



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



CÉSAR HENRIQUE PEREIRA

ESTABELECIMENTO DE MODELO MURINO PARA ESTUDO DE ALERGIA
ALIMENTAR

OURO PRETO-MG

2022

CÉSAR HENRIQUE PEREIRA

ESTABELECIMENTO DE MODELO MURINO PARA ESTUDO DE ALERGIA
ALIMENTAR

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina FAR018 – Elaboração de Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito básico para a conclusão do curso de graduação em Farmácia – Bacharelado.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Samantha Ribeiro

OURO PRETO-MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P436e Pereira, Cesar Henrique.
Estabelecimento de modelo murino para estudo de alergia alimentar.
[manuscrito] / Cesar Henrique Pereira. - 2022.
33 f.: il.: color., gráf., tab.. + Fotomicrografia.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima Lima.
Coorientadora: Profa. Dra. Samantha Ribeiro Ribeiro.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola
de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Hipersensibilidade Alimentar. 2. Dessensibilização Imunológica. 3.
Imunoglobulina E. I. Lima, Wanderson Geraldo de Lima. II. Ribeiro,
Samantha Ribeiro. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 612.393

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

César Henrique Pereira

Estabelecimento de modelo murino para estudo de alergia alimentar

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Graduação em Farmácia

Aprovada em 23 de junho de 2022

Membros da banca

Dr. Wanderson Geraldo de Lima - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr. Albená Nunes da Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Ma. Fátima Souza Marques (Universidade Federal de Ouro Preto)

Wanderson Geraldo de Lima, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 15/07/2022



Documento assinado eletronicamente por **Wanderson Geraldo de Lima, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/07/2022, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0355524** e o código CRC **A0F680E0**.

RESUMO

As alergias são hipersensibilidades imunológicas em resposta a um ou mais agentes antigênicos, conhecidos como alérgenos. Muitos alimentos, presentes na dieta básica, já foram reconhecidos como potencialmente alergênicos e, associados ao modelo de vida atual, levam a um quadro de aumento mundial de crianças e adultos com alergias alimentares. Esta pesquisa visou estabelecer um modelo de estudo de alergia alimentar para a busca e a aplicação de novas terapias que visem ao tratamento dessa reação imune. Camundongos BALB/c tiveram a alergia alimentar induzida pelo protocolo de 28 dias com dois desafios de injeção de solução de $Al(OH)_3$ e albumina de ovo (OVA). Após protocolo de indução, os animais foram eutanasiados para obtenção de sangue e tecidos pulmonares e intestinais. Foram avaliadas, como forma de validação do modelo, as análises de sangue, com determinação de perfis celulares sanguíneos. Nesta análise foi observada uma diferença entre o percentual de eosinófilos do grupo Alergia e o grupo Controle. O grupo Alergia apresentou linfocitose e neutropenia, o que sugere uma resposta inflamatória devido à instalação de um processo alérgico, mesmo que ambos os grupos não tenham apresentado diferenças da massa corpórea e do consumo médio de ração e água. O presente estudo demonstrou a relevância da análise pulmonar a cerca de uma distribuição sistêmica do alérgeno, evidenciado na mudança significativa da área luminal alveolar, bem como um possível processo inflamatório relacionado diretamente com a exposição do alérgeno de maneira ininterrupta durante o protocolo, bem como resultados não significativos de muco e mastócitos pulmonares. A análise histológica do pulmão em animais alérgicos demonstrou-se promissora na pesquisa frente a uma carência na literatura em relação a essa exposição ao antígeno por via oral. Tornando-se pertinente a avaliação em conjunto da produção de imunoglobulinas e citocinas ligadas a processos alérgicos no intestino delgado, devido a sua exposição tecidual direta com o alérgeno, bem como a avaliação futura das lesões histológicas, presença de mastócitos e produção de muco, no órgão-alvo das AA. O desenvolvimento do modelo abre perspectivas para estudos futuros de terapias medicamentosas e naturais contra os sinais e sintomas associados a alergias alimentares.

Palavras-chave: Alergia Alimentar; Modelo Murino OVA; IgE.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1 Animais	8
4.2 Cálculo amostral pela definição dos grupos experimentais	8
4.3 Estabelecimento do modelo de alergia	9
4.4 Acompanhamento de massa corpórea e do consumo de ração e de água	10
4.5 Avaliação dos leucócitos, células sanguíneas	10
4.6 Avaliações histológicas	10
4.6.1 Coloração em Hematoxilina e Eosina – HE	11
4.6.2 Coloração com Azul de Toluidina – ATO	12
4.6.3 Coloração com Ácido Periódico de Schiff – PAS	12
4.7 Avaliações séricas	13
4.8 Análises estatísticas	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	14
7. CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

As alergias são hipersensibilidades imunológicas em resposta a um agente antigênico, conhecido como alérgeno. Desafios alergênicos podem ocorrer naturalmente ou de forma induzida, e as vias aéreas (respiração) e digestórias (ingestão de alimentos) são as principais “portas de entrada” de alérgenos nos organismos (YU *et al.*, 2016). As alergias induzidas pela ingestão de alimentos (alergias alimentares – AA) são frequentes em todas as etapas da vida nas populações humanas, consequências da desregulação imunológica da revogação da tolerância oral normal (LOPES; SICHERER, 2020). Muitos alimentos, presentes na dieta básica, já foram reconhecidos como potencialmente alergênicos, tais como ovos, leite, soja e amendoim, que são responsáveis pela grande maioria dos casos de AAs infantis, bem como camarão e frutos do mar, mais frequentemente envolvidos nas AAs em adultos (SICHERER *et al.*, 2014; SICHERER; SAMPSON, 2018).

Mesmo que seja um distúrbio comum, o acesso facilitado a um número maior de grupos alimentares, um consumo crescente de alimentos processados, além de uma vida diária que não privilegia o bem-estar físico e fisiológico, as AAs têm se tornado um grande problema mundial de saúde, com prevalência crescente. Apesar da divergência quanto à tendência do aumento das alergias alimentares, trabalhos indicam que cerca de 35% das pessoas já relataram alguma reação adversa a algum alimento, apesar das AAs ocorrerem entre 2 a 10% dos indivíduos no mundo e variam com a idade (IWEALA *et al.*, 2018). Estima-se que a prevalência da AA seja de 6 a 8% em crianças menores de três anos (DEVDAAS *et al.*, 2018), e cerca de 2 a 4% em adultos. Outros estudos sugerem que até 10% de algumas populações são afetadas pelas AAs (LOPES; SICHERER, 2020).

As AAs podem ser mediadas por IgE, não mediadas por IgE ou mistas. As AAs mediadas pela IgE, em comparação com as não mediadas, apresentam diagnóstico mais fácil e fisiopatologia mais bem compreendida (YU *et al.*, 2016; TORDESILLAS *et al.*, 2017). A gravidade dos sinais e sintomas vai depender da quantidade de alérgeno ingerido, da sua biodisponibilidade no organismo, além de uma complexa rede de interações genéticas e epigenéticas influenciadas pelas características do indivíduo e pelo meio ambiente (REIS, 2015; REIS *et al.*, 2015; TORDESILLAS *et al.*, 2017).

Os sinais e sintomas associados às AAs são de amplo espectro, podem afetar diversos órgãos e sistemas, e ocasionar coceira e eritema, inchaço e incômodo nos olhos, na

boca, nos lábios e na garganta, congestão e coriza nasal, falta de ar e dificuldade de respirar, dor abdominal e distúrbios gastrointestinais (SICHERER; SAMPSON, 2014; 2018). Sistemicamente, observamos reações de anafilaxias que variam de discretas a graves, mediadas pela produção de mediadores pró-inflamatórios associados às alergias, como a leucotrienos, prostaglandinas, interleucinas 3 e 4 e histamina (ANVARI *et al.*, 2019). A histamina, liberada pela ligação do alérgeno a anticorpos IgE, que previamente sensibilizaram os mastócitos teciduais e/ou basófilos circulantes (REBER *et al.*, 2013), é um dos mediadores mais estudados em terapias rápidas, que, em geral, leva em conta a ação de medicamentos que bloqueiam esse mediador, os anti-histamínicos. A ação vasodilatadora de mediadores também está associada ao eritema e à dermatite observada nas AAs (HAUSMANN *et al.*, 2010; MARTINS; REIS, 2011) e aos sinais e sintomas observados no trato respiratório, como rinite, aumento da produção de muco, coriza, irritação e dificuldade de respirar. No trato gastrointestinal, são relatadas alterações de motilidade, além de processos inflamatórios, e se destaca a gastroenterite, muito associada às AAs mediadas por IgE (MOTA *et al.*, 2002).

O uso de modelos de estudo para o entendimento das alergias alimentares é ato recorrente nas ciências naturais. Esses modelos empregam métodos que ajudam no entendimento fisiológico e histopatológico das alergias, bem como no entendimento da ação de novas proteínas e na formulação ativas nos processos alérgicos. Trabalhos na literatura podem ser observados na utilização de modelos murinos, suínos, felinos, caninos e cobaios (DOURADO *et al.*, 2010; SANTORO; MARSELLA, 2014). Modelos de estudos em camundongos incluem uma variada gama de espécies, como C57/BL6, DBA/2, C3H/HeJ e BALB/c, que é uma espécie capaz de produzir IgG1 e IgE semelhantes aos associados aos mecanismos anafiláticos humanos (GANESHAN *et al.*, 2009). BALB/C é reportado na literatura como modelo para estudo de imunogenicidade alérgica de proteínas do amendoim, albumina bovina sérica e albumina da clara de ovo. Camundongos ainda conferem mais facilidade na manipulação e sensibilização que ratos, cachorros e cobaios (SANTORO; MARSELLA, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer um modelo animal de alergias alimentares para estudos histopatológicos e de tratamento.

2.2 Objetivos específicos

Comparar variações entre os animais alérgicos e não alérgicos:

- na massa corpórea;
- nas mudanças no perfil de células sanguíneas;
- nas alterações histológicas pulmonares e intestinais;
- no perfil sérico de mediadores ligados às alergias.

3. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA

A pesquisa proposta teve como objetivo estabelecer um modelo de estudo para alergia alimentar, um problema que avança em todo o mundo e cujas terapias existentes não são eficazes em todos os casos. Essa nova linha de pesquisa feita no Laboratório de Morfopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto - LMP - UFOP visou o treinamento e a validação de tal modelo, estudo base para complementar possíveis vertentes de pesquisas de graduação e pós-graduação, bem como estudo de formulações naturais ou reposicionamento de fármacos, que podem possuir ação anti-histamínica e viabilizem minimizar os efeitos, sinais e sintomas dos processos alérgicos alimentares.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para este estudo foram utilizados 12 camundongos da linhagem BALB/c, com seis semanas de vidas, sexo masculino, pesando cerca de 20 g, provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram divididos em dois grupos, a saber:

- Grupo Controle: formado por cinco (05) animais que não sofreram indução alérgica;
- Grupo Alergia: formado por sete (07) animais que sofreram o processo de indução alérgica.

4.2 Cálculo amostral pela definição dos grupos experimentais

Para a realização da estimação amostral do grupo desafiado com alérgico, o parâmetro utilizado foi a medida do índice de doença intestinal observado no artigo “*Protective effect of galfangin against dextran sulfate sodium (DSS) – induced ulcerative colitis in Balb/c mice*”, publicado por Sangaraju *et al.* (2019), com diferença mínima identificada de 50% e maior coeficiente de variação em 20%. A significância adotada foi de 0,05 e o poder de 80%. Dessa forma, usando o cálculo padrão $n = 1 + [2C*(s/d)^2]$, temos: $n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2/0,5)^2]$, $n = 1 + [21,02 \times (0,4)^2]$, $n = 1 + [21,02 \times 0,16]$, $n = 1 + 3,36$, $n = 5$ animais por grupo (ao final do experimento). Considerando que o número final será de cinco animais, aplicando-se a mortalidade de 30% inerente ao modelo, foram necessários sete animais no grupo Alergia.

O grupo Controle foi composto pelo número mínimo de cinco (05) animais, necessários para realização de análises de variações no pacote estatístico que será usado (PRISM 8.0).

4.3 Estabelecimento do modelo de alergia

Para a indução da alergia alimentar foi adotado o protocolo publicado por Saldanha *et al.* (2004). O desenho experimental está demonstrado na Figura 01. Os camundongos receberam uma injeção com 10 μ g de ovalbumina - OVA, adsorvida em 1mg de hidróxido de alumínio - Al(OH)₃ e 0,2 mL de salina 0,9% por via subcutânea no dorso, no início do experimento (dia 1). Quatorze dias depois (dia 15), os animais receberam um reforço da sensibilização, apenas com 10 μ g do antígeno diluído em salina 0,9%. O grupo Controle recebeu o adjuvante diluído em salina no dia 01 e apenas salina no dia 15. Para o desafio antigênico, a partir do dia 21, os camundongos de ambos 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 por sete dias.

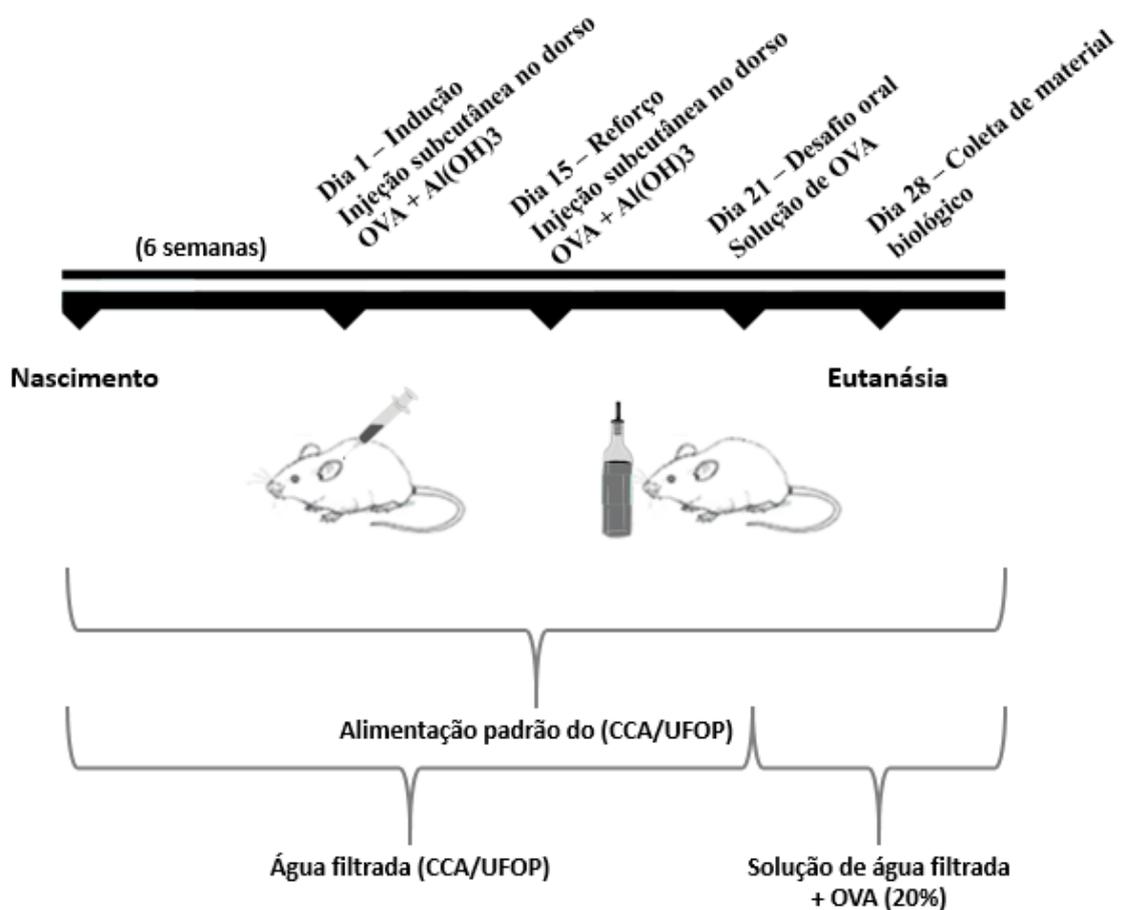


Figura 01: Modelo experimental para a indução da alergia Camundongos BALB/C. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

4.4 Acompanhamento de massa corpórea e do consumo de ração e de água

Para os animais, foi oferecida dieta padrão do Centro de Ciência Animal da UFOP, bem como água, sem restrições. A ingestão alimentar, consumo de água e de OVA foram mensurados com auxílio de balança digital e proveta, respectivamente. Os animais tiveram a massa corpórea aferida no 01º, 07º, 14º, 21º e 28º dia. O registro da massa corpórea dos camundongos no primeiro dia viabilizou o estabelecimento de um padrão referencial prático para as revisões futuras mediante dados comparativos entre os grupos, visto que ambos foram obtidos com a mesma pesagem.

4.5 Avaliação dos leucócitos, células sanguíneas

Nos dias 07, 14, 21 e 28, os animais sofreram punção da calda para retirada de uma gota de sangue. Essa gota de sangue foi usada para confecção de esfregaço sanguíneo em lâmina de vidro. Após secagem, as lâminas foram imediatamente fixadas e coradas pela técnica do Panótico Rápido. Foram contados, em microscopia óptica, os 100 primeiros leucócitos, na objetiva de 100x, visualizados em técnica de “zig zag”, determinando-se, assim, o percentual de cada um deles como publicado por Fernandes *et al.* (2018).

4.6 Avaliações histológicas

Ao final do protocolo de estabelecimento do modelo alergênico, os animais foram eutanasiados com solução injetável, via intraperitoneal, composta por 90 mg/kg de Cetamina a 10% (100mg/mL) e 10mg/Kg de Xilasina a 2% (20mg/mL), Favoretto *et al.* (2013).

Em necropsia, foram coletados os pulmões e toda extensão do intestino delgado. Posteriormente, retirou-se os pulmões sendo esses fixados em formalina tamponada. Da mesma forma, o intestino foi dividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo, sendo essas porções fixadas em solução de formalina tamponada em forma de rolos para análises futuras.

Após fixação, os tecidos foram processados, conforme descrito por Saldanha *et al.* (2004), para análises histopatológicas de rotina e emblocados em parafina.

Para os tecidos pulmonares, procedeu-se à confecção de lâminas histológicas de aproximadamente cinco micrômetros. Após essa etapa, essas foram desparafinadas e hidratadas, seguindo o protocolo descrito no Manual de Procedimentos do LMP - UFOP, procedendo as colorações necessárias para as análises.

4.6.1 Coloração em Hematoxilina e Eosina – HE

Em relação a coloração em HE dos tecidos pulmonares, utilizou-se também o protocolo descrito no Manual de Procedimentos do LMP da UFOP. Após a coloração, essas lâminas foram fotografadas no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB - UFOP por meio do uso do Sistema de captura digital Leica™ (Wetzlar, Alemanha). Na fotodocumentação utilizou-se a objetiva de 40x selecionando aleatoriamente 20 campos compreendendo a área alveolar e sacos alveolares, porções distais dos bronquíolos respiratórios, Ferreira, Paiva *et al.* (2018).

Para a quantificação da celularidade do tecido em cada imagem, obteve-se a área total dos núcleos presentes por meio do programa FIJI™ (NIH-USA), Santos *et al.* 2018. Consecutivamente a isso, fez-se uma média da área de 03 núcleos, do tecido analisado, chegando ao valor médio de 8,0 micrômetros. Esse valor foi dividido pela área total dos núcleos, já coletados, para se obter o valor total de células de cada fotografia. A prática desta metodologia possibilitou a validação de análise dos tecidos inflamados em relação àqueles que não apresentaram inflamação. Posteriormente, os dados obtidos foram somados e tabelados, extraindo-se as médias dos mesmos para a confecção dos gráficos das áreas mensuradas e obtenção das análises não paramétricas, através do programa PRISM 8.0.

Para a avaliação das estruturas teciduais propostas nesse estudo, utilizou-se uma imagem de um sólido geométrico. Pela técnica estereométrica escolheu-se a estrutura do prisma pentagonal, possibilitando um alcance efetivo de áreas da fotodocumentação. Por meio dessa escolha, estabeleceu-se no programa FIJI™ (NIH-USA) uma grade para selecionar e padronizar a distância dos pontos de ligação de tal prisma, como mostra, a seguir, a Figura 02. A padronização de pontos foi aplicada em todas as imagens, a fim de minimizar um possível viés do analisador nas escolhas das estruturas alveolares, o que valida o método.

Uma vez plotado os pontos na imagem e quando esses se localizavam na luz do alvéolo, o alvéolo pontuado era selecionado para a medição de sua área e espessura, seguindo o pré-requisito de não ter sua estrutura cortada no momento da fotodocumentação, para delimitação de sua área total e as devidas mensurações. Posteriormente, os dados obtidos foram somados e tabelados, extraindo-se as médias e confeccionando-se os gráficos das áreas aferidas e obtenção das análises não paramétricas, através do programa PRISM 8.0.

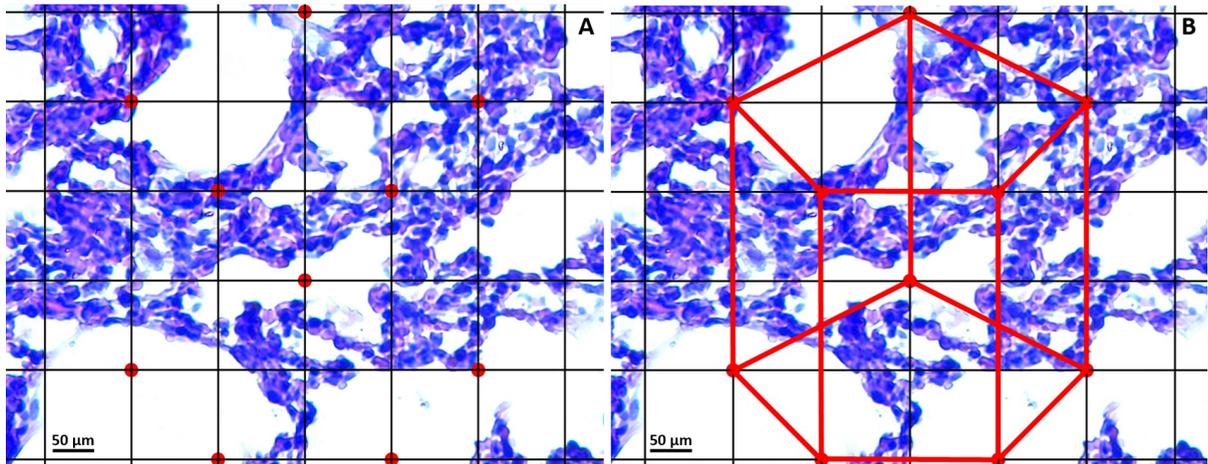


Figura 02: modelo estereométrico padronizado para a análise da área e espessura alveolar. A imagem A corresponde a demarcação dos pontos na grade de acordo com a coordenação de ligação das faces do prisma pentagonal, ilustrado na imagem B. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

4.6.2 Colorações Especiais: coloração com Azul de Toluidina – ATO e coloração com Ácido Periódico de Schiff – PAS

Para a coloração com o método ATO, recorreu-se ao protocolo publicado por LAMEB (2018). Em sequência, por microscopia óptica, foram contabilizados os mastócitos, visualizados em técnica de “zig zag”, escolhendo-se 20 campos de forma aleatória na objetiva de 40x em todas as lâminas confeccionadas, para estimar o número de mastócitos metacromáticos, Silva (2019). No término das quantificações, os dados obtidos foram tabulados sendo extraídos o somatório do número de mastócitos de cada lâmina, averiguando os resultados pelo uso do programa PRISM 8.0, plotando-se os gráficos comparativos do grupo Alergia e Controle, bem como os dados não paramétricos das amostras.

A coloração com o Ácido Periódico de Schiff (PAS) dos tecidos pulmonares promove a observação da secreção de muco pelas células caliciformes (MONTEIRO, *et al.*, 2018) e para coloração com esse método, usou-se o protocolo publicado por (BEHMER, *et al.*, 2003). Nessa técnica de coloração fez-se uma análise qualitativa percorrendo a área alveolar do

tecido para detectar a expressão, ou não, de muco. Uma vez evidenciado, a estrutura mucoide se cora de carmim.

4.7 Avaliações séricas

Ao final do protocolo de estabelecimento do modelo alergênico, em necropsia, o sangue periférico foi coletado. Devido ao tempo de análise deste trabalho e as limitações laboratoriais impostas pelas condições atuais da pandemia, esta etapa será realizada futuramente. O soro foi obtido em centrifugação e esses serão utilizados para quantificação de anticorpos IgE antiOVA pelo método de ELISA, descrito por Saldanha *et al.* (2004). O restante de soro obtido será utilizado para a quantificação de citocinas ligadas à alergia, tais como IL4, IL5, IL10 e IFN- α (PERTEGUER; CUELLAR, 2001).

4.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos inicialmente foram tabulados, com a determinação das médias, medianas, desvios e erros, além dos percentis. Os dados normais foram inferidos pela análise *T-Student*, cuja significância estatística adotada foi de 5% ($p < 0,05$). E o teste para análise do percentual de leucócitos foram inferidos pelo teste Exato de Fisher, cuja significância estatística adotada foi de 5% ($p < 0,05$). Para determinação das relações entre variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Os dados foram analisados utilizando o software (PRISM 8.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No delineamento do processo metodológico da pesquisa, bem como a escolha dos órgãos analisados e o biomarcador IgE, torna-se pertinente mencionar novamente que a AA compreende vários mecanismos imunológicos que conduzem as reações à OVA ingerida. Em sua forma mais comum, a AA se manifesta como uma hipersensibilidade imediata na qual anticorpos IgE específicos ligados a mastócitos e basófilos desencadeiam a liberação de mediadores que levam a respostas fisiológicas muito rápidas em vários tecidos-alvo (RENZ *et al.*, 2018). O que torna a quantificação de tais granulócitos interessante para a validação do estudo, uma vez que as reações ao desafio enteral demonstraram ser totalmente dependentes de IgE em vários modelos murinos de alergia alimentar (RENZ *et al.*, 2018).

Para o estabelecimento do modelo de alergia, foi primordial o procedimento de sensibilização publicado por Saldanha *et al.* (2004), visto que para os camundongos do grupo Alergia foi imprescindível o contato prévio com o antígeno, OVA. A eficácia desse inóculo se deve a utilização do adjuvante hidróxido de alumínio, pois esse confere uma função imunopotencializadora tanto às respostas imunes inatas quanto às adquiridas evocadas contra a OVA, como mostra a revisão bibliográfica publicada por He *et al.* (2015), em que o mesmo cita que o complexo OVA-Al(OH)₃ contribuem para que ocorra melhor interação com as células apresentadoras de antígeno - APCs. Nota-se também a importância na escolha do local da aplicação da injeção, pois o complexo mencionado pode causar inflamação local, He *et al.* (2015). Caso essa injeção fosse aplicada por via intraperitoneal, ela poderia gerar dados falsos positivos em regiões como os cólons, os quais ainda serão analisados. Com isso, a via subcutânea foi a melhor opção metodológica.

Ainda sobre a confecção dos antígenos para a sensibilização prévia do grupo Alergia, observou-se também que a introdução do adjuvante estabilizou o precipitado de albumina na forma de um coloide, de maneira que o inóculo foi distribuído de forma homogênea durante a aplicação, não gerando resíduos de proteínas no fundo do pistão, para que todos os animais do grupo Alergia tivessem a mesma quantidade de antígeno inoculado.

Para confirmar o desenvolvimento e o estabelecimento do modelo de AA, os animais foram acompanhados nos parâmetros corpóreos e alimentares durante todo o experimento. A massa corpórea foi acompanhada semanalmente e os resultados obtidos foram compilados na Figura 03.

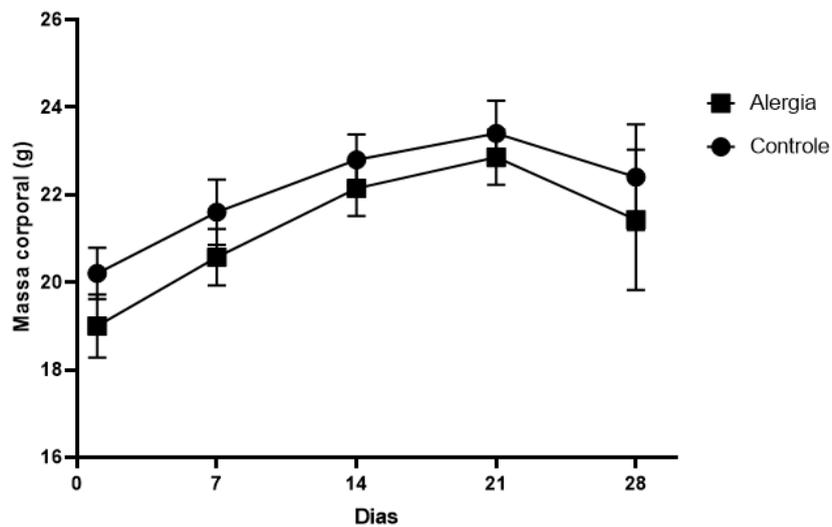


Figura 03: Gráfico do perfil da massa corporal dos camundongos ao longo do protocolo de 28 dias. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Durante todo o tempo de experimentação, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) da massa entre os grupos estudados. Dessa forma torna-se pertinente mencionar que os animais desses dois grupos foram adquiridos em momentos diferentes, sendo esses divididos em três levas. Contudo, mesmo com a realização do mesmo protocolo alimentar e de sensibilização, o grupo Alergia da última leva se apresentou muito debilitado e desidratado, com o aumento expressivo de perda de massa. Dessa forma, foi tomada a decisão, juntamente com o veterinário do CCA, de mudar a dieta dessa última leva, tanto do grupo Controle quanto do grupo Alergia, para que esses não viessem ao sofrimento. A decisão foi de intercalar água e a solução de albumina nos dias do desafio do uso da mamadeira de albumina, via oral, como única fonte hídrica, como foi feito nas levas anteriores, o que tornou a análise com um viés.

O consumo alimentar e hídrico dos animais dos grupos Controle e Alergia foram mensurados ao longo de todo o experimento e os dados foram apresentados, respectivamente, nas Figuras 04 e 05. Ambos os grupos iniciam o experimento com o mesmo consumo de ração. Contudo, a partir da segunda semana na qual foi realizado o primeiro desafio alérgico (OVA + Al(OH)₃), no grupo Alergia, nota-se uma diminuição no consumo de ração, isso comparando com o consumo do primeiro ao 14º dia, de cada grupo separadamente.

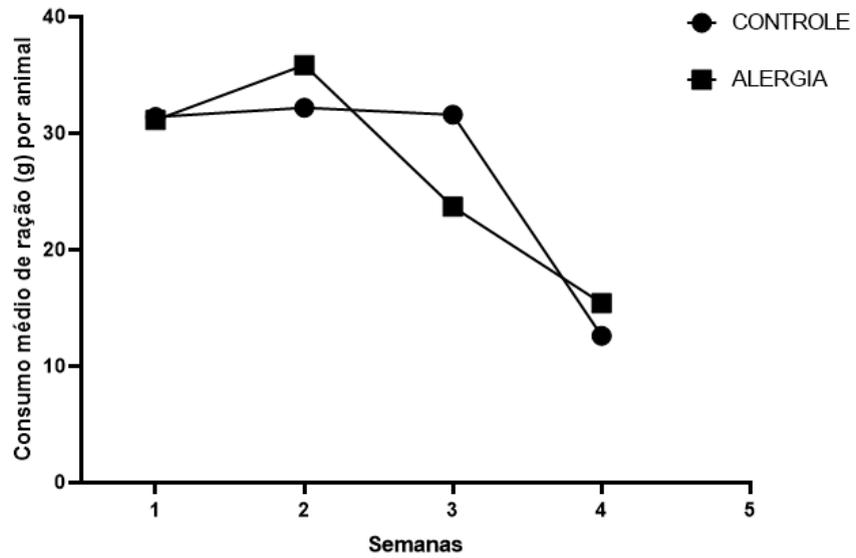


Figura 04: Gráfico do perfil de consumo médio de ração ao longo do protocolo de 28 dias. Teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

O consumo alimentar dos animais se manteve estável nas duas primeiras semanas de experimento. A partir da terceira semana, tanto o grupo Controle quanto o de Alergia, desafiados com a mamadeira de OVA, apresentaram um decréscimo no consumo de ração. Isso sugere a hipótese de um possível desconforto gástrico no grupo Controle e um processo alérgico no grupo Alergia.

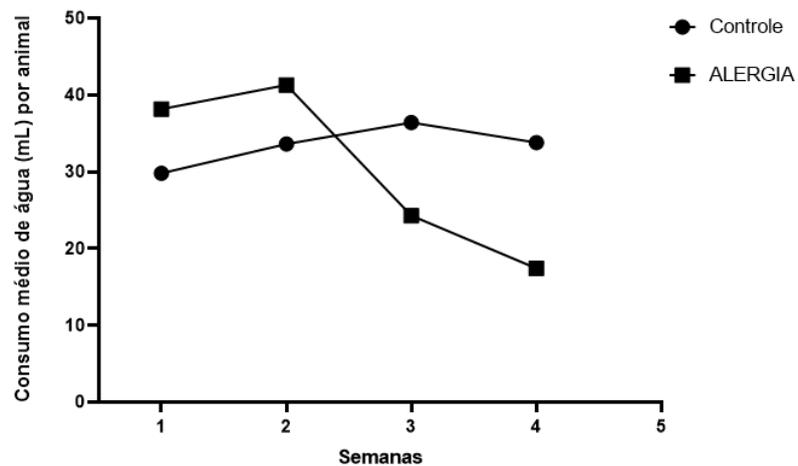


Figura 05: Gráfico do perfil de consumo médio de água e albumina ao longo do protocolo de 28 dias. Teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor

Sobre a Figura 05, é observado que o consumo de água do grupo Alergia e do grupo Controle seguem um padrão regular até o final da primeira semana. Posterior a isso, após o desafio alergênico do grupo Alegria, com a injeção de OVA + hidróxido de alumínio + salina 9%, nota-se uma queda gradual no consumo de água desse grupo em relação ao grupo Controle, que recebeu apenas a injeção contendo hidróxido de alumínio + salina 9%. Ainda nessa figura, após o desafio alimentar, na terceira semana, com mamadeira de OVA, observou-se que o grupo Controle apresentou uma discreta queda no consumo do mesmo. Ademais, o grupo Alergia que já vinha apresentando redução no consumo de água, a partir da segunda sensibilização, percebeu-se a continuidade crescente na redução de sua ingestão da mamadeira de OVA, nos últimos oito dias do desafio oral, mesmo que os resultados compilados na Figura 05 não tenham dado diferença significativa, devido a interferência do protocolo já mencionado.

Diante o exposto, tanto a possibilidade de uma rejeição dietética quanto a de uma aversão à mamadeira de OVA, pelo desenvolvimento da hipersensibilidade, levou os camundongos do grupo Alergia a um quadro de desnutrição e desidratação. Com isso, é importante em um novo experimento a realização de um período adaptativo da dieta com OVA desses animais ou a utilização do método de gavagem para alimentá-los, padronizando o volume de albumina para cada animal, ao evitar o viés da rejeição alimentar.

Estudos experimentais feitos por Bills *et al*, (2005) citado por Dourado; Machado (2006) demonstram que os camundongos podem fazer associação entre determinado sabor ofertado na dietética relacionado desconforto causado pelo mesmo, levando a rejeição alimentar pelos grupos, fenômeno denominado de “Aversão condicionada ao sabor”. Esse mesmo estudo, demonstrou tal fenômeno mediante a associação de uma solução de sacarina e prévia exposição à injeção de cloreto de lítio, nisso os animais desenvolveram desconforto causado pela injeção e não pela sacarina em si. Contudo, passam a associar a sacarina ao fator causador do desconforto e rejeitam a mesma em futuras exposições. Dessa forma, sugere-se a relevância de em futuras análises a realização de avaliações séricas de IgE, a fim de elucidar o mecanismo pelo qual os animais tornaram-se aversivos ao alimento ofertado.

No que tange às avaliações dos leucócitos, durante as semanas do experimento, os animais tiveram semanalmente coletados o sangue para detecção de parâmetros hematológicos e bioquímicos, no intuito de elucidar o alcance ou não do desenvolvimento da alergia alimentar. Foram realizadas contagens diferenciais de leucócitos circulantes e o percentual obtido foi comparado com os valores referenciais de leucócitos de camundongos

machos da linhagem BALB/C, (DE SOUSA BARBOSA *et al.* 2017). Os dados obtidos foram compilados nas Tabelas 01 e 02.

Grupo Controle						
Parâmetro	Valor referência%	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Análise de contingência (Exato de Fisher)
Linfócitos	68,00±8,36	67,00 ^a	76,60 ^a	80,40 ^a	75,00 ^a	p>0.05
Eosinófilos	2,12±1,09	0,80 ^a	0,80 ^a	1,20 ^a	1,00 ^a	p>0.05
Monócitos	2,84±1,03	4,00 ^a	3,20 ^a	2,60 ^a	3,40 ^a	p>0.05
Basófilos	0,00	0,20 ^a	0,80 ^a	0,20 ^a	0,40 ^a	p>0.05
Neutrófilos	27,04±8,55	27,80	18,60	16,00 ^a	20,40 ^a	p>0.05

Tabela 01: relação leucocitária entre grupo Controle e valores de referência. Avaliação pelo teste Exato de Fisher. O símbolo “a” representa um dado estatisticamente semelhante ao valor de referência. **Fonte:** Elaborado pelo autor

Grupo Alergia						
Parâmetro	Valor referência %	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Análise de contingência (Exato de Fisher)
Linfócitos	68,00±8,36	72,57 ^a	75,43 ^a	80,42*	72,20 ^a	p<0.05
Eosinófilos	2,12±1,09	2,00 ^a	4,86 ^a	5,57 ^a	8,40 ^a	p>0.05
Monócitos	2,84±1,03	3,14 ^a	4,00 ^a	4,71 ^a	5,20 ^a	p>0.05
Basófilos	0,00	0,42 ^a	0,14 ^a	0,42 ^a	0,60 ^a	p>0.05
Neutrófilos	27,04±8,55	21,14 ^a	15,14 ^a	8,75*	13,60 ^a	p<0.05

Tabela 02: relação leucocitária entre grupo Alergia e valores de referência. Avaliação pelo teste Exato de Fisher. ^a – dado estatisticamente semelhante ao valor de referência e * - dado estatisticamente diferente ao valor de referência. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Ao analisar o perfil leucocitário do grupo Controle em relação aos valores de referência (DE SOUSA BARBOSA *et al.* 2017) nota-se que não houve uma diferença significativa entre o percentual de cada parâmetro celular, o que demonstra que os valores do grupo Controle seguem viáveis para serem comparados com os valores do grupo Alergia. Dessa forma, ao analisar esses dois grupos de estudo, percebe-se que houve uma mudança do perfil leucocitário entre os grupos durante a terceira semana do experimento. O grupo Alergia foi caracterizado por uma linfocitose (p=0,0042), aumento de possíveis linfócitos circulantes sensíveis ao antígeno albumina, referente ao primeiro desafio alergênico, e uma neutropenia

significativa ($p=0,003$). Isso sugere um processo inflamatório causado pela hipersensibilidade, o que já demonstra uma possível efetividade no estabelecimento do modelo de alergia confeccionado.

Uma vez que eosinófilos e basófilos estão envolvidos intimamente em processos alérgicos (LICHTMAN, *et al.* 2013), nota-se um aumento no percentual de ambas as células inflamatórias no grupo Alergia, em comparação com o grupo Controle. A alteração do perfil sérico de células do sistema imunológico no sangue, representado no esfregaço demonstra que provavelmente houve uma hipersensibilidade imediata nesses animais, que será confirmada posteriormente pelo imunoenensaio, apresentado em materiais e métodos, através da quantificação de IgE.

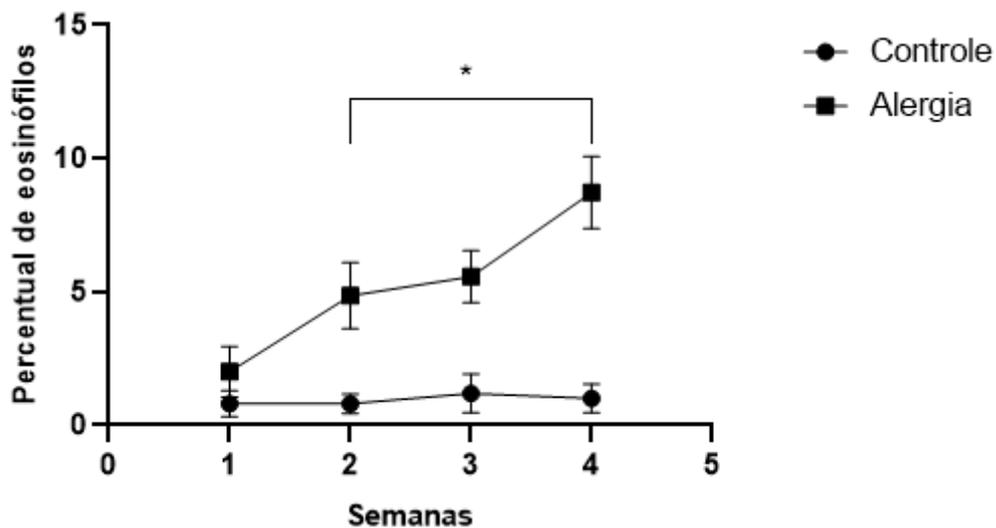


Figura 06: Gráfico do perfil de eosinófilos do grupo Controle e grupo Alergia ao longo do protocolo de 28 dias. O símbolo “*” indica a diferença entre os grupos. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, Teste *T-Student*. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Sobre a Figura 06, há uma mudança significativa de eosinófilos ($p<0,05$), em que a porcentagem do número desses foi aumentando de acordo com o desenvolvimento do experimento, sendo que essa mudança já se inicia no grupo Alergia na primeira semana, em que esse já foi sensibilizado com o antígeno, albumina, no primeiro dia do experimento. Percebe-se que esse aumento no percentual de eosinófilos foi gradual à medida que houve uma segunda sensibilização com o antígeno, por via cutânea, e posteriormente com o desafio com a albumina por via oral. Torna-se pertinente falar que esse aumento de eosinófilos não se deu apenas em comparação com o grupo Controle, ele se deu também em comparação entre

as quatro semanas do protocolo do mesmo grupo. O que qualifica ainda mais a efetivação do experimento.

Como as AAs se manifestam em uma variedade de condições clínicas no trato gastrointestinal - TGI, pele e pulmões em humanos (RENZ *et al*, 2018) tornou-se pertinente também a análise histopatológica pulmonar no modelo murino proposto. Quando o alérgeno é distribuído sistemicamente após a sua absorção no TGI, ele, os basófilos circulantes já sensibilizados por IgE e os mastócitos residentes nos tecidos podem reagir, resultando no processo inflamatório, como mostra a Figura 07 e 09 a seguir, ou até mesmo em um processo anafilático Renz *et al*. (2018). Isso pode ter gerado uma queda da pressão arterial e obstrução das vias respiratórias Lichtman *et al*. (2013), uma vez que os grupos se encontravam em posição prostática incapazes de se locomover ou reagir a estímulos táteis na última semana do protocolo, o que acarretou na mudança do mesmo pela orientação do veterinário.

Ao observar a Figura 07, nota-se que não há aumento do número médio de células dos pulmões ($p=0,08$), devido ao infiltrado inflamatório.

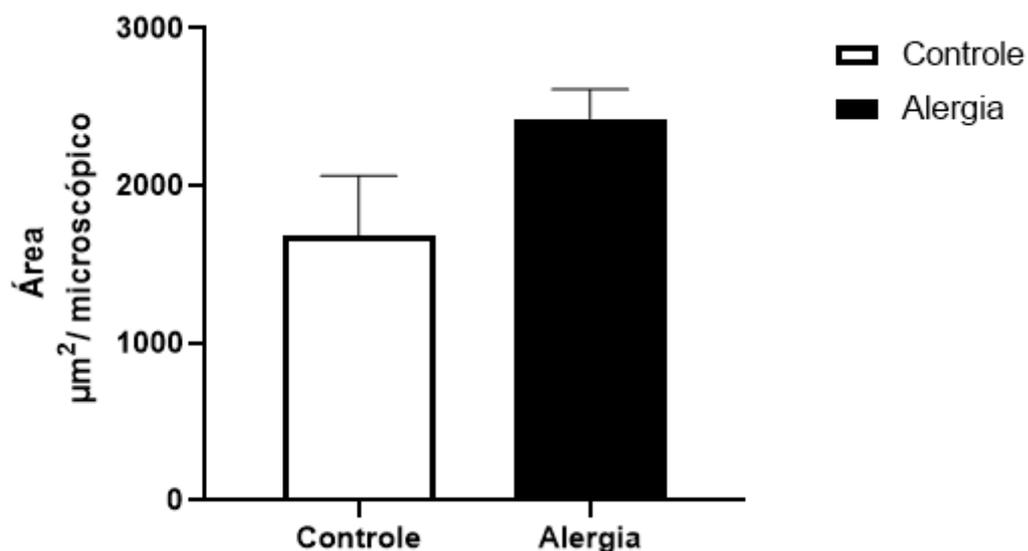


Figura 07: Gráfico do número médio de núcleos dos pulmões do grupo Controle e grupo Alergia, tecidos extraídos após a eutanásia no último dia do protocolo de 28 dias. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Além disso foi possível observar uma forte correlação ($r= 0,6894$) e estatisticamente significativo ($p= 0,0274$) entre a espessura alveolar representada na ($p= 0,07$) e a massa de infiltrado inflamatório no grupo Alergia.

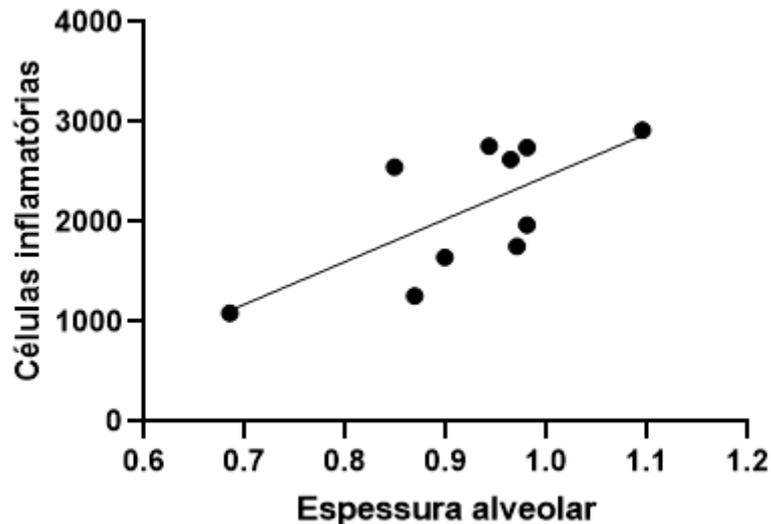


Figura 08: Gráfico de dispersão obtido através do coeficiente de correlação de Pearson. Nota-se a relação das variáveis: células inflamatórias e espessuras alveolares do grupo Alergia e Controle. Associação indicada pelo valor de $r = 0,69$. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A primeira hipótese dessa correlação se dá pelo grande fluxo de células inflamatórias, mediadas por mastócitos, ao gerar grande volume celular no parênquima alveolar, aumentando dessa forma seu espessamento, mesmo que não significativo. Uma segunda hipótese sugere um remodelamento do parênquima pulmonar com o espessamento dos septos alveolares, devido ao acúmulo de colágeno no tecido reparado. Tal resposta começa quase que de forma instantânea após o início da lesão causada pelo processo inflamatório, numa tentativa de reparar o dano à parede alvéolo-capilar como mostra a tese publicada por Silva (2019), referenciando também que esse acúmulo de células inflamatórias alteram o microambiente alveolar, conduzindo a evolução do remodelamento tecidual para a fibrose progressiva (SOUZA, 2003; SILVA, 2019). Este processo faz com que os tecidos pulmonares sejam progressivamente substituídos por fibroblastos e colágeno, causando uma perda irreversível destes tecidos em transferir oxigênio para a corrente sanguínea via alvéolos pulmonares (LEE *et al.*, 2002; WALDMAN *et al.*, 2003; SILVA, 2019).

Diante do exposto, é evidente a mudança significativa da conformação dos alvéolos pulmonares bem como a diminuição de sua área luminal, representado pela Figura 10 ($P < 0,05$), de forma a comprometer a função respiratória dos camundongos do grupo Alergia.

Contudo, para elucidar o mecanismo do espessamento e diminuição da área alveolar torna-se necessário uma análise morfológica com a utilização de um corante específico para evidenciar fibras colágenas, como a técnica colorimétrica do Picosirius Red utilizado no estudo publicado por Silva (2019).

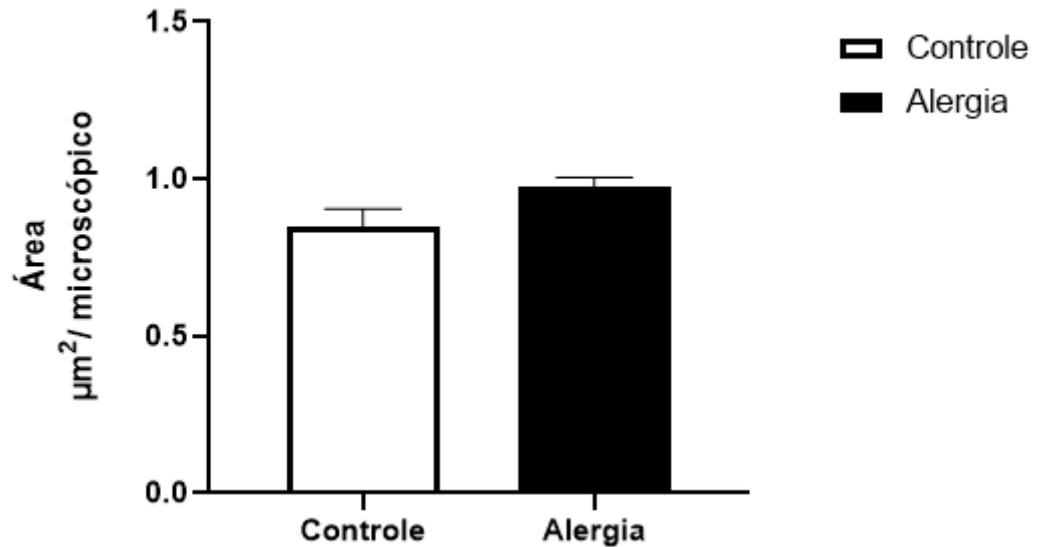


Figura 09: Gráfico das espessuras dos alvéolos pulmonares do grupo Controle e grupo Alergia, tecidos extraídos após a eutanásia no último dia do protocolo de 28 dias. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

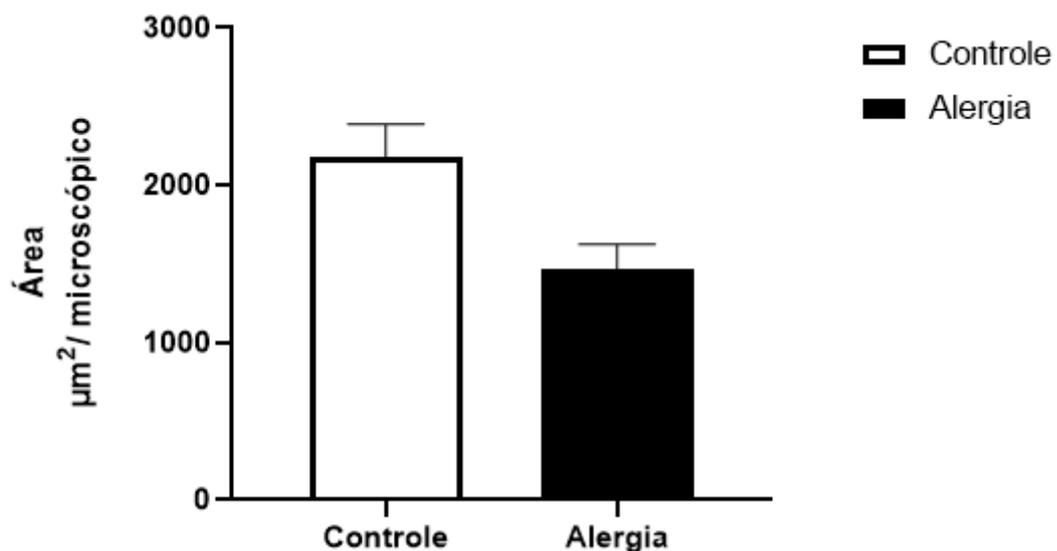


Figura 10: Gráfico demonstrativo das áreas dos alvéolos pulmonares do grupo Controle e grupo Alergia, tecidos extraídos após a eutanásia no último dia do protocolo de 28 dias. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

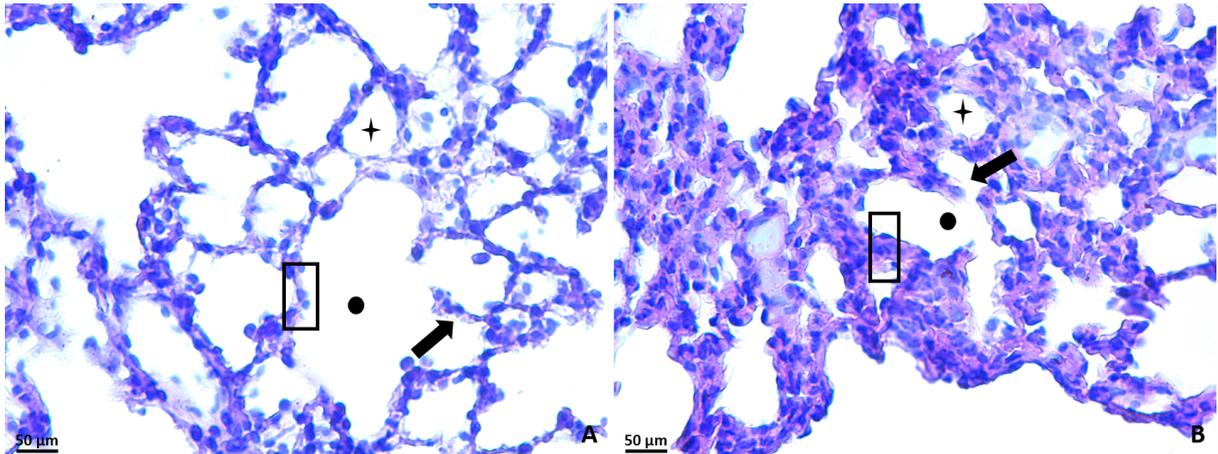


Figura 11: fotomicrografias representativas de secções dos tecidos pulmonares, no aumento de 400x, do grupo Controle (A) e do grupo Alergia (B). As áreas dos sacos alveolares e alvéolos propriamente ditos (μm^2) estão indicados pelos “pontos pretos” e pelas “estrelas”, respectivamente. As diferenças das espessuras das paredes alveolares de ambos os grupos estão delimitadas pelos retângulos. As setas indicam os septos ou paredes intra-alveolares. Tecidos extraídos após a eutanásia no último dia do protocolo de 28 dias. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

No que diz respeito aos mastócitos, essas são células derivadas da medula óssea e estão presentes em todos os tecidos conjuntivos, especialmente sob o epitélio, e normalmente ficam adjacentes aos vasos sanguíneos (LICHTMAN, *et al.* 2013). Tais células apresentam em sua composição grânulos citoplasmáticos que são corados na cor púrpura pelo corante metacromático ATO, como mostra a Figura 13. Os grânulos dos mastócitos são diversos sendo que esses contêm: aminas vasoativas, mediadores lipídicos e citocinas, todas envolvidas no processo alérgico e/ou inflamatório, Lichtman *et al.* (2013)

As AAs compreendem vários mecanismos no sistema imunológico que conduzem as reações alérgicas aos antígenos ingeridos. Porém de maneira geral, a alergia ocorre pela liberação de mediadores que levam a respostas fisiológicas muito rápidas em vários tecidos-alvo, sendo que as células efetoras dessa mediação são os basófilos, que também possuem grânulos citoplasmáticos, e os mastócitos, Renz *et al.* (2018). Torna-se pertinente mencionar, que o protagonismo dos basófilos na hipersensibilidade imediata não está tão bem estabelecido como o papel dos mastócitos, Lichtman *et al.* (2013), o que tornou apenas o mastócito alvo deste estudo, uma vez que seu papel é fundamental na resposta ao alérgeno. Ainda sobre a ação dos mastócitos, nota-se que ele possui grande importância, tanto na hipersensibilidade imediata quanto na tardia.

No que tange a hipersensibilidade imediata, essa se configura em minutos pela liberação, degranulação, da histamina pelos mastócitos: principal amina vasoativa de tal mecanismo, provocando o aumento da permeabilidade vascular e contração da musculatura

lisa brônquica e intestinal, Lichtman *et al.* (2013). Diferentemente da imediata, a reação tardia caracteriza-se como um elemento de resposta a hipersensibilidade imediata decorrente de duas a quatro horas posterior ao efeito granulocitário do mastócito, manifestado por uma infiltração inflamatória de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e basófilos, Lichtman *et al.* (2013), como mostrado na Figura 11. Os tecidos podem, mediante a repetidas ocorrências desta reação, desenvolver lesões teciduais, Lichtman *et al.* (2013).

Na reação tardia as citocinas são as desencadeadoras principais dessa reação, sendo essas liberadas pelos mastócitos num processo inflamatório, dentre elas compreende-se: fator de necrose tumoral (TNF), IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1 α , MIP-1 β . Destaca-se o TNF, uma vez que o mesmo é responsável pela ativação da expressão no endotélio de moléculas de adesão as quais geram infiltrados de células mononucleares e polimorfonucleares, Dourado; Machado (2006)

Em geral, a ativação dos mastócitos depende da via de entrada do antígeno. Alérgenos inalados ativam mastócitos nos tecidos submucosos dos brônquios, enquanto alérgenos ingeridos ativam mastócitos na parede do intestino (LICHTMAN, *et al.* 2013), o que torna possível que sejam encontrados em quantidades significativas no intestino dos animais do grupo Alergia, que serão analisados. Complementando a essa informação, a análise quantitativa de mastócitos entre o grupo Alergia e o grupo Controle no tecido pulmonar não foram significativos ($p=0,4$), como mostra a Figura 12. Uma vez que o tecido-alvo no recrutamento dos mastócitos na alergia alimentar seria o intestino. O que torna essa análise promissora.

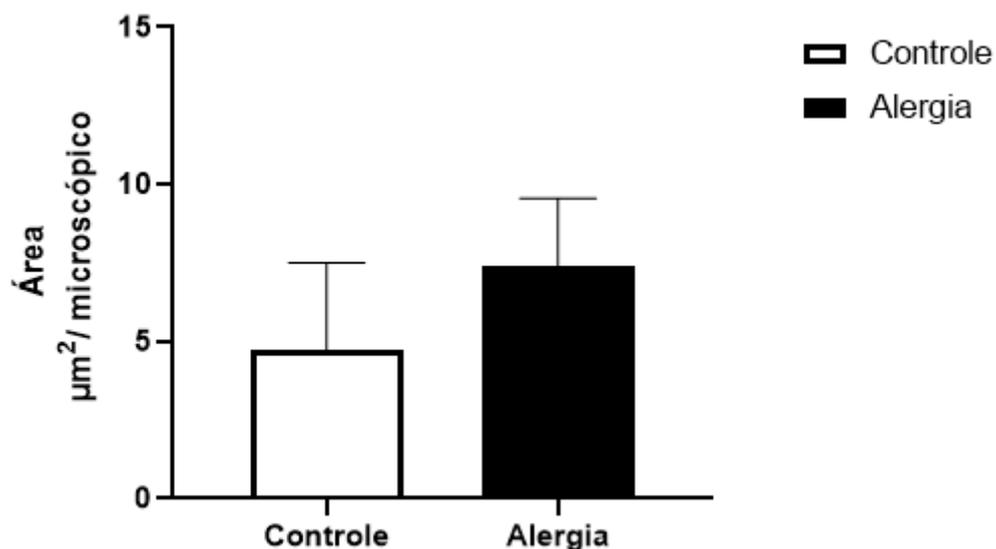


Figura 12: quantificação dos números de mastócitos no tecido pulmonar dos grupos Controle e Alergia. Contagem manual utilizando a técnica de zig-zag. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Assim como a alergia alimentar é determinada por diferenças na quantidade de mediadores inflamatórios liberados no intestino, na taxa de absorção dos antígenos ingeridos e na distribuição de mastócitos ligados à IgE específica ao antígeno (FINKELMAN *et al.*, 2005; DOURADO; MACHADO, 2006), um estudo publicado por Monteiro *et al.* (2018) demonstrou o aumento de mastócitos nas vias aéreas através de uma exposição de alérgeno inalado pelos camundongos, comparativamente ao grupo tratado com Gama-Terpineno (GT), permitindo a obtenção de dados significativos na expressão de mastócitos na região nasal, bem como infiltrados nasal, muco e presenças de fibras colágenas. Isso colabora com os resultados negativos da AA apresentado pela Figura 13 na imagem C, onde há a ausência de infiltrado mucóide nos alvéolos terminais, expressos pelas células caliciformes nas porções bronquiolares, em que o muco se apresentaria na cor carmim pela coloração PAS. Torna-se pertinente mencionar que a coloração foi controlada por um controle positivo na expressão de muco, validando a coloração.

Dessa forma tanto as alterações histopatológicas e as fisiológicas observadas se deram de forma central ao local de absorção do alérgeno, sendo os sinais e sintomas pulmonares como início de um processo anafilático ou sintomas secundários, aos sinais e sintomas intestinais.

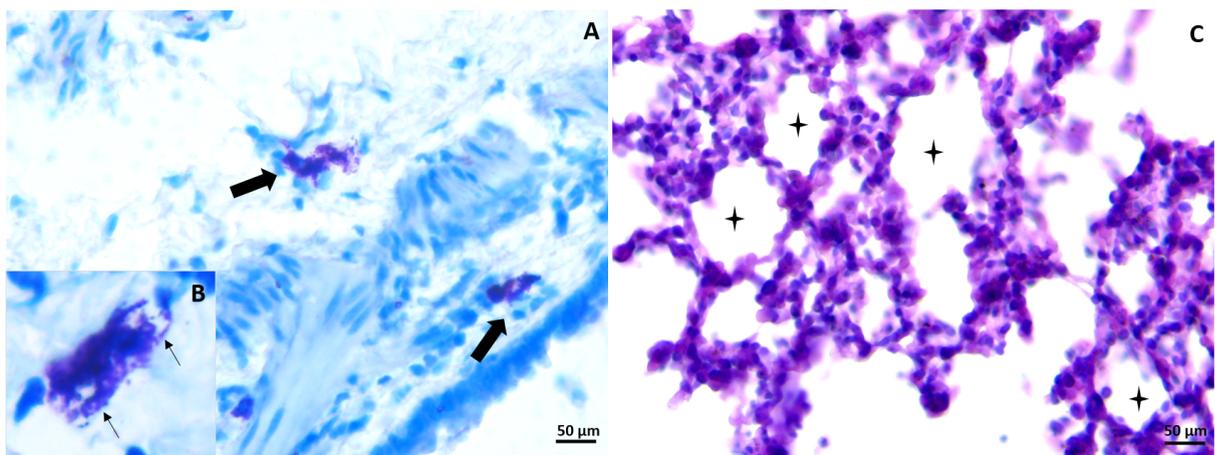


Figura 13: fotomicrografia da secção dos tecidos pulmonares, no aumento de 400x. Em A, as setas indicam os mastócitos propriamente ditos dispostos na camada mucosa do pulmão, no tecido conjuntivo. Em B um mastócito, ampliado, com seus grânulos citoplasmáticos evidenciados pelas setas finas. Em C, nota-se a ausência de muco nos lúmens dos alvéolos, representados pelas “estrelas”. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Ainda sobre o papel dos mastócitos na alergia alimentar, mesmo que esses não tenham se expressado significativamente no pulmão, sua participação na fase alimentar do grupo Alergia pode ter ganhado mais um destaque, uma vez que tanto o desenvolvimento da aversão alimentar quanto a ativação cerebral contra alérgenos alimentares, parecem ser induzidos pela degranulação de mastócitos dependente de IgE, uma vez que estes eventos não acontecem após o tratamento dos animais com anticorpo anti-IgE (BASSO *et al.*, 2003; BASSO *et al.*, 2004; DOURADO; MACHADO, 2006). Esse mesmo trabalho aponta a possibilidade da ação dos mastócitos induzida pela IgE ser o principal mecanismo de sinalização da alergia alimentar para o sistema nervoso. Renz *et al.* (2018), relataram que os efeitos dos mastócitos nos neurônios secretomotores demonstraram regular a secreção de muco no intestino.

A partir dos resultados coletados pode-se dizer que o grupo Alergia apresentou linfocitose e neutropenia, o que sugere uma resposta inflamatória devido à instalação de um processo alérgico, mesmo que ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas da massa corpórea e do consumo médio de ração e água. Isso se deve a mudança inesperada do protocolo devido a observação do veterinário referente aos sinais e sintomas de um possível processo anafilático, mesmo que no cálculo amostral estivesse previsto a perda de animais requeridos, aplicado a mortalidade de 30% inerente ao modelo.

Como os sinais e sintomas associados às AAs são de amplo espectro, podendo afetar até mesmo o pulmão (SICHERER; SAMPSON, 2014; 2018), a escolha desse órgão para ser analisado no estabelecimento de AA se tornou interessante, pois não há muitos estudos direcionados a estes órgãos em tal modelo, presentes na literatura. Os pulmões apresentam-se como um possível marcador de um processo anafilático, pois o antígeno absorvido no TGI pode ser distribuído de forma sistêmica atingindo estes órgãos, os quais são amplamente vascularizados, o que será confirmado com a análise do perfil sérico de mediadores ligados às alergias.

A intervenção realizada no protocolo, pode ter impactado diretamente com os resultados histopatológicos pulmonares, uma vez que tanto a alergia imediata quanto a tardia podem acontecer horas após o contato com a mamadeira de OVA, Lichtman *et al.* (2013). Com a alternância de mamadeira de OVA e água, o infiltrado inflamatório, expressão de muco e quantidade de mastócitos podem ter sido amenizados no dia seguinte. Desta forma a não interrupção do alérgeno se demonstra essencial para a efetivação do protocolo de AA.

Mesmo que o resultado da celularidade alveolar não tenha sido significativa para inflamação a arquitetura dos alvéolos mudaram, de modo que a área luminal dos mesmos no grupo Alergia se tornaram menores e significativos, em relação ao grupo Controle, como mostram os dados estatísticos. Não obstante, para elucidar o mecanismo do espessamento e diminuição da área alveolar torna-se necessário uma análise morfológica com a utilização de um corante específico para evidenciar fibras colágenas, como a técnica colorimétrica do Picrosirius Red utilizado no estudo publicado por Silva (2019).

Nota-se também que tanto a possibilidade de uma rejeição dietética quanto a de uma aversão à mamadeira de OVA, pelo desenvolvimento da hipersensibilidade, levou os camundongos do grupo Alergia a um quadro de desnutrição e desidratação. Com isso, é importante em um novo experimento a realização de um período adaptativo da dieta com OVA desses animais ou a utilização do método de gavagem para alimentá-los, padronizando o volume de albumina para cada animal, ao evitar o viés da rejeição alimentar.

Como perspectivas, além desses resultados, espera-se analisar o perfil imunológico de cada grupo através do imunoensaio ELISA e a análise histopatológica dos tecidos intestinais coletados e já processados, de modo a evidenciar a efetividade do estabelecimento de um modelo animal de alergias alimentares para posteriores estudos histopatológicos e de tratamento, bem como a expressão de mastócitos e de muco relacionados diretamente com a exposição local do antígeno, como visto no presente estudo. O desenvolvimento do modelo abre perspectivas para estudos futuros de terapias medicamentosas e naturais contra os sinais e sintomas associados às alergias alimentares.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho do desenvolvimento de alergia alimentar podemos concluir que:

- A massa corpórea de animais alérgicos não se diferiu de animais não alérgicos durante todo o processo de indução alérgica;
- Os animais alérgicos mudanças das populações celulares séricas com o desenvolvimento de linfocitose e neutropenia Nas mudanças no perfil de células sanguíneas;
- Os animais alérgicos não apresentaram diferenças inflamatórias bem como a espessura da parede alveolar, produção de muco e número de mastócitos, comparado a animais não alérgicos;
- A área de luz alveolar de animais alérgicos é menor do que a de animais não alérgicos;
- A infiltração inflamatória se correlaciona diretamente com a área de parede alveolar nos pulmões.

REFERÊNCIAS

ANVARI, S. *et al.* IgE-Mediated food allergy. *Clin Rev Allergy Immunol*, v. 57, n. 2, p. 244-260, oct. 2019.

BEHMER, Oswaldo Arruda; TOLOSA, Erasmo Magalhães Castro de. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. In: **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, p 331-331, 2003.

DE SOUSA BARBOSA, Brenna *et al.* Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. **Acta Scientiae Veterinariae** , v. 45, p. 3, sep 2017.

DEVIDAS, J. M. *et al.* Allergy in children: an overview. *Indian J Pediatr*, v. 85, n. 5, p. 369-374, may 2018.

DOURADO, Luana Pereira Antunes; MACHADO, Denise Carmona Cara. Participação das citocinas na aversão e alergia alimentar induzida à ovalbumina em camundongos. 2006.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D. I.; OLIVATO, M. C. M. Guia de Eutanásia Para Animais de Ensino e Pesquisa. **UNIFESP: São Paulo, Brazil**, p. 29-30, apr. 2013.

FERREIRA, PAIVA *et al.* 2018. “Análise Comparativa dos Parâmetros Envolvidos em Modelos Experimentais de Asma Alérgica”. **Os Desafios do Mundo Contemporâneo**. 3º ed. João Pessoa - PB: IMEA. Apress.:LIVRO-SAUDE-2018-vol-3.pdf (cinasama.com.br).

FERNANDES, Denilsa P. *et al.* Hematological and biochemical profile of BALB/c nude and C57BL/6 SCID female mice after ovarian xenograft. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 3941-3948, oct. 2018.

HAUSMANN, O. *et al.* Drug hypersensitivity reactions involving skin. *Exp Pharmacol.*, v. 196, p. 29-55, 2010.

HE, Peng; ZOU, Yening; HU, Zhongyu. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 477-488, feb. 2015.

IWEALA, O. I. *et al.* Food allergy. *Curr. Gastroenterol Rep.*, v. 20, n. 5, p. 17, apr. 5 2018.

LAMEB (Santa Catarina). **Protocolos para Histoquímicas**, 2018. Elaborada pela LAMEB da UFSC. Disponível em:

<https://lameb.ufsc.br/protocolos-para-histoquimicas/#:~:text=Resultado%3A%20o%20azul%20de%20toluidina,de%20verde%20ou%20azul%20esverdeado>. Acesso em: 13 maio 2022.

LICHTMAN, A. H. *et al.* *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. **Rio de Janeiro: Saunders Elsevier**, v 4, p 270 - 539, 2013.

LOPES, João Pedro; SICHERER, Scott. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment. **Current Opinion in Immunology**, v. 66, p. 57-64, 2020.

MARTINS, L. E.; REIS, V. M. Immunopathology of allergic contact dermatitis. *An. Bras. Dermatol.*, v. 86, n. 3, p. 419-433, may/jun. 2011.

MONTEIRO, Talissa Mozzini et al. Estudo da atividade ansiolítica e imunomoduladora do Gama-terpineno. 2018.

MOTTA, M. E. F. *et al.* Gastrointestinal tract and food allergy in children. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*, v. 25, n. 3, p. 81-92, 2002.

PERTEGUER, M. J.; CUÉLLAR, C. Interleukin-4 production in BALB/c mice immunized with *Anisakis simplex*. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p. 979-982, oct. 2001.

REBER, L. L. *et al.* Selective ablation of mast cells or basophils reduces peanut-induced anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol*, v. 132, n. 4, p. 881-888, oct. 2013.

REIS, A. P. *et al.* Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. *Cell Death Dis*, v. 6, feb. 2015.

REIS, A. P. Epigenetics of asthma: a review. *Braz J Allergy Immunol*, v. 3, n. 1, p. 13-18, 2015.

RENZ, Harald et al. Food allergy. **Nature reviews Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, jan 2018.

SALDANHA, J. C. *et al.* A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Braz J Med Biol Res.*, v. 37, n. 6, p. 809-816, jun. 2004.

SANGARAJU, R. *et al.* Protective effect of galangin against dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis in Balb/c mice. *Inflamm Res.*, v. 68, n. 8, p. 691-704, aug. 2019.

SANTOS, Laise Aline Martins dos *et al.* **Avaliação do potencial anti-inflamatório dos derivados tiazolidínicos LPSF/GQ-2 e LPSF/RA-4 em modelo de lesão pulmonar aguda**. 2018. Tese de Doutorado.

SANTORO, D.; MARSELLA, R. Animal Models of Allergic Diseases. *Vet. Sci.*, v. 1, p. 192-212, 2014.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 141, n. 1, p. 41-58, jan. 2018.

SICHERER, S. H. *et al.* The natural history of egg allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol* v. 133, n. 2, p. 492-499, feb. 2014.

SILVA, Sandra Cabral da. Efeitos de derivados acilhidrazônicos na inflamação pulmonar experimental por sensibilização química. 2019.

TORDESILLAS, L. *et al.* Immunology of Food Allergy. *Immunity*, v. 47, n. 1, p. 32-50, 18 jul. 2017.

YU, O. *et al.* Heated egg yolk challenge predicts the natural course of hen's egg allergy: a retrospective study. *World Allergy Organ J.*, v. 9, n. 1, p. 31, oct. 2016.