nishiokada *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas ocorreu uma transição nutricional global onde a subnutrição deu lugar ao consumo excessivo de alimentos. Houve também a substituição das dietas tradicionais por alimentos processados, ricos em carboidratos refinados, gorduras animais e diversos óleos, resultando em uma pandemia global de obesidade (Petrov *et al.*, 2015). O aumento do sobrepeso e da obesidade estão diretamente ligados a uma dieta desequilibrada e com alto teor de gordura (Kim *et al.*, 2015; Nishiokada *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Além do consumo excessivo de alimentos com alto teor calórico, de gorduras e pobres em nutrientes, tem-se notado redução no gasto de energia com atividades de vida diária (Beilharz, Maniam e Morris, 2015; Saravanan e Pari, 2015). Esse ambiente tem sido denominado ambiente obesogênico (Beilharz, Maniam e Morris, 2015). Tal modo de vida é capaz de causar alterações no organismo (Fujiwara *et al.*, 2015).

A ingestão de uma dieta hiperlipídica é capaz de afetar a composição dos ácidos graxos presentes no organismo (Fujiwara *et al.*, 2015). O desequilíbrio de ácidos graxos pode aumentar mediadores inflamatórios no tecido e no sangue, podendo aumentar a inflamação no tecido adiposo causando alterações na regulação e sinalização do receptor de linfócitos, estimular genes relacionados com inflamação e causar a supressão de genes relacionados com o metabolismo de lipídeos (Fujiwara *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015). Além disso, o consumo de uma dieta hiperlipídica leva a um acúmulo de lipídeos hepáticos, podendo gerar inflamação levando ao desenvolvimento de esteato-hepatite não alcoólica (Beilharz, Maniam e Morris, 2015; Fujiwara *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Petrov *et al.*, 2015). O consumo excessivo de gordura também predispõe a outras condições patológicas como: aumento da adiposidade visceral, resistência a insulina, perda óssea, osteoartrite, dislipidemia, intolerância a glicose, síndrome metabólica, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doença da vesícula biliar, alguns tipos de câncer, doenças

respiratórias, distúrbios reprodutivos, depressão, deficiências cognitivas com risco aumentado para desenvolvimento de demência e doença de Alzheimer (Beilharz, Maniam e Morris, 2015; Doucette *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Petrov *et al.*, 2015; Saravanan e Pari, 2015; Wang *et al.*, 2015).

Diante da magnitude das alergias alimentares, do aumento no consumo de dietas hiperlipídicas e tendo em vista que ambas condições impactam diretamente na qualidade de vida dos indivíduos e nos custos com saúde por serem doenças crônicas inflamatórias, o presente trabalho se propôs a investigar a relação entre a alergia alimentar e o consumo de uma dieta hiperlipídica em modelo murino.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a interferência do consumo de uma dieta hiperlipídica nos sinais inflamatórios e em outras alterações metabólicas induzidas pela alergia alimentar experimental a ovalbumina (OVA).

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar se a dieta hiperlipídica interfere nos sinais clínicos observados na alergia alimentar experimental
- Avaliar se a dieta hiperlipídica causa alterações imunológicas na alergia alimentar experimental
- Avaliar se a dieta hiperlipídica causa alterações metabólicas na alergia alimentar experimental
- Avaliar se a dieta hiperlipídica causa alterações histológicas na alergia alimentar experimental

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, com oito a nove semanas de idade. Os animais foram provenientes do CEBIO – Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os camundongos foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia, em gaiolas de plástico, contendo cinco animais/gaiola. Quando chegaram ao biotério, os animais foram vermifugados (Ivermectina 1%, JA Produtos Veterinários, Patrocínio Paulista, SP). Os animais receberam água “*ad libitum*” até o desafio antigênico. Os grupos SDC (dieta padrão, não sensibilizado) e SDS (dieta padrão, sensibilizado) receberam ração para camundongos com composição baseada na AIN (American Institute of Nutrition) - 93G (Reeves, Nielsen e Fahey, 1993) e os grupos HFC (dieta hiperlipídica, não sensibilizado) e HFS (dieta hiperlipídica, sensibilizado) ração hiperlipídica indutora de obesidade, “*ad libitum*” durante todo o experimento.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com os princípios éticos estipulados pelo Comitê de Ética Animal (CETEA) da UFMG e aprovado no protocolo 085/11.

#### **3.2. Preparo e composição das rações**

Para preparo das rações, todos os ingredientes foram pesados e misturados. A mistura de vitaminas foi adicionada por último e ao abrigo da luz. Após a adição de todos os ingredientes, a mistura foi peneirada para homogeneização. Após moldada a ração foi acondicionada em vasilhas plásticas e armazenada em freezer.

**Tabela 1: Composição das dietas utilizadas**

| <b>DIETA AIN-93M – Animais com idade superior a 6 semanas</b> |                   | <b>DIETA HIPERLIPÍDICA - Indutora de Obesidade (HF)</b> |                   |
|---|-------------------|---|-------------------|
| <b>Ingredientes</b>   | <b>Quantidade</b> | <b>Ingredientes</b>                                     | <b>Quantidade</b> |
| BHT   | 0,008 g           | BHT   | 0,014 g           |
| Bitartarato de colina   | 2,50 g            | Bitartarato de colina                                   | 2,50 g            |
| Cistina (metionina)   | 1,80 g            | Cistina (metionina)                                     | 3,00 g            |
| Mix de vitaminas  | 10,00 g           | Mix de vitaminas AIN-93M                                | 10,00 g           |
| Mix de minerais   | 35,00 g           | Mix de minerais AIN-93M                                 | 35,00 g           |
| Celulose  | 50,00 g           | Celulose  | 50,00 g           |
| Óleo de soja  | 40,00 g           | Óleo de soja  | 20,00 g           |
| Sacarose  | 100,00 g          | Sacarose  | 31,00 g           |
| Caseína   | 140,00 g          | Caseína   | 200,00 g          |
| Amido de milho  | 465,692 g         | Amido de milho  | 62,00 g           |
| Maltodextrina   | 155,00 g          | Groselha Cereser®                                       | 310,00 g          |
| Água destilada (para formar os pellets)                       | 300,00 g          | Manteiga sem sal  | 355,00 g          |

**Tabela 2: Composição Groselha Cereser®**

| <b>Groselha Cereser®</b>                |            |
|---|------------|
| <b>Informação Nutricional em 20 mL</b>  |            |
| Carboidrato (Sacarose)                  | 16 gramas  |
| <b>Informação Nutricional em 310 mL</b> |            |
| Carboidrato (Sacarose)                  | 248 gramas |

### 3.3. Protocolo de indução de alergia alimentar a ovalbumina

O modelo de alergia alimentar utilizado neste estudo foi desenvolvido por Saldanha e colaboradores, em 2004. O protocolo de sensibilização deste modelo está esquematizado na Figura 3. Para a indução da alergia alimentar, os camundongos receberam uma injeção com 10µg de OVA (ovalbumina, Grade V, Sigma Chemical Co., USA) adsorvida em 1mg de hidróxido de alumínio - Al(OH)<sub>3</sub> (EMS, Hortolândia, SP) e 0,2mL de salina 0,9% por via subcutânea no dorso (semana 6). Quatorze dias depois (semana 8), os animais receberam um reforço da sensibilização apenas com 10µg do antígeno diluído em salina 0,9%. Os grupos controle receberam o adjuvante diluído em salina na semana 6 e apenas salina após quatorze dias.

Para o desafio antigênico, a partir do sétimo dia após o reforço da sensibilização (semana 9), os camundongos de todos os grupos passaram a receber mamadeira contendo solução de clara de ovo desidratada e pasteurizada (Salto's, Salto, SP) diluída em água filtrada a uma concentração de 20% como única fonte hídrica.

### 3.4. Protocolo de Indução de obesidade

Para induzir o aumento de adiposidade, os animais dos grupos denominados HFC e HFS receberam uma ração rica em lipídeos, denominada dieta HF (Tabela 2), durante as nove semanas do experimento.

A tabela a seguir apresenta a comparação entre uma dieta comercial e uma indutora de obesidade.

**Tabela 3: Distribuição calórica (% do valor calórico total) e densidade calórica da dieta AIN-93M e dieta hiperlipídica (HF)**

|                     | Dieta AIN-93M | Dieta Hiperlipídica |
|---------------------|---------------|---------------------|
| Carboidratos        | 76%           | 24%                 |
| Proteína            | 14%           | 14%                 |
| Gordura total       | 10%           | 62%                 |
| Calorias/g de dieta | 3,8           | 5,4                 |

### 3.5. Delineamento experimental

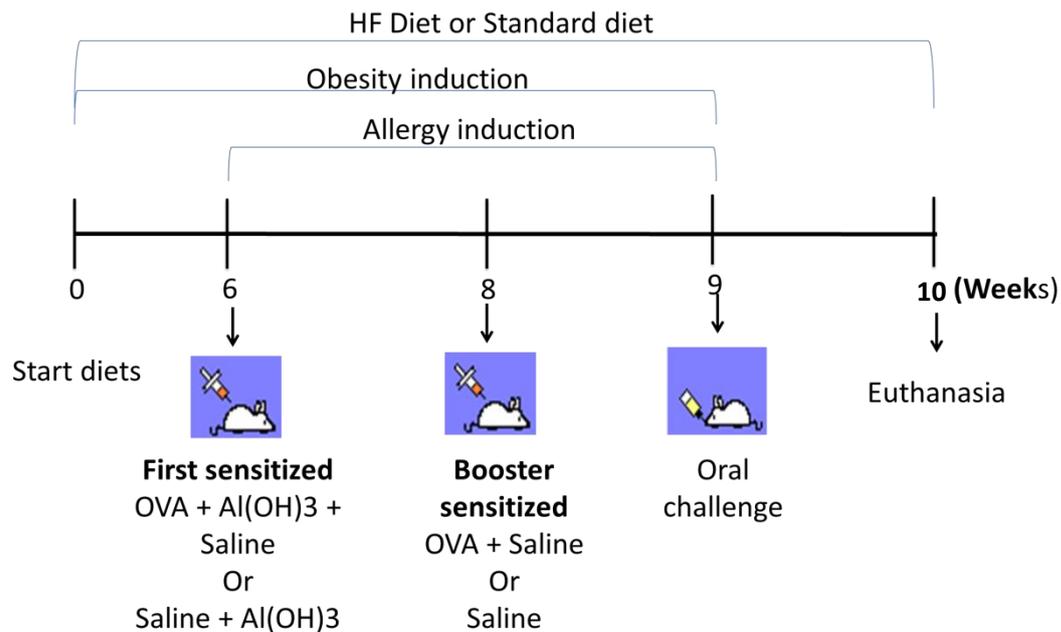
Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- SDC – animais que receberam dieta AIN-93M e que não foram sensibilizados (negativos para alergia).
- SDS – animais que receberam dieta AIN-93M e que foram sensibilizados com OVA (positivos para alergia).
- HFC – animais que receberam dieta HF e que não foram sensibilizados (negativos para alergia).
- HFS – animais que receberam dieta HF e que foram sensibilizados com OVA (positivos para alergia).

Cada grupo foi composto por cinco animais e todos eles foram submetidos ao desafio oral com solução de OVA a 20%.

**Tabela 4: Grupos Experimentais**

| <b>Grupos</b>                         | <b>Dieta</b>   | <b>Procedimento experimental</b>  |
|---------------------------------------|----------------|---|
| <b>Standard Diet Control (SDC)</b>    | <b>AIN-93M</b> | <b>Não sensibilizados</b><br><b>Desafio oral com solução de OVA a 20%</b>     |
| <b>Standard Diet Sensitized (SDS)</b> | <b>AIN-93M</b> | <b>Sensibilização com OVA</b><br><b>Desafio oral com solução de OVA a 20%</b> |
| <b>High-Fat Diet Control (HFC)</b>    | <b>HF</b>      | <b>Não sensibilizados</b><br><b>Desafio oral com solução de OVA a 20%</b>     |
| <b>High-Fat Diet Sensitized (HFS)</b> | <b>HF</b>      | <b>Sensibilizados com OVA</b><br><b>Desafio oral com solução de OVA a 20%</b> |



**Figura 3 – Esquema dos procedimentos.** Escala temporal semanal, onde semana 0: início das dietas em todos os grupos, semana 6: 1ª sensibilização ou imunização primária, semana 8: sensibilização secundária ou reforço, semana 9: início do desafio oral e semana 10: eutanásia.

### 3.6. Eutanásia

Na décima semana de experimento, após sete dias de desafio oral, os camundongos foram submetidos a um período de jejum de aproximadamente 4 horas, onde o consumo de ração foi cessado e a mamadeira contendo solução de OVA foi substituída por água. Em seguida, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg; Dopaser®, Hertape Calier Saúde Animal, Juatuba, MG) e ketamina (100 mg/kg; Vetanarcol®, Laboratórios Konig do Brasil, Santaa de Parnaíba, SP) por via intraperitoneal (i.p.), o sangue foi coletado através dos vasos axilares e posteriormente foi realizado o sacrifício do animal por deslocamento cervical.

Na necropsia, o soro e os órgãos foram retirados. Esses foram congelados a -20° C (soro; intestino delgado; fígado; tecido adiposo mesentérico, epididimal, retroperional e inguinal) ou fixados em formol (jejuno proximal, fígado, tecido adiposo mesentérico e epididimal).

### **3.7. Obtenção do sangue e do soro**

Para a separação do soro, após coagulação, o sangue foi centrifugado a 3000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. O soro foi então retirado, colocado em tubos individuais e congelado (-20°C) para análises posteriores.

### **3.8. Avaliação da Alergia Alimentar a ovalbumina.**

#### **3.8.1 Dosagem de IgE anti-ovalbumina (soro)**

A dosagem de anticorpos IgE foi realizada através do teste de ELISA (Ensaio de Absorção Imunoenzimático). Microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas a -4°C overnight, contendo anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250 (Rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em tampão carbonato pH 9.6, 50µL/poço. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com salina-Tween 20 e incubadas por 1 hora contendo 200µl/poço de solução caseína a 0,25% em tampão salina fosfato (PBS), para bloqueio à temperatura ambiente (TA). Após este período a placa foi lavada 3 vezes salina-Tween 20 e foram adicionados 50µl /poço do soro total das amostras dos animais a serem testados, as placas foram incubadas por 2 horas à TA e lavadas com solução salina-Tween 20 por 5 vezes. As placas foram incubadas por 1 hora à TA com 1µl de OVA-Biotinilada em 50µl de PBS-Caseína, por poço. Após nova lavagem com salina-Tween 20, as placas foram incubadas com 50µl/poço com Streptavidina-Peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na concentração de 1:5000 por 45 minutos à TA. As placas foram lavadas 4 vezes com salina-Tween 20 e em seguida foi realizada a etapa de revelação, foram adicionados 100µl/poço de uma solução de tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ortofenileno-diamino (OPD), as placas foram incubadas em uma câmara escura por 15 minutos à TA até que a reação ocorresse . Decorridos os 15 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de 20µl/poço de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 2 normais de concentração(2N). Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (pool de soros de animais imunes), um controle

negativo (pool de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A OD foi obtida em Leitor de ELISA ( Expert Plus, Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Austria) e lidas com filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.) sendo o padrão positivo considerado como 1000 unidades e as demais amostras comparadas a este valor.

### **3.9. Avaliação dos parâmetros clínicos**

#### **3.9.1 Avaliação do consumo de ração**

Para avaliar a ingestão alimentar de cada grupo de animais, a ração foi pesada antes e depois de ser colocada nas gaiolas, duas vezes por semana durante todo o período de duração do experimento. O resultado foi expresso em gramas através do consumo semanal estimado por grupo. Uma possível perda da ração no fundo da gaiola não foi computada.

#### **3.9.2 Avaliação do consumo da solução de ovalbumina (OVA)**

Para avaliar a ingestão da solução de OVA de cada grupo de animais, o volume da solução foi medido antes e depois da oferta, diariamente, durante os sete dias de desafio oral. O resultado foi expresso em mililitros através do consumo diário estimado por grupo.

#### **3.9.3 Avaliação do peso corpóreo**

O peso corpóreo foi avaliado duas vezes por semana (com intervalo de 3-4 dias), desde o início do experimento (dia 0) até o início do desafio oral (9ª semana). Após o início do desafio oral os animais foram pesados diariamente até o dia do sacrifício.

### **3.10. Avaliação do Tecido Adiposo**

#### **3.10.1 Avaliação do peso do tecido adiposo**

Durante a necropsia, foram retirados e pesados os tecidos adiposos mesentérico, epididimal, retroperionial e inguinal para serem correlacionados ao peso corpóreo do

animal. Após essa análise biométrica, parte de cada um dos tecidos foram fixados em formol para análise histológica e o restante dos tecidos congelados a -20°C para futuras análises.

### 3.10.2 Índice de Adiposidade

O índice de adiposidade é a relação entre a adiposidade e o peso corporal. Ele foi medido para cada um dos animais através da seguinte fórmula:

$$\text{I.A. \%} = \left\{ \frac{\text{Somatório do peso dos Tecidos Adiposos}}{\text{Peso corporal do dia do sacrifício}} \right\} \times 100$$

O resultado foi expresso em porcentagem por grupo.

### 3.10.3 Avaliação histológica do tecido adiposo

O tecido adiposo mesentérico e epididimal foram fixados em formalina 10% durante vinte e quatro horas. Após a fixação, o tecido foi desidratado em álcool etílico absoluto, clarificado em xilol e embebido em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm que foram corados pela técnica de Hematoxilina- Eosina (HE). Para a medida da área dos adipócitos, lâminas histológicas do tecido adiposo mesentérico e epididimal coradas por H.E., foram analisadas utilizando-se um microscópio (Olympus Optical Co., Japan, B201), em um aumento de 10X, equipado com uma câmera digital (Moticam 2500, China). A medida da área de 50 adipócitos por grupo foi realizada através do software Image J. O resultado foi expresso pela área do adipócito em µm<sup>2</sup>.

### 3.10.4 Microscopia intravital no tecido adiposo

Para a realização da microscopia intravital, os camundongos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg; Dopaser®, Hertape Calier Saúde Animal, Juatuba, MG) e ketamina (100 mg/kg; Vetanarcol®, Laboratórios Konig do Brasil, Santana de Parnaíba, SP) por via intraperitoneal (i.p.). Durante a microscopia intravital, os animais receberam injeção

intravenosa de rodamina 6G (Sigma Chemical Co., USA) (0,15mg/Kg) para marcação das células, uma vez que o tecido adiposo não é translúcido. O tecido adiposo mesentérico foi exposto para a análise das interações entre leucócitos e endotélio na microcirculação.

A microcirculação foi visualizada por meio de um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse, Japan) conectado a uma câmera (Nikon, Japan) que transmite a imagem a um monitor de televisão. Foram feitos vídeos de um minuto cada, e esses gravados para análises posteriores.

Para as análises, foram escolhidas vênulas de calibre entre 10 e 40  $\mu\text{m}$ . Os leucócitos em rolamento foram avaliados contando-se o número de células que passavam por um determinado ponto da vênula por minuto. O leucócito foi considerado aderido se permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos, sendo a adesão leucocitária total quantificada como o número de células aderidas em 100 $\mu\text{m}$  de extensão da vênula.

### **3.11. Dosagens Séricas**

#### **3.11.1 Dosagem de leptina, adiponectina e resistina**

A leptina, adiponectina e resistina plasmáticas foram determinadas através de kits da R&D Systems. As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas. As dosagens foram feitas através do teste de ELISA.

#### **3.11.2 Dosagem de colesterol total**

As dosagens foram feitas através do teste de ELISA com o kit KATAL<sup>®</sup>.

O soro foi homogeneizado e colocado em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, foram determinadas as absorbâncias do teste e do padrão em 500 nm acertando o zero com o branco.

Para obtenção do resultado foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = (\text{Absorbância do Teste} \div \text{Absorbância do Padrão}) \times 200$$

### **3.11.3 Dosagem de triglicérides**

As dosagens foram feitas através do teste de ELISA com o kit KATAL<sup>®</sup>.

O soro foi homogeneizado e colocado em banho-maria a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, foram determinadas as absorbâncias do teste e do padrão em 500 nm acertando o zero com o branco.

Para obtenção do resultado foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = (\text{Abs. do Teste} \div \text{Abs. do Padrão}) \times 200$$

### **3.11.4 Dosagem de glicose**

As dosagens foram feitas através do teste de ELISA com o kit KATAL<sup>®</sup>.

O soro foi homogeneizado e colocado em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. Em seguida, foram determinadas as absorbâncias do teste e do padrão em 505 nm acertando o zero com o branco.

Para obtenção do resultado foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = (\text{Abs. do Teste} \div \text{Abs. do Padrão}) \times 100.$$

## **3.12. Avaliação do Intestino**

### **3.12.1 Coleta do lavado intestinal**

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

### **3.12.2 ELISA para sIgA do Muco do Intestino Delgado**

Os títulos de anticorpos no muco foram medidos por ELISA. As placas (Nunc-Immuno Plates MaxiSorp) foram incubadas com solução (100µl/poço) contendo

anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:2000) em tampão carbonato pH=9,6 por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,25% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 µl/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por duas vezes.

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

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

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

### **3.12.3 Preparo do intestino delgado para análise histológica**

O intestino foi lavado com salina fisiológica para retirada das fezes e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. A porção utilizada para preparo das lâminas foi o jejuno proximal, do qual foram retirados aproximadamente 2 cm que foram abertos longitudinalmente e colocados sobre papel filtro, com lúmen voltado para fora. Esse papel contendo o tecido foi então colocado dentro de um cassete que teve seu fundo coberto por uma fina camada de esponja. Em seguida, os cassetes com o tecido foram colocados em formol tamponado. As lâminas foram preparadas a partir desse material e coradas com HE para futuras análises.

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

Imagens das lâminas histológicas dos vilos intestinais coradas com HE foram capturadas a partir do microscópio Olympus Optical Co., Japan, B201, em aumento de 4x. Os vilos e as criptas foram medidos através do software Image J. O resultado foi apresentado pela relação entre os tamanhos de vilo e cripta, sendo a média de cinco animais.

### **3.12.5 Avaliação de enterócitos gordurosos**

Para avaliação da quantidade de enterócitos gordurosos presentes no intestino delgado, as lâminas histológicas do jejuno proximal coradas por HE, foram analisadas utilizando-se um microscópio (Olympus Optical Co., Japan, B201), e fotografadas em um aumento de 20X, equipado com uma câmera digital (Moticam 2500, China). Foi feita a medida da área dos enterócitos gordurosos em uma das vilosidades encontradas na imagem. A escolha da vilosidade foi feita a partir da sua representatividade de todo o campo. Foi feita a análise de uma lâmina por animal. Essa medida foi realizada através do software Image J. O resultado foi expresso em área de enterócitos gordurosos ( $\mu\text{m}^2$ ).

### **3.13. Avaliação histológica do fígado**

O fígado foi fixado em formalina 10% durante vinte e quatro horas. Após a fixação, o tecido foi desidratado em álcool etílico absoluto, clarificado em xilol e embebido em parafina. Foram realizados cortes de 5  $\mu\text{m}$  que foram corados pela técnica de HE. As análises histológicas do fígado corado foram realizadas utilizando-se um microscópio (Olympus Optical Co., Japan, B201), em um aumento de 10X, equipado com uma câmera digital (Moticam 2500, China).

### **3.14. Contagem total e diferencial de leucócitos**

Para contagem total de leucócitos, uma amostra de sangue foi diluída na proporção 1:10 em solução de Türk. O sangue foi obtido da cauda dos animais após um pequeno corte na ponta da mesma. A contagem total foi realizada em microscópio ótico (Olympus), usando câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada após aplicação da técnica de coloração com kit panóptico das lâminas com esfregaço sanguíneo.

### **3.15. Análise estatística**

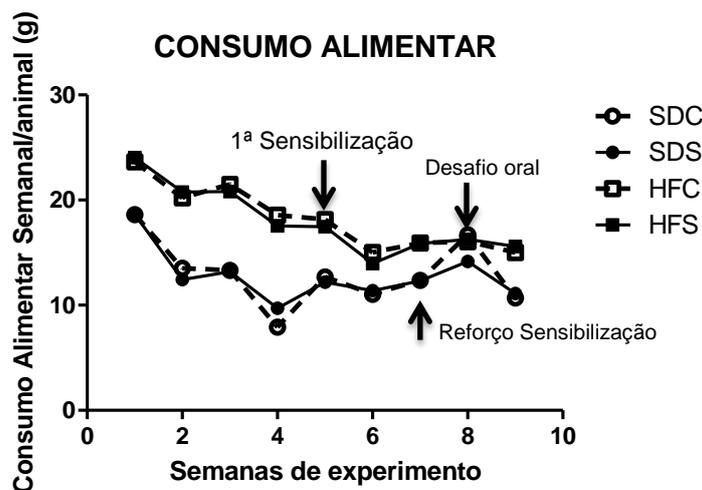
Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 e apresentados como média +/- desvio-padrão da média. Para a análise estatística, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA seguida do teste Tukey ou ao *test t*. O nível de significância foi considerado quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Sensibilização em conjunto com dieta HF aumenta o consumo alimentar

Para avaliar o consumo alimentar dos animais as rações foram pesadas duas vezes por semana durante todo o período de experimento.

Os animais dos grupos com dieta HF (HFC e HFS) apresentaram maior consumo alimentar em algumas semanas do experimento quando comparado aos grupos com dieta padrão (SDC e SDS). Comparando os animais sensibilizados com os seus respectivos controles, foi possível observar que o consumo alimentar foi semelhante. Além disso, notou-se que a sensibilização e o desafio oral não interferiram no consumo alimentar independente da dieta ofertada (Figura 4).

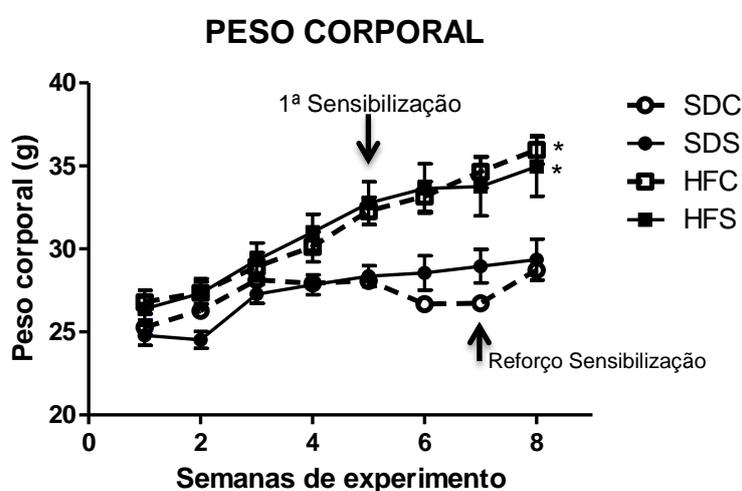


**Figura 4: Consumo alimentar.** Grupos HFC e HFS apresentaram maior consumo alimentar durante alguns períodos do experimento. A sensibilização e o desafio oral não interferiram no consumo alimentar. O resultado foi expresso em gramas através do consumo semanal estimado por grupo.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

## 4.2 Sensibilização juntamente com consumo de dieta HF altera o peso corporal

Para avaliar a variação de peso corporal os animais foram pesados duas vezes por semana até o início do desafio oral.

Os animais dos grupos HFC e HFS apresentaram maior ganho de peso corporal do que os animais dos grupos SDC e SDS respectivamente, até a oitava semana de experimento onde foi iniciado o desafio oral. Nota-se também que a sensibilização não interferiu no ganho de peso de nenhum dos grupos (Figura 5).



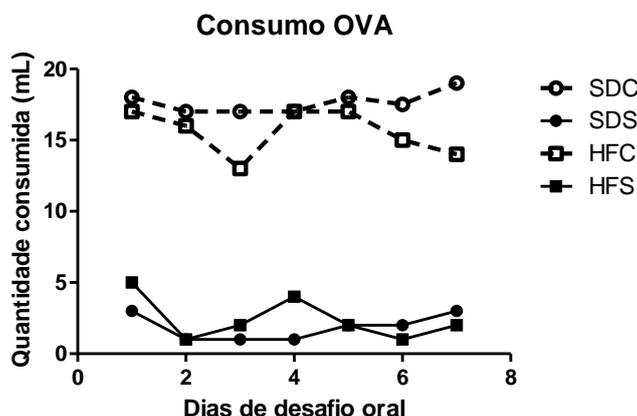
**Figura 5: Evolução do peso corporal.** Grupos HFC e HFS apresentaram maior ganho de peso corporal até a oitava semana de experimento. A sensibilização não interferiu no ganho de peso. O resultado foi expresso em gramas através do peso aferido de cada animal. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

## 4.3 Animais sensibilizados consomem menor quantidade da solução de ovalbumina

Para avaliar o consumo da solução de ovalbumina, a quantidade das mamadeiras foi medida diariamente durante todo o desafio oral.

Os animais sensibilizados (SDS e HFS) apresentaram menor consumo da solução durante todo o período em relação aos animais não sensibilizados (SDC e HFC). Os

grupos SDC e HFC tiveram consumo semelhante. Os grupos SDS e HFS quando comparados, apresentaram ingestão da solução de OVA semelhante durante todo o período, o que indica que a dieta não interferiu na quantidade de OVA consumida (Figura 6).

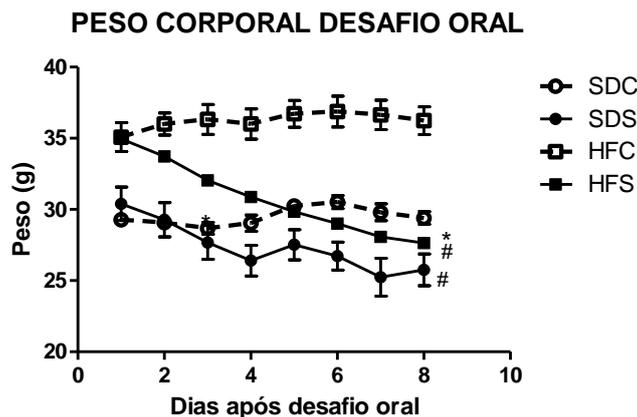


**Figura 6: Consumo da solução de Ovalbumina.** Grupos SDS e HFS apresentaram menor consumo da solução de OVA durante todo o desafio oral. O consumo dos grupos SDC e HFC foi semelhante, assim como nos grupos SDA e HFA. O resultado foi expresso em mililitros através do consumo diário estimado por grupo.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.4 Animais alérgicos com dieta HF tem maior redução de peso durante o desafio oral

Durante o desafio oral o peso dos animais foi aferido diariamente.

Os grupos SDC e HFC não apresentaram variações significativas de peso durante o desafio oral, sendo assim o grupo HFC manteve um peso mais elevado quando comparado ao SDC. Já os grupos SDS e HFS tiveram redução significativa de peso significativa durante esse período quando comparados com seus controles. Além disso, o peso final do grupo HFS foi diferente do grupo SDS indicando uma perda de peso corporal mais intensa (Figura 7).

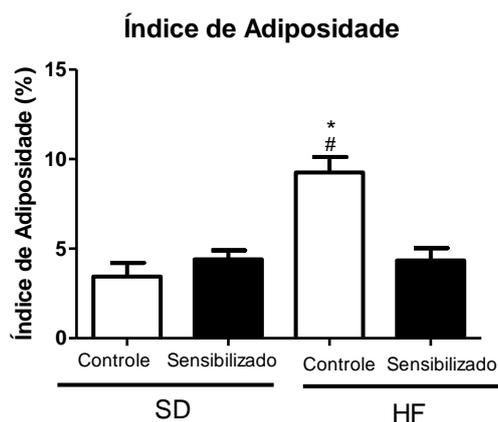


**Figura 7: Evolução do peso corporal durante o desafio oral.** Grupos SDC e HFC não tiveram alterações significativas de peso corporal durante todo o desafio oral. Os grupos SDS e HFS apresentaram redução de peso durante este período. O grupo HFS exibiu uma redução de peso mais intensa que o grupo SDS. O resultado foi expresso em gramas através do peso aferido de cada animal. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta. # $P < 0,05$  em relação ao seu controle não sensibilizado.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.5 Dieta hiperlipídica associada a alergia alimentar reduz o índice de adiposidade

Para calcular o índice de adiposidade foram utilizados os pesos dos tecidos adiposos mesentérico, epididimal, retroperitoneal e inguinal, aferidos no dia da eutanásia.

Os animais do grupo HFC apresentaram o maior índice de adiposidade quando comparado aos grupos HFS e SDC. Os demais grupos tiveram índices de adiposidade semelhantes (Figura 8). Esse resultado indica que a dieta HF quando não associada a nenhum fator patológico é capaz de aumentar o índice de adiposidade de camundongos e que quando associada a alergia alimentar esse índice é reduzido.

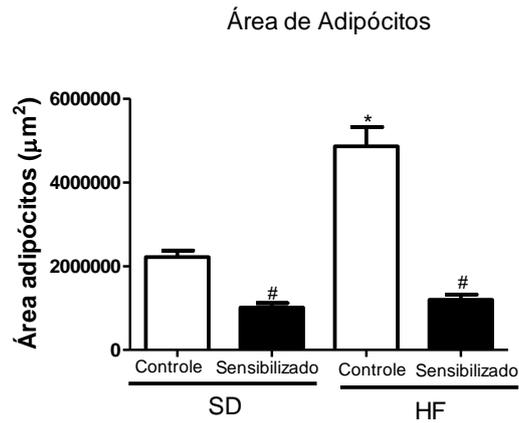


**Figura 8: Índice de adiposidade.** O grupo HFC apresentou o maior índice de adiposidade. Os demais grupos tiveram índices semelhantes. O resultado foi expresso em porcentagem por grupo. \*P<0,05 em relação ao grupo controle SD. #P<0,05 em relação ao grupo sensibilizado HF. *n* = 5 animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.6 Dieta hiperlipídica associa da a alergia alimentar reduz a área de adipócitos

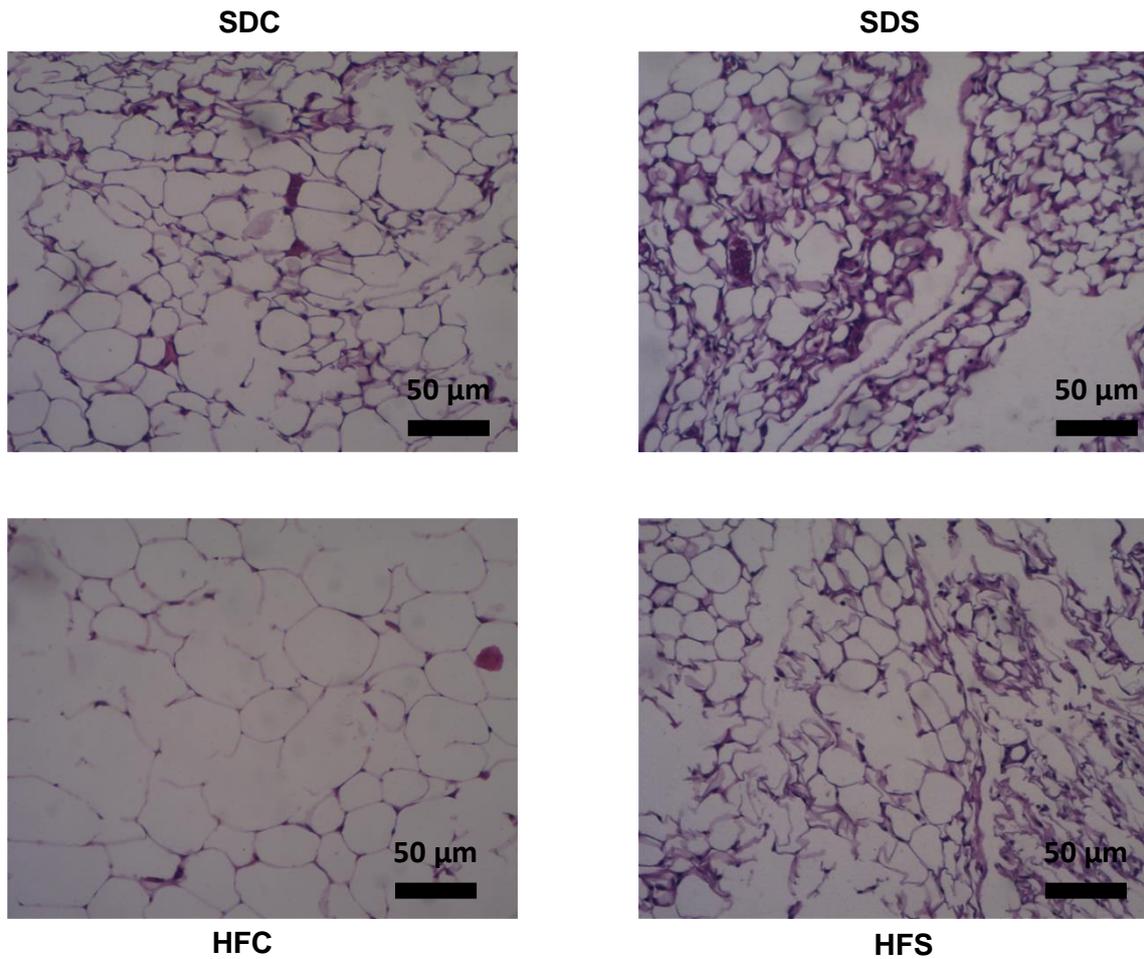
Para calcular a área de adipócitos lâminas histológicas do tecido adiposo epididimal coradas por H.E. foram analisadas através do software Image J, foi realizada a medida da área de 50 adipócitos por grupo.

O grupo HFC apresentou a maior área de adipócitos em relação ao grupo SDC. Os grupos SDS e HFS exibiram valores semelhantes. O grupo SDS teve menor área de adipócitos quando comparado aos grupos SDC, assim como o grupo HFS em relação ao grupo HFC (Figura 9). Esse resultado corrobora com o resultado de índice de adiposidade.



**Figura 9: Área de adipócitos.** O grupo HFC apresentou a maior área de adipócitos em relação ao grupo SDC. Os grupos SDA e HFA tiveram áreas semelhantes. O grupo SDS exibiu menor área quando comparado com SDC, assim como o HFS em relação ao HFC. O resultado foi expresso pela área do adipócito em  $\mu\text{m}^2$ . \* $P < 0,05$  em relação ao grupo controle SD. # $P < 0,05$  em relação ao seu controle não sensibilizado.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

Abaixo são apresentadas fotografias das lâminas histológicas do tecido adiposo epididimal utilizadas para cálculo da área de adipócitos (Figura 10). As imagens são representativas de cada grupo.



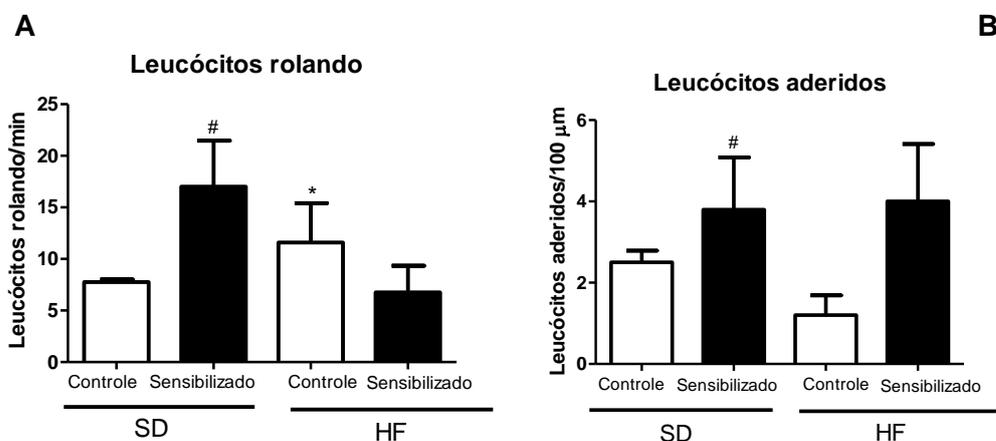
**Figura 10: Lâminas histológicas de tecido adiposo epididimal.** Imagens representativas do tecido adiposo epididimal dos grupos SDC, SDS, HFC e HFS.

#### **4.7 A sensibilização e a dieta interferem na adesão e no rolamento de leucócitos no tecido adiposo**

Para análise da adesão e rolamento de leucócitos no tecido adiposo foi realizada microscopia intravital do tecido adiposo epididimal. Foram feitos vídeos de um minuto cada, onde essa atividade foi analisada. O leucócito foi considerado aderido se permaneceu estacionário por pelo menos trinta segundos.

O grupo SDS apresentou maior adesão e rolamento de leucócitos quando comparado ao seu controle não sensibilizado (SDC). O grupo HFS mostrou um aumento de leucócitos aderidos em relação ao HFC, porém essa diferença não foi estatisticamente

significativa. O grupo HFC apresentou maior rolamento de leucócitos quando comparado ao SDC (Figura 11).



**Figura 11: Adesão e rolamento de leucócitos no tecido adiposo epididimal.** O grupo SDS apresentou maior adesão (B) e rolamento (A) de leucócitos em relação ao SDC. O grupo HFC apresentou maior rolamento de leucócitos (A) quando comparado ao SDC. O grupo HFS apresentou maior adesão que HFC, porém sem diferença estatística. O resultado foi expresso em número absoluto de leucócitos. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta. <sup>#</sup> $P < 0,05$  em relação ao seu controle não sensibilizado.  $n = 5$  animais/grupo nos grupos SDC, SDS e HFC.  $n = 3$  animais/grupo no grupo HFS. 7 dias de desafio antigênico.

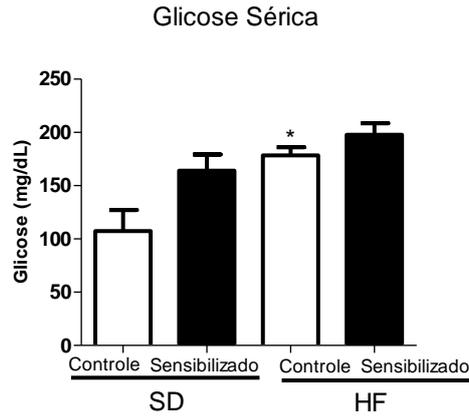
## 4.8 Dosagens Séricas

### 4.8.1 Sensibilização não altera os níveis de glicose e colesterol sérico

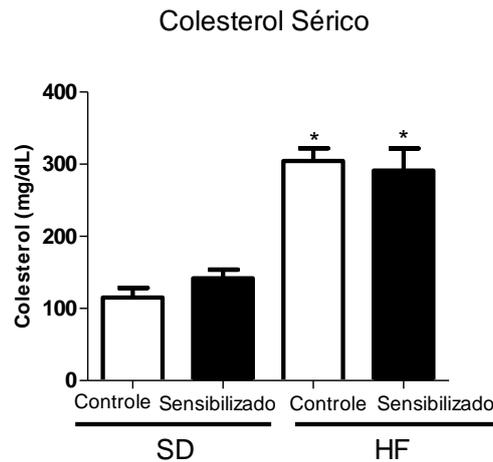
A glicose e colesterol foram dosados no soro de cada um dos animais após jejum de quatro horas.

Os animais do grupo HFC apresentaram maiores níveis de glicose sérica quando comparados ao grupo SDC. Os grupos SDC e SDS exibiram valores semelhantes, assim como HFC comparado ao HFS (Figura 12).

Quanto ao colesterol, os grupos HFC e HFS apresentaram maiores níveis séricos de colesterol do que seus respectivos controles. Quando comparados HFC e HFS exibiram valores semelhantes, assim como SDC e SDA (Figura 13).



**Figura 12: Concentração sérica de glicose.** O grupo HFC apresentou maiores valores de glicose sérica quando comparado ao grupo SDC. Os grupos SDC e SDA exibiram níveis semelhantes de glicose, assim como HFC e HFS. O resultado foi expresso em miligramas/mililitro. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

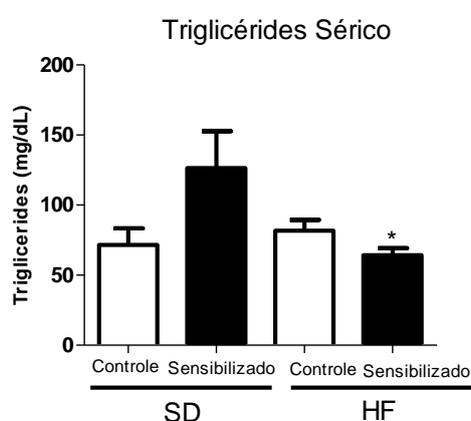


**Figura 13: Concentração sérica de colesterol.** Os grupos HFC e HFS apresentaram maiores valores de colesterol sérico quando comparados aos grupos SDC e SDS. Quando comparados, os grupos SDC e SDS exibiram níveis semelhantes de colesterol, assim como os grupos HFC e HFS. O resultado foi expresso em miligramas/mililitro. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.8.2 Animais sensibilizados recebendo dieta HF apresentam menores níveis de triglicérides sérico

Os triglicérides foram dosados no soro de cada um dos animais após jejum de quatro horas.

Os animais sensibilizados que receberam dieta HF (HFS) apresentaram menores valores de triglicérides séricos quando comparados com o grupo SDS. Os demais grupos exibiram valores semelhantes (Figura 14).



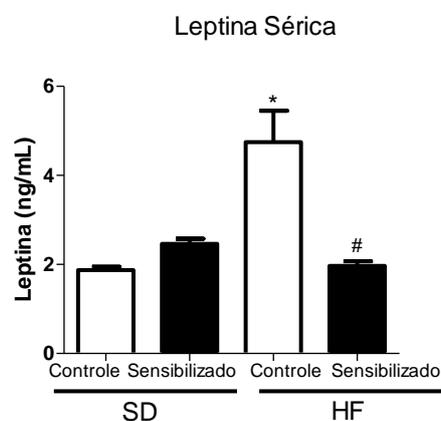
**Figura 14: Concentração sérica de triglicérides.** O grupo HFS apresentou menores níveis de triglicérides sérico quando comparado com o grupo SDS. Os demais grupos tiveram valores semelhantes de triglicérides. O resultado foi expresso em miligramas/mililitro. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.8.3 Animais não sensibilizados com dieta HF apresentam maiores níveis de leptina e adiponectina

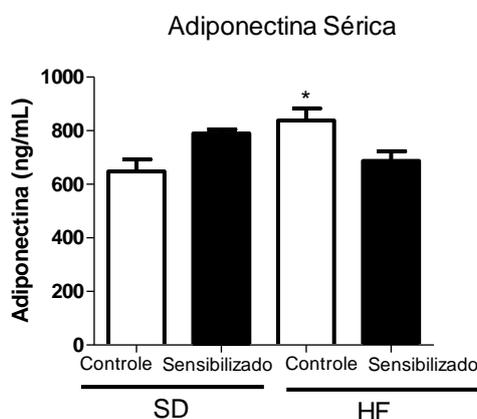
Os níveis de resistina, leptina e adiponectina foram dosados no soro de cada um dos animais.

Os animais do grupo HFC apresentaram maiores níveis de leptina quando comparados com o grupo SDC. Já os animais do grupo HFS apresentaram menores níveis de leptina em relação ao HFC. Os grupos SDC e SDS não tiveram diferenças (Figura 15). Quanto a adiponectina, os maiores valores foram observados no grupo

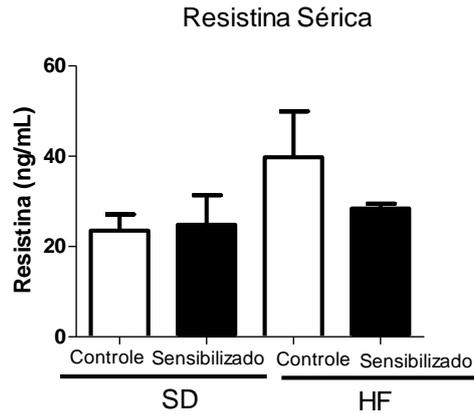
HFC quando comparado ao grupo SDC. Os demais grupos exibiram valores semelhantes (Figura 16). Os grupos não apresentaram diferença significativa nos níveis de resistina sérica (Figura 17).



**Figura 15: Concentração de leptina sérica.** O grupo HFC apresentou a maior concentração de leptina sérica em relação ao SDC. O grupo HFS teve menor nível sérico de leptina quando comparado ao grupo HFC. O resultado foi expresso em nanograma/mililitro. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta. # $P < 0,05$  em relação ao seu controle não sensibilizado.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.



**Figura 16: Concentração de adiponectina sérica.** O grupo HFC apresentou a maior concentração de adiponectina sérica em relação ao grupo SDC. Os demais grupos exibiram valores semelhantes. O resultado foi expresso em nanograma/mililitro. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

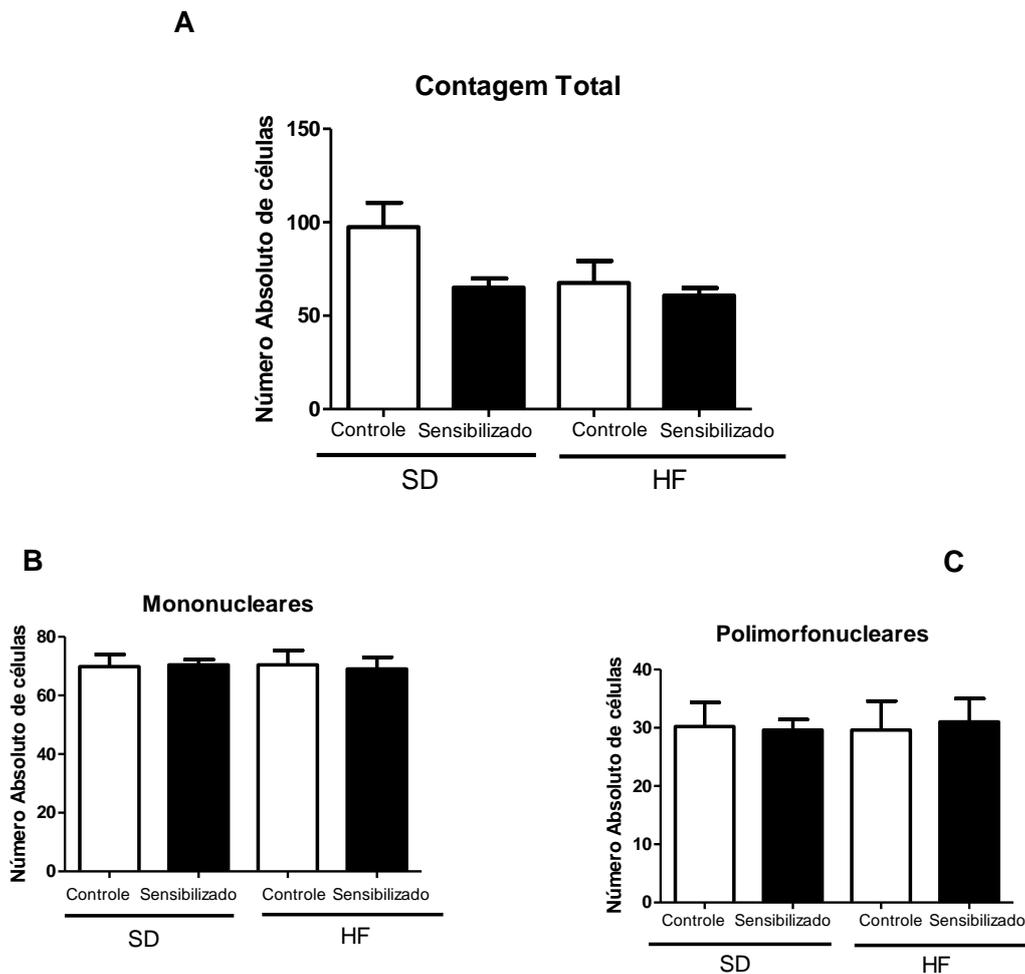


**Figura 17: Concentração de resistina sérica.** Não foi observada diferença significativa das concentrações de resistina sérica entre os grupos. O resultado foi expresso em nanograma/mililitro.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.9 A dieta e a sensibilização não interferem no número total e diferencial de células sanguíneas

Para realização da contagem total e diferencial de células sanguíneas foi retirada uma pequena quantidade de sangue da cauda de cada um dos animais.

Não foi observada diferença na contagem total e diferencial de células sanguíneas independentemente da sensibilização ou da dieta ofertada (Figura 18).



**Figura 18: Contagem total e diferencial de células sanguíneas.** Não foi observada diferença na contagem total de células (A). Também não houve diferença no número de células mononucleares (B) e polimorfonucleares (C). O resultado foi expresso em número absoluto de células.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.10. Avaliação do intestino

##### 4.10.1. A alergia interfere na morfologia intestinal

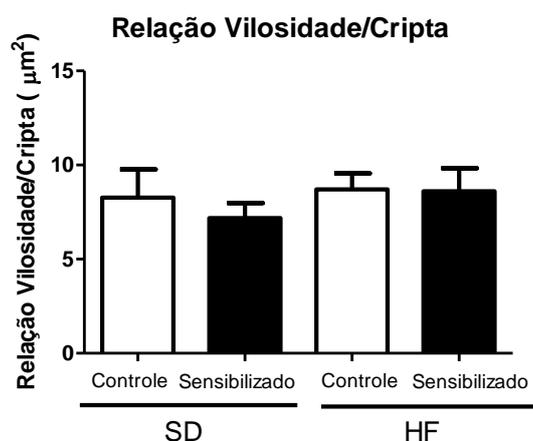
Através da análise de lâminas histológicas nota-se uma redução do tamanho da mucosa dos animais do grupo SDS (Figura 19), sendo possível também, perceber que os animais alérgicos com dieta padrão apresentam uma modificação na morfologia intestinal, podendo ser observado mudança no formato das vilosidades e presença de edema nas mesmas (Figura20).



#### 4.10.2. A dieta e a alergia não interferem na relação vilosidade/cripta

Para calcular a relação vilosidade/cripta foram usadas lâminas histológicas coradas em H.E. A análise foi feita com auxílio do software Image J.

A relação vilosidade/cripta não apresentou diferença entre os grupos (Figura 21). Esse resultado indica que não houve diferença na relação vilosidade/cripta independente da dieta utilizada e da presença ou não de patologia.

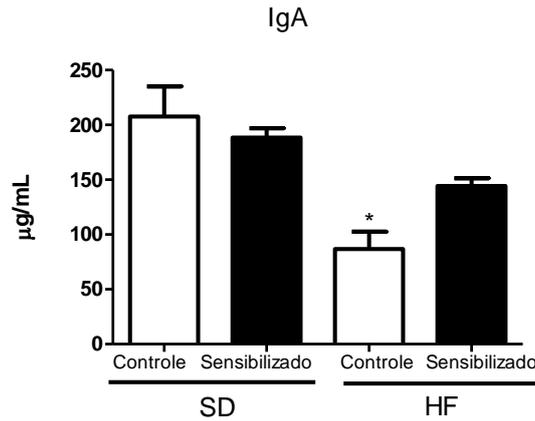


**Figura 21: Relação Vilosidade/Cripta.** Não houve diferença na relação vilosidade/cripta entre os grupos analisados. O resultado foi expresso  $\mu\text{m}^2$  apresentando a relação vilosidade/cripta.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.10.3. Sensibilização não interfere nos níveis de IgA secretória

Para dosagem de IgA secretória foi utilizado o lavado intestinal, obtido no dia da eutanásia.

O grupo HFC apresentou os menores valores de IgA quando comparado ao grupo SDC. Os demais grupos exibiram valores semelhantes (Figura 22).



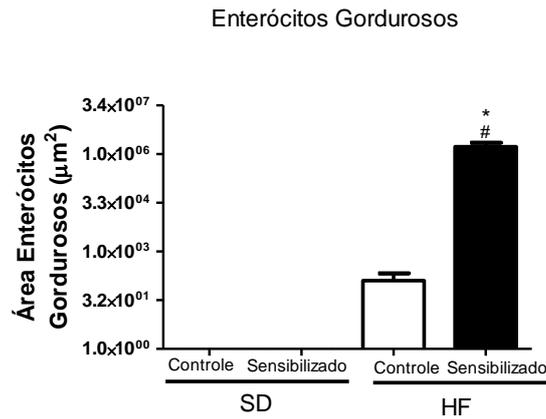
**Figura 22: IgA secretória do lavado intestinal.** O grupo HFC apresentou os menores valores de IgA em relação ao grupo SDC. O resultado foi expresso em microgramas/mililitro. \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

#### 4.10.4 Dieta HF leva ao acúmulo de gordura nos enterócitos

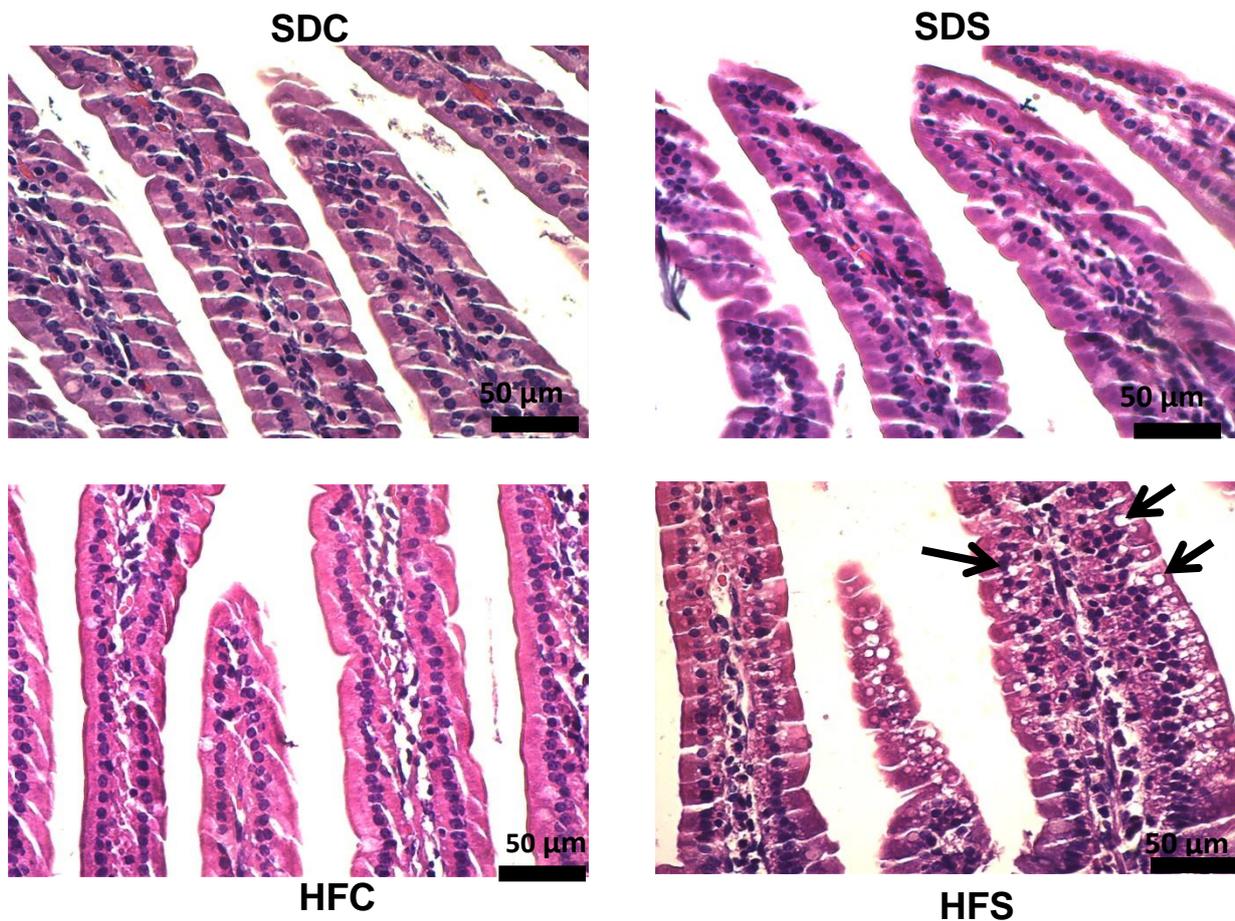
A quantificação da área de enterócitos gordurosos foi feita a partir de lâminas histológicas coradas em H.E. com o auxílio do software Image J.

Através dessa análise foi possível perceber que apenas animais que receberam dieta HF possuem enterócitos gordurosos. Sendo que os animais do grupo HFS apresentaram a maior área de enterócitos gordurosos quando comparado aos grupos HFC e SDS (Figura 23).

A presença desses enterócitos está representada abaixo na fotografia representativa da lâmina histológica (Figura 24).



**Figura 23: Área de enterócitos gordurosos.** O grupo HFS apresentou maior área de enterócitos gordurosos quando comparado grupos HFC e SDS. O resultado foi expresso em área de enterócitos gordurosos em  $\mu\text{m}^2$ . \* $P < 0,05$  em relação ao seu controle da dieta. # $P < 0,05$  em relação ao seu controle não sensibilizado.  $n = 5$  animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

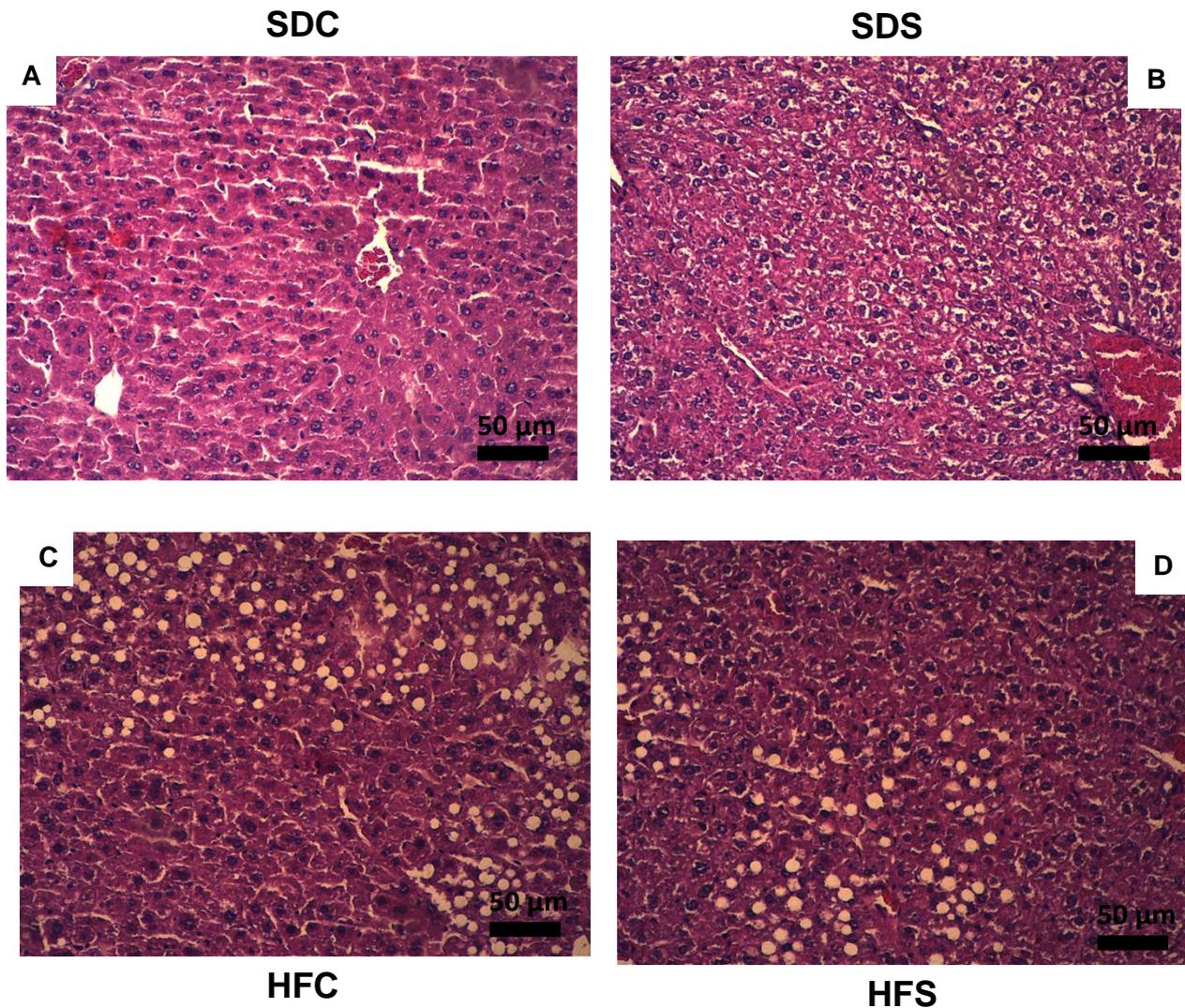


**Figura 24: Lâminas histológicas do intestino delgado.** Imagens representativas do intestino delgado dos grupos SDC, SDS, HFC e HFS. As setas indicam os enterócitos gordurosos encontrados no grupo HFS.

#### 4.11. Dieta HF e alergia causam alterações no fígado

As alterações no fígado puderam ser percebidas através da análise das lâminas histológicas coradas em H.E.

O grupo SDC apresenta o fígado sem alterações. Já no fígado dos animais do grupo SDS é possível notar a ocorrência de degeneração hidrópica. O grupo HFC apresentou presença de gordura no fígado e no grupo HFS observam-se ambas alterações (degeneração hidrópica e acúmulo de gordura) (Figura 25).

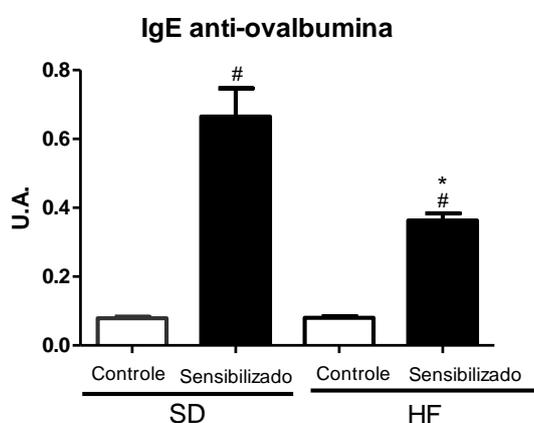


**Figura 25: Lâminas histológicas de fígado.** Fígado saudável (A), degeneração hidrópica (B), acúmulo de gordura (C), degeneração hidrópica e acúmulo de gordura (D).

#### 4.12. Animais com dieta HF expressam menores níveis de IgE anti-ovalbumina sérica

Os animais que foram sensibilizados com OVA após serem submetidos ao desafio oral apresentaram um aumento nos níveis séricos de IgE, o que indica que eles se tornaram-se alérgicos. Já aqueles que durante a sensibilização receberam salina, mesmo após o desafio oral, não tiveram seus níveis de IgE anti-ovalbumina elevados (Figura 26).

Os animais do grupo SDS apresentaram os maiores níveis de IgE em relação ao seu controle não sensibilizado. O grupo HFS teve níveis de IgE mais elevado quando comparado com os grupo SDA e HFC. Comparando os grupos controle (SDC e HFC), foi possível observar que ambos apresentaram os mesmos níveis de IgE. Tal resultado indica que animais sensibilizados recebendo dieta HF expressam menores valores de IgE quando comparados aos animais sensibilizados que receberam dieta padrão.



**Figura 26: Níveis séricos de IgE anti-ovalbumina.** Grupos SDC e SDS, receberam dieta AIN 93-M. Grupos HFC e HFS receberam dieta HF. Todos os grupos passaram por desafio oral. Os grupos controle (SDC e HFC) não apresentaram elevação nos níveis de IgE. Já os grupos SDS e HFS tiveram seus níveis de IgE aumentados, sendo que o grupo HFS apresentou os menores valores em relação ao grupo SDS. Resultados expressos em unidades arbitrárias (U.A.) +/- SEM. \*P<0,05 em relação ao seu controle da dieta. #P<0,05 em relação ao seu controle não sensibilizado. *n* = 5 animais/grupo. 7 dias de desafio antigênico.

## 5. DISCUSSÃO

Os animais que receberam dieta rica em gordura apresentaram um maior consumo alimentar que parece estar associado a maior palatabilidade conferida pelos lipídios. Kerr et al mostraram em sua revisão que os lipídios são os responsáveis pelo aumento da palatabilidade da dieta de suínos (Kerr, Kellner e Shurson, 2015). Em estudo com humanos, Corbin et al realizaram uma análise sensorial de carne e mostram que o teor de gordura foi o principal fator interferente na aceitabilidade das amostras (Corbin *et al.*, 2015). A alta palatabilidade dos lipídios dietéticos ocorre inicialmente na cavidade oral onde os ácidos graxos provenientes dos alimentos liberam triglicerídeos através da ação da lipase lingual e esses são reconhecidos pelos receptores do paladar, em seguida o sinal é transmitido para o cérebro através dos nervos gustativos. No trato gastrointestinal a gordura é digerida e absorvida e sinais são enviados ao cérebro por mecanismos ainda desconhecidos. As informações dos receptores sensoriais e do tecido periférico são integradas no cérebro resultando em um forte apetite por alimentos gordurosos. Essa preferência é induzida por vários mecanismos dependentes da concentração de gordura como: preferência gratificante via mecanismo homeostático e preferência via estímulo olfativo (Fushiki, 2014).

O consumo de uma dieta com alto teor de gordura e calórico está diretamente ligado ao ganho de peso excessivo (Beilharz, Maniam e Morris, 2015; Kim *et al.*, 2015; Nishiokada *et al.*, 2015; Saravanan e Pari, 2015; Wang *et al.*, 2015). Fato que pôde ser observado nos animais dos grupos HFC e HFS uma vez que seu consumo calórico e de gordura foi maior do que o dos animais dos grupos SDC e SDS.

Apesar de um maior consumo alimentar dos animais com dieta HF, aqueles que foram sensibilizados consumiram menor quantidade de OVA durante o desafio oral, assim como os animais do grupo SDS. Esse menor consumo de OVA pelos animais sensibilizados, indica que ocorreu um processo de aversão ao antígeno e que esse fenômeno acontece independente da dieta ofertada. Diversos autores já demonstraram

que uma das características da alergia alimentar é a aversão ao antígeno (Cara, Conde e Vaz, 1994; Cara, Conde e Vaz, 1997; Saldanha *et al.*, 2004; Dourado *et al.*, 2010). Essa aversão é imunologicamente específica e está diretamente relacionada com a produção de IgE (Cara, Conde e Vaz, 1997; Dourado *et al.*, 2010). Cara *et al* demonstraram em seu estudo que mediadores liberados por mastócitos em animais sensibilizados levam a um comportamento aversivo e além disso a aversão parece envolver também múltiplos fatores que não são mediados por anticorpos específicos (Cara, Conde e Vaz, 1997).

Embora os animais sensibilizados tenham ingerido menor quantidade de OVA eles apresentaram sintomas clássicos da alergia como perda de peso corporal durante o desafio oral, o que não ocorreu com os animais controle. Dourado *et al* mostraram que animais sensibilizados e expostos ao desafio oral com OVA apresentam um perda de peso corporal de aproximadamente 16% após o desafio oral, o que foi atribuído a uma redução no consumo alimentar que pode ser devido a vários fatores tais como, aumento no metabolismo e ocorrência de inflamação intestinal levando à diarreia (Dourado *et al.*, 2011). Assim como no estudo de Saldanha *et al*, a OVA não foi incluída na dieta e sim na água, indicando que a perda de peso desses animais parece não estar associada à redução do consumo alimentar, uma vez que não houve redução no consumo de ração porém ainda assim houve perda de peso. Saldanha *et al* observaram uma perda de peso de aproximadamente 20% e sugeriram que essa perda de peso na alergia pode ser influenciada pela diminuição da absorção de alguns componentes da dieta e que a desidratação não interfere nessa perda (Saldanha *et al.*, 2004). Em nosso estudo os animais sensibilizados que receberam dieta padrão tiveram uma perda de peso de aproximadamente 15%, sendo semelhante à encontrada pelos autores acima citados. Já os animais sensibilizados que receberam dieta HF tiveram uma perda de peso muito mais acentuada sendo de aproximadamente 30%. Dourado *et al*, mostraram que a redução de peso corporal

está associada a perda de massa de tecido que pode ocorrer devido a um aumento na lipólise (Dourado *et al.*, 2011). Nesse estudo podemos afirmar que aconteceu o mesmo fato, uma vez que o grupo HFS apresentou menor índice de adiposidade quando comparado ao seu controle não sensibilizado e os grupos SDS e HFS apresentaram menor área de adipócitos quando comparados aos seus respectivos controles. Sabendo que os lipídios da dieta são armazenados no tecido adiposo e que este é o principal reservatório de energia em mamíferos (Bolsoni-Lopes e Alonso-Vale, 2015) é possível afirmar que o consumo excessivo de gorduras e calorias leva a um aumento do tecido adiposo, que pôde ser observado nos animais do grupo HFC que apresentaram maior índice de adiposidade e área de adipócitos que pode ser observada nas lâminas histológicas. Sendo assim, é possível que a perda de peso mais acentuada no grupo HFS tenha ocorrido em decorrência de uma maior lipólise, assim como mostrado por Howe *et al.*, que em estudo como humanos, aqueles alimentados com dieta rica em gordura apresentaram maior taxa de lipólise do que os que receberam uma dieta balanceada (Howe *et al.*, 2011) e em estudo anterior onde Suljkovicova *et al.* sugerem que a dieta HF em curto prazo e associada a prática de exercício leva a uma maior taxa de lipólise (Suljkovicova *et al.*, 2002).

Para avaliar a inflamação do tecido adiposo, foi realizada microscopia intravital, que mostrou que animais alérgicos independentemente da dieta ingerida apresentam maior adesão de leucócitos no tecido adiposo epididimal. Tal fato foi mostrado anteriormente por Dourado *et al.* e Batista *et al.* em estudos anteriores e pode indicar que a alergia gera uma inflamação no tecido adiposo. Os animais do SDS ainda apresentaram maior rolamento de leucócitos neste tecido o que reforça a ideia de uma maior inflamação gerada pela alergia. Já os animais do grupo HFS apresentaram uma redução nesse rolamento, o que pode indicar que a alergia associada ao consumo de dieta HF pode minimizar a inflamação do tecido adiposo epididimal. A não significância estatística notada na comparação entre os grupos HFS e HFC pode ser explicada pelo

número reduzido de animais utilizados no grupo HFS, uma vez que alguns deles morreram no procedimento cirúrgico e não puderam ser utilizados para análise. Porém tal diferença deve ser considerada tendo em vista que com um aumento do  $n$  a significância estatística é encontrada.

Através de tal resultado é possível afirmar que mesmo com o consumo de dieta padrão a alergia é capaz de gerar uma inflamação do tecido adiposo e que em conjunto com a dieta HF essa inflamação parece estar reduzida. É possível também que, diante desses dois quadros inflamatórios atividades reguladoras possam prevalecer e reduzir o número de células inflamatórias no tecido adiposo.

Sistemicamente os animais sensibilizados não apresentaram redução nos níveis de glicose sérica, diferentemente do que foi mostrado por Batista *et al* e Dourado *et al*. Já os animais do grupo HFC tiveram maiores níveis de glicose circulante que pode ser em decorrência do consumo da dieta hiperlipídica assim como sugerido por Petrov *et al* e Saravanan *et al* em seus estudos. Além disso, animais dos grupos SDS e HFS não apresentaram diferença nos níveis de glicose, tal resultado sugere que em animais sensibilizados a dieta não é capaz de interferir nos níveis séricos de glicose. Quanto ao colesterol sérico os animais sensibilizados que receberam dieta padrão não apresentaram redução do mesmo, sendo contrário ao dado apresentado anteriormente por Dourado *et al*. Em contrapartida, os animais com dieta HF independentemente da sensibilização apresentaram níveis de colesterol mais elevados do que os animais com dieta padrão, concordando com o sugerido por Ning *et al* que sugerem que uma dieta hiperlipídica é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de colesterol. Sendo assim, é possível afirmar que a dieta HF aumenta os níveis de colesterol independente da sensibilização. Em trabalhos anteriores, animais apenas sensibilizados sem diferença entre as dietas apresentaram triglicérideo sérico menor do que o do seu controle (Dourado *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2014), porém no presente estudo, os animais não apresentaram tal comportamento. Os animais do grupo HFS tiveram

menores níveis de triglicérides quando comparados ao grupo SDS e não apresentaram diferença em relação ao seu controle não sensibilizado (HFC) e, além disso, o grupo HFC não mostrou diferença em relação ao grupo SDC, o que indica que a dieta sozinha não foi capaz de influenciar nos níveis de triglicérides e que apenas quando associada à alergia alimentar causa redução nesses níveis, indo contra a literatura que sugere que a dieta hiperlipídica é capaz de aumentar os níveis de triglicérides séricos (Ning *et al.*, 2015; Petrov *et al.*, 2015).

Ainda no contexto sistêmico, foram dosadas algumas adipocinas. A leptina é hormônio secretado pelos adipócitos e possui semelhanças estruturais com citocinas pró-inflamatórias, ela desempenha papel fundamental na função neuroendócrina e no processo metabólico. E, além disso, está diretamente associada à massa corporal, sendo encontrada em maiores níveis em indivíduos obesos. A leptina inibe o apetite, aumenta o dispêndio de energia, induz citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-9, promove a agregação plaquetária e parece ter um papel na trombose arterial associada à obesidade (Lieb *et al.*, 2009; Saber *et al.*, 2015) No presente estudo foi possível notar que os animais do grupo HFC apresentaram maiores níveis de leptina sérica, o que era esperado uma vez que eles possuem maior massa corporal e de tecido adiposo. Já os animais do grupo HFS tiveram uma redução nos níveis de leptina em relação ao seu controle não sensibilizado, esse fato pode indicar que a alergia alimentar é capaz de reduzir os níveis de leptina, uma vez que a massa corporal e de tecido adiposo, e consequentemente de adipócitos, é diminuída nos animais alérgicos, assim como demonstrado por Batista *et al* em seu estudo. Tal fato não pôde ser observado nos animais que receberam dieta padrão, discordando da literatura encontrada.

A adiponectina é a proteína mais abundante secretada e expressa no tecido adiposo, ela desempenha um papel fundamental na regulação da sensibilidade a insulina, no metabolismo de glicose, ácidos graxos e na resposta imune. Baixos níveis de

adiponectina circulante são associados a obesidade, resistência a insulina e diabetes mellitus tipo 2 (Lai *et al.*, 2015; Mendoza-Azpur *et al.*, 2015). No presente estudo os animais com dieta HF e não sensibilizados apresentaram os maiores níveis de adiponectina séria, sendo contrário a literatura encontrada. Os animais sensibilizados também mostraram resultados diferentes dos apresentados por Batista *et al.*, uma vez que a sensibilização não interferiu nos níveis de adiponectina quando comparando os animais sensibilizados aos seus respectivos controles.

Outra importante adipocina é a resistina, ela também é um hormônio secretado pelo tecido adiposo e seu papel parece estar ligado com a resistência a insulina na adiposidade excessiva. Seus níveis séricos parecem ser proporcionais ao grau de adiposidade (Bełtowski, 2003; Courten *et al.*, 2004). Em estudo sobre alergia alimentar experimental, Batista *et al.* mostraram que animais alérgicos apresentam menores níveis de resistina circulante do que seu controle. Apesar do descrito na literatura o presente estudo mostrou que a dieta e a alergia, independentes ou associadas, não interferiram nos níveis séricos de resistina.

A discordância dos resultados de glicose, colesterol, triglicerídeos, leptina, adiponectina e resistina com os dados apresentados anteriormente na literatura, podem ser explicadas pela diferença de tempo de jejum utilizado no presente trabalho (4 horas) quando comparado a de outros autores com Dourado *et al.* e Batista *et al.* Tal diferença pode sugerir que o tempo de jejum interfere fortemente nos parâmetros acima citados dentro das condições estudadas, sendo necessários novos estudos para estabelecer os mecanismos que levam a tal modificação.

Como última análise no contexto sistêmico foi realizada a contagem total e diferencial de células sanguíneas. Diferentemente do apresentado por Batista *et al.*, não houve diferença na contagem total e diferencial de células. Tal resultado pode indicar que a

dieta HF associada a alergia não é capaz de modificar o padrão de células sanguíneas, sugerindo a inexistência de uma inflamação sistêmica.

Saindo do contexto sistêmico partimos para análise de modificações intestinais induzidas pela dieta HF e pela alergia alimentar. Através da análise das lâminas histológicas foi possível perceber que a alergia causa uma alteração na morfologia intestinal, porém o mesmo não ocorre quando os animais alérgicos recebem dieta HF. Apesar da observação feita nas lâminas histológicas, ao analisar a relação vilosidade/cripta não foi encontrada diferença entre os grupos, o que indica que mesmo causando alterações morfológicas no intestino a alergia não é capaz de modificar o tamanho das vilosidades independente de estar ou não associada a dieta HF. Ainda no intestino foi dosada a quantidade de IgA secretória, a IgA é secretada através do receptor de imunoglobulina polimérica (pIgR) na mucosa intestinal, e desempenha uma função fundamental no sistema imune ao evitar a infecção em fase inicial eliminando as bactérias e vírus do trato gastrointestinal (Shibuya *et al.*, 2015). Em estudo com animais recebendo dieta rica em carboidrato mostrou-se que não houve diferença nos níveis de IgA (Shibuya *et al.*, 2015). Paula-Silva *et al* mostraram em seu estudo que animais alérgicos que consomem dieta livre de proteínas apresentam menores índices de IgA (Paula-Silva *et al.*, 2015). Em nosso estudo observamos que animais não sensibilizados recebendo dieta HF exibiram menores valores de IgA, indicando que a dieta HF é capaz de modificar parâmetros intestinais, sugerindo que o consumo de dieta hiperlipídica pode aumentar a susceptibilidade desses indivíduos a contrair infecções. Outra alteração encontrada no intestino foi a presença de enterócitos gordurosos nos animais que consumiram dieta HF, sendo que aqueles que foram sensibilizados apresentaram maior quantidade dessas células. Tal fato pode ser explicado pela alta ingestão de gordura, uma vez que a absorção de gordura alimentar no intestino delgado é um processo de múltiplos passos que regula a absorção e a distribuição de nutrientes essenciais e energia. Um dos passos deste

processo é o armazenamento temporário de gordura alimentar em gotículas lipídicas citoplasmáticas (CLD), porém os detalhes dos mecanismos envolvidos nesse processo ainda são desconhecidos (Robertson *et al.*, 2003; D'aquila *et al.*, 2015).

Além da gordura observada no intestino, foi possível notar o acúmulo de gordura no fígado dos animais que receberam dieta HF. A dieta hiperlipídica já é descrita por diversos autores como indutora de fígado gorduroso ou esteatose hepática (Waller-Evans *et al.*, 2013; Fakhoury-Sayegh *et al.*, 2015; Geng *et al.*, 2015). Foi também encontrada no fígado de animais alérgicos uma degeneração hidrópica, sendo esta uma liquefação do citoplasma das células, que neste caso foi causada pela alergia alimentar (Toreson, 1951). Com esses resultados é possível afirmar que animais recebendo dieta HF e sensibilizados sofrem maior injúria hepática, podendo apresentar alterações em sua função.

Quando camundongos são sensibilizados com OVA e após alguns dias são expostos ao antígeno por via oral ocorre um aumento dos níveis séricos de IgE. As reações alérgicas dependentes de IgE afetam um ou mais órgãos como pele, trato respiratório e gastrointestinal. Pode ocorrer também uma reação sistêmica conhecida como anafilaxia (Saldanha *et al.*, 2004). Em nosso estudo os animais sensibilizados e submetidos ao desafio oral tiveram os níveis séricos de IgE aumentados, indicando que eles realmente se tornarão alérgicos, assim como já foi demonstrado por diversos autores (Saldanha *et al.*, 2004; Dourado *et al.*, 2011; Batista *et al.*, 2014).

Ao analisarmos os resultados em conjunto foi possível perceber que os animais sensibilizados que receberam dieta HF apresentaram sintomas mais exacerbados do que os animais alérgicos com dieta padrão. Dessa forma esperávamos que a associação da dieta HF com a alergia leva-se a maiores níveis de IgE sérica, porém ocorreu o inverso. Uma possível explicação para tal fato pode ser de que como os animais com dieta HF possuíam maior quantidade de tecido adiposo no momento da

sensibilização a IgE tenha se ligado aos mastócitos do tecido adiposo e permaneceu no mesmo após o desafio oral, não sendo possível detectar maiores níveis séricos de IgE. Desta forma, tornam-se necessários estudos futuros para elucidar tais mecanismos.

## **6. CONCLUSÃO**

Através dos resultados encontrados é possível afirmar que o consumo de dieta hiperlipídica associado à alergia alimentar faz com que os animais apresentem menores níveis de IgE sérica, mas suficiente para causar reações mais severas como perda de peso mais drástica após o desafio antigênico, maior número de alterações hepáticas e um acúmulo acentuado de gordura nos enterócitos. Dessa forma podemos sugerir que o consumo de uma dieta hiperlipídica é capaz de acentuar a severidade dos sinais da alergia alimentar experimental.

Além disso, destacamos que para melhor avaliação de tal associação, são necessários estudos futuros que demonstrem o efeito desse fenômeno sistemicamente.

## 7. REFERÊNCIAS

A., M. et al. **Position document: IgE-mediated allergy to egg protein.** Allergol Immunopathol. Spain. 41: 320-336 p. 2013.

ALDEMIR, H.; BARS, R.; HEROUET-GUICHENEY, C. **Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods.** Regul Toxicol Pharmacol. 54: S52-7 p. 2009.

BAILÓN, E. et al. **A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice.** J Immunol Methods. 381: 41-49 p. 2012.

BATISTA, N. V. et al. **Prolonged ingestion of ovalbumin diet by sensitized mice improves the metabolic consequences induced by experimental food allergy** Clinical and Experimental Immunology. Brasil. 178: 416–427 p. 2014.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. **Diet-Induced Cognitive Deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions.** Nutrients. Australia. 7: 6719-6738 p. 2015.

BEŁTOWSKI, J. **Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue** Med Sci Monit. Lublin, Poland. 9 2003.

BOCK, S.; MUÑOZ-FURLONG, A.; SAMPSON, H. **Fatalities due to anaphylactic reactions to foods.** J Allergy Clin Immunol. 107: 191-3. p. 2001.

BOLSONI-LOPES, A.; ALONSO-VALE, M. I. C. **Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update** Arch Endocrinol Metab. Diadema, SP, Brazil. 59: 335-42 p. 2015.

BRANDTZAEG, P. **Food allergy: separating the science from the mythology.** Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. Oslo, Norway. 7: 380–400 p. 2010.

BRANUM, A. M.; LUKACS, S. L. **Food Allergy Among Children in the United States.** Pediatrics. 124: 1-7 p. 2009.

CARA, D. C.; CONDE, A. A.; VAZ, N. M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, n. 6, p. 1331-1334, 1994.

\_\_\_\_\_. **Immunological Induction of Flavour Aversion in Mice. II. Passive/Adoptive Transfer and Pharmacological Inhibition.** Scand. J. Immunol. Brasil. 45: 16–20 p. 1997.

CIANFERONI, A.; SPERGEL, J. M. **Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis.** Allergology International. Philadelphia, USA. 58: 457-466 p. 2009.

CORBIN, C. H. et al. **Sensory evaluation of tender beef strip loin steaks of varying marbling levels and quality treatments** Meat Science. USA. 100: 24–31 p. 2015.

COURTEN, B. V. D. et al. **High Serum Resistin Is Associated With an Increase in Adiposity But Not a Worsening of Insulin Resistance in Pima Indians** DIABETES. 53: 1279–1284 p. 2004.

DIXON, A. E. et al. **Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control and inflammation.** J Allergy Clin Immunol. Vermont. 128: 508–515 p. 2011.

DOUCETTE, C. R. et al. **A High Fat Diet Increases Bone Marrow Adipose Tissue (MAT) But Does Not Alter Trabecular or Cortical Bone Mass in C57BL/6J Mice.** J. Cell. Physiol. 230: 2032–2037 p. 2015.

DOURADO, L. P. A. et al. **Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice.** Cellular Immunology. Belo Horizonte, Brazil. 270: 198–206 p. 2011.

\_\_\_\_\_. **Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice.** Cellular Immunology. Brasil. 262: 62–68 p. 2010.

D'AQUILA, T. et al. **Characterization of the Proteome of Cytoplasmic Lipid Droplets in Mouse Enterocytes after a Dietary Fat Challenge.** PLOS ONE. 10 2015.

EIGENMANN, P. **Mechanisms of food allergy.** Pediatr Allergy Immunol. Geneva, Switzerland. 20: 5–11 p. 2009.

FAKHOURY-SAYEGH, N. et al. **Characteristics of nonalcoholic fatty liver disease induced in wistar rats following four different diets** Nutrition Research and Practice. 9: 350-357 p. 2015.

FUJIWARA, M. et al. **Changes in fatty acid composition in tissue and serum of obese cats fed a high fat diet.** BMC Veterinary Research. Japan. 11 2015.

FUSHIKI, T. **Why fat is so preferable: from oral fat detection to inducing reward in the brain** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Japan. 78: 363–369 p. 2014.

GAMBERO, A. et al. **Mesenteric Adipose Tissue Alterations Resulting from Experimental Reactivated Colitis.** Inflamm Bowel Dis. Bragança Paulista, SP, Brazil. 13: 1357–1364 p. 2007.

GENG, T. et al. **Prosteatotic genes are associated with unsaturated fat suppression of saturated fat-induced hepatic steatosis in C57BL/6 mice** Nutrition Research 2015.

GONIPETA, B. et al. **Long-term characteristics of hazelnut allergy in an adjuvant-free mouse model.** Int Arch Allergy Immunol. 152: 229-225 p. 2010.

HANCOX, R. J. et al. **Sex Differences in the Relation between Body Mass Index and Asthma and Atopy in a Birth Cohort.** Am J Respir Crit Care Med. 171: 440–445 p. 2004.

HELM, R. M.; BURKS, A. W. **Mechanisms of food allergy.** Current Opinion in Immunology. 12: 647–653 p. 2000.

HERSOUG, L.-G.; LINNEBERG, A. **The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance?** Allergy. Denmark. 62: 1205–1213 p. 2007.

HERZ, U. **Immunological Basis and Management of Food Allergy.** Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 47: 54-57 p. 2008.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. **Treatment strategies for allergy and asthma.** Nature Reviews Immunology. 8: 218-230 p. 2008.

HOWE, H. R. et al. **Increased adipose tissue lipolysis after a 2-week high-fat diet in sedentary overweight/obese men** METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL. USA. 60: 976–981 p. 2011.

KERR, B. J.; KELLNER, T. A.; SHURSON, G. C. **Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets** Journal of Animal Science and Biotechnology. USA. 6 2015.

KIM, J. et al. **Integrative systems analysis of diet-induced obesity identified a critical transition in the transcriptomes of the murine liver and epididymal white adipose tissue.** International Journal of Obesity 2015.

LAI, H. et al. **Association between the level of circulating adiponectin and prediabetes: A meta-analysis.** J Diabetes Invest. 6: 416–429 p. 2015.

LEUNG, J.; BEUKEMA, K. R.; SHEN, A. H. **Allergic mechanisms of Eosinophilic oesophagitis** Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 29: 709-720 p. 2015.

LI, X. et al. **A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity.** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 103: 206-214 p. 1999.

\_\_\_\_\_. **A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses.** J Allergy Clin Immunol. 106: 150-158 p. 2000.

LIEB, W. et al. **Plasma Leptin Levels and Incidence of Heart Failure, Cardiovascular Disease, and Total Mortality in Elderly Individuals.** Diabetes Care. 32: 612–616 p. 2009.

MARTORELL, A. et al. **Position document: IgE-mediated allergy to egg protein.** Allergol Immunopathol. Spain. 41: 320-336 p. 2013.

MARTORELL, A. A., E.BONÉC, J.ECHEVERRÍAD\*, L.LÓPEZE, M.C.MARTÍN, F.NEVOTG, S.PLAZAH, A.M. **Position document: IgE-mediated allergy to egg protein.** Allergol Immunopathol. Spain. 41: 320-336 p. 2013.

MCCLAIN, S.; BANNON, G. **Animal models of food allergy: Opportunities and barriers.** Curr Allergy Asthma Rep. 6: 141-144. p. 2006.

MEEUSEN, E. N. et al. **Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases.** Drug Discovery Today: Disease Models. 6: 101–106 p. 2009.

MENDOZA-AZPUR, G. et al. **Adiponectin, leptin and TNF- $\alpha$  serum levels in obese and normal weight Peruvian adults with and without chronic periodontitis.** J Clin Exp Dent. 3: 380-6 p. 2015.

MORAFO et al. **Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice.** Journal of Allergy and Clinical Immunology. 111: 1122-1228 p. 2003.

MORRIS, D. L. et al. **CD40 promotes MHC class II expression on adipose tissue macrophages and regulates adipose tissue CD4+ T cells with obesity.** Journal of Leukocyte Biology. 99 2015.

NING, B. et al. **High-fructose and high-fat diet-induced insulin resistance enhances atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.** Nutrition & Metabolism. 12 2015.

NISHIOKADA, A. et al. **Changes of hepatic lipid mediators associated with intake of high-fat diet for 12 weeks in endotoxemic rats using LC-ESI-MS/MS.** Clinical Nutrition. Japan. 34: 685-693 p. 2015.

PAULA-SILVA, J. et al. **Effect of a protein-free diet in the development of food allergy and oral tolerance in BALB/c mice** British Journal of Nutrition. Minas Gerais, Brazil: 1 of 9 p. 2015.

PETROV, D. et al. **High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents.** Biochimica et Biophysica Acta. 1852: 1687–1699 p. 2015.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print).

ROBERTSON, M. D. et al. **Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans** *Gut*. 52: 834–839 p. 2003.

SABER, H. et al. **Serum Leptin Levels and the Risk of Stroke.** *Stroke*. 46 2015.

SALDANHA, J. C. S. et al. **A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice.** *Braz J Med Biol Res*. Belo Horizonte, MG, Brasil. 37: 809-816 p. 2004.

SALUJA, R. et al. **The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation** *Clin Transl Allergy*. 5 2015.

SARAVANAN, S.; PARI, L. **Role of thymol on hyperglycemia and hyperlipidemia in high fat diet-induced type2 diabetic C57BL/6Jmice.** *European Journal of Pharmacology*. India. 761: 279–287 p. 2015.

SHIBUYA, T. et al. **The effects of moderate exercise on secretory IgA production in mice depends on dietary carbohydrate intake** *J. Clin. Biochem. Nutr.* Japan. 57: 44–49 p. 2015.

SICHERER, S. H. **Epidemiology of food allergy.** *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*. New York, NY. 127: 594-602 p. 2011.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. **Food allergy.** *J Allergy Clin Immunol*. New York, NY. 125: 116-25 p. 2010.

\_\_\_\_\_. **Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment.** *J Allergy Clin Immunol*. New York, NY. 133: 291-307 p. 2014.

SULJKOVICOVA, H. et al. **Effect of Macronutrient Composition of the Diet on the Regulation of Lipolysis in Adipose Tissue at Rest and During Exercise: Microdialysis Study** *Metabolism*. 51: 1291-1297 p. 2002.

THANG, C. et al. **Effects of Lactobacillus rhamnosus GG supplementation on cow's milk allergy in a mouse model.** *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 7 2011.

TORSON, W. E. **Glycogen Infiltration (So-Called Hydropic Degeneration) in the Pancreas in Human and Experimental Diabetes Mellitus.** *Am J Patho*. 27: 327–347 p. 1951.

TURNBULL, J. L.; ADAMS, H. N.; GORARD, D. A. **Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances.** Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 41: 3–25 p. 2015.

UNTERSMAJR, E.; JENSEN-JAROLIM, E. **Mechanisms of type I food allergy.** Pharmacology & Therapeutics. Vienna, Austria. 112: 787–798 p. 2006.

VIEIRA, V. J. et al. **Elevated atopy in healthy obese women.** Am J Clin Nutr. 82: 504–9 p. 2005.

VISNESS, C. M. et al. **Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006.** J Allergy Clin Immunol. 123: 1163-9 p. 2009.

WALLER-EVANS, H. et al. **Nutrigenomics of High Fat Diet Induced Obesity in Mice Suggests Relationships between Susceptibility to Fatty Liver Disease and the Proteasome** PLOS ONE. 8 2013.

WANG, J.; SAMPSON, H. A. **Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment.** Allergy Asthma Immunol Res. New York, NY, USA. 1: 19-29 p. 2009.

WANG, Z. et al. **Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice.** METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL. 64: 917–925 p. 2015.