



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



FABRICIO SAMPAIO COELHO

ESTABELECIMENTO DA ALERGIA ALIMENTAR EXPERIMENTAL EM MODELO
MURINO: ESTUDO HISTOLÓGICO DO BAÇO

OURO PRETO-MG

2024

FABRICIO SAMPAIO COELHO

ESTABELECIMENTO DA ALERGIA ALIMENTAR EXPERIMENTAL EM MODELO
MURINO: ESTUDO HISTOLÓGICO DO BAÇO

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina FAR007 – Elaboração 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

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C672e Coelho, Fabricio Sampaio.
Estabelecimento da alergia alimentar experimental em modelo murino [manuscrito]: estudo histológico do baço. / Fabricio Sampaio Coelho. - 2024.
32 f.: il.: , gráf., tab..

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

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

CDU 612.39

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabricio Sampaio Coelho

Estabelecimento da alergia alimentar experimental em modelo murino: estudo histológico do baço

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

Aprovada em 08 de fevereiro de 2024.

Membros da banca

Dr. Wanderson Geraldo de Lima - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)

Dra. Danielle Barbosa Morais - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Me. Raianne dos Santos Baleeiro - (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 26/02/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Wanderson Geraldo de Lima, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/02/2024, às 15:27, 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 **0673771** e o código CRC **241EDB6E**.

RESUMO

As alergias são hipersensibilidades imunológicas em resposta a um agente antigênico, conhecido como alérgeno. 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 teve como objetivo o estabelecimento do modelo de estudo de alergia alimentar para a busca e a aplicação de novas terapias que visem ao tratamento desse fenômeno imunológico. Os grupos estudados, da linhagem de 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 baço. Buscou-se avaliar, como forma de validação do modelo, as análises de sangue, com determinação de perfis celulares sanguíneos e a análise histológica do baço. Evidenciou-se nessa análise, do sangue periférico, uma diferença entre o percentual de eosinófilos do Grupo Alergia e o Grupo Controle com os valores de 8,40 e 1,20 respectivamente. O grupo alergia apresentou um quadro de linfocitose (80,41) e neutropenia (8,75), 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. No tocante à análise do baço, observou-se que não houve valor de P significativo para as avaliações de cápsula, trabéculas e nódulos. Dessa forma, constatou-se a ausência de uma diferença significativa nas comparações de lesões, no referido órgão, entre o Grupo Alergia e o Grupo Controle. Por fim, buscou-se proceder uma avaliação da produção de Imunoglobulinas E (IgE), bem como citocinas ligadas a processos alérgicos objetivadas em análise futura. Ao término do experimento, a referida análise dos animais alérgicos apresentou um aumento expressivo de IgE quando comparado aos animais controles, evidenciando com isso a confirmação de um processo alérgico instaurado nos animais do Grupo Alergia detectado por meio do teste ELISA. 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.

ABSTRACT

Allergies are immunological hypersensitivities in response to an antigenic agent, known as an allergen. Many foods, present in the basic diet, have already been recognized as potentially allergenic and, associated with the current lifestyle, lead to a worldwide increase in children and adults with food allergies. This research aimed to establish a model for studying food allergy for the search and application of new therapies aimed at treating this immunological phenomenon. The studied groups, from the BALB/c mouse lineage, had food allergy induced by a 28-day protocol with two injection challenges of Al(OH)₃ solution and egg albumin (OVA). After the induction protocol, the animals were euthanized to obtain blood and spleen. Blood analyses were sought to validate the model, with determination of blood cell profiles and histological analysis of the spleen. In this analysis, a difference was evidenced in the peripheral blood between the percentage of eosinophils in the allergy group and the control group. The allergy group presented a picture of lymphocytosis and neutropenia, suggesting an inflammatory response due to the installation of an allergic process, even though both groups did not show significant differences in body mass and average consumption of food and water. Regarding the spleen analysis, no significant P value was observed for evaluations of capsule, trabeculae, and nodules. Thus, the absence of a significant difference in lesion comparisons in the spleen between the Allergy Group and the Control Group was noted. Finally, an evaluation of the production of Immunoglobulin E (IgE) and cytokines linked to allergic processes was conducted. At the end of the experiment, the analysis of allergic animals showed a significant increase in IgE compared to control animals, confirming the presence of an allergic process in the Allergy Group detected through the ELISA test. The development of the model opens perspectives for future studies on drug and natural therapies against the signs and symptoms associated with food allergies.

Keywords: Food Allergy; OVA Murine Model; IgE.

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA.....	13
4. METODOLOGIA.....	14
4.1 Animais.....	14
4.2 Cálculo amostral para definição dos grupos experimentais.....	14
4.3 Estabelecimento do modelo de alergia.....	15
4.4 Acompanhamento de massa corpórea e do consumo de ração e de água.....	16
4.5 Avaliação dos leucócitos.....	16
4.6 Avaliações histológicas.....	16
4.6.1 Coloração em Hematoxilina e Eosina – HE.....	17
4.7 Avaliações séricas.....	17
4.8 Análises estatísticas.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
5.1 Perfil leucocitário.....	23
6. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

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 digestivas (ingestão de alimentos) são as principais “portas de entrada” de alérgenos nos organismos (YU *et al.*, 2016). A alergias induzidas pela ingestão de alimentos (alergias alimentares – AA) são frequentes em todas as etapas da vida nas populações humanas. 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 AA infantil, bem como camarão e frutos do mar, mais frequentemente envolvidos nas AAs em adultos (SICHERER; SAMPSON, 2018).

De acordo com dados atuais, pontua-se que a prevalência de doenças alérgicas em crianças e adultos jovens cresceu de maneira pontual nos últimos anos, e (AA) faz parte desse aumento. As alergias alimentares tornaram-se um grande problema de saúde pública no mundo nas últimas duas décadas e estão correlacionadas a um impacto negativo na qualidade de vida. (DE FREITAS; FERREIRA, 2022).

Com 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. Apesar da divergência quanto à tendência do aumento das AAs, trabalhos indicam que cerca de 35% das pessoas já relataram alguma reação adversa a algum alimento, apesar das AAs ocorrem entre 2 a 10% dos indivíduos no mundo e variarem com a idade (IWEALA *et al.*, 2018). Estima-se que a prevalência das AAs seja de 6 a 8% em crianças menores de três anos (DEVAS *et al.*, 2018), e cerca de 2 a 4% em adultos. 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, 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, levam 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 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). Nosso estudo visou buscar uma análise de instauração deste modelo frente a nova vigência do comitê de ética, usando um número menor de animais e com um controle mais efetivo dos animais controle e alérgico buscando confirmar o modelo desenhado pela pesquisadora Saldanha, para nossa pesquisa atual e futuras análises.

Dados literários corroboram com as afirmativas que nos moveram a presente pesquisa, isto é, embora se tenha maior conhecimento sobre as AAs na atualidade, o mecanismo como ela se manifesta é ainda muito pouco compreendido e isso fomenta a necessidade de

novas pesquisas que busquem elucidar tais mecanismo no intento de descobrir novas terapias ou modificações das existentes para uma melhoria dos quadros alérgicos, haja visto que a cada ano se amplia mais as demandas por tratamentos delas. Somado a isso, sabe-se que a AAs são bem mais comuns no grupo pediátrico do que nos adultos e possuem um impacto médico, financeiro e social considerável em crianças menores e suas famílias (DE FREITAS; FERREIRA, 2022).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer o modelo experimental de alergia alimentar ovalbumina, no Laboratório de Morfopatologia (UFOP), em camundongos da linhagem BALB/C e estudar as alterações histológicas no órgão linfoide de interesse - baço.

2.2 Objetivos específicos

Confirmar o estabelecimento do procedimento alergênico por meio de:

- avaliação de parâmetros morfológicos e clínicos;
- dosagem sérica de IGE;
- mudanças no perfil de células sanguíneas;
- no perfil sérico de mediadores ligados às alergias.

Avaliar a ocorrência de alterações histológicas no baço, órgão linfoide de interesse desta pesquisa.

3. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA

O objetivo desta pesquisa foi estabelecer um modelo para o estudo da alergia alimentar, um problema que se tornou cada vez mais prevalente a nível global e para o qual as terapias existentes nem sempre se comprovam eficazes. Este estudo, realizado no Laboratório de Morfopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto - LMP - UFOP, buscou treinar e validar esse modelo, servindo como base para futuras investigações tanto na graduação quanto na pós-graduação. Observadas as devidas análises realizadas no experimento, tem-se como campo de trabalho futuro possíveis estudos relacionados à busca por fórmulas naturais e o aproveitamento de medicamentos que possam ter efeitos anti-histamínicos, contribuindo assim para a redução dos sintomas e reações alérgicas aos alimentos. Buscou-se validar o modelo alergênico desenhado pela pesquisadora Saldanha frente as atualizações das diretrizes de normas éticas em pesquisa, ao trabalhar com um n amostral menor e com maior controle, através de um cálculo estatístico, avaliando a efetividade do modelo para futuras análises.

4. METODOLOGIA

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 para definição dos grupos experimentais

Para a realização da estimativa 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: $n = 1 + [2 \times 10,51 * (0,2/0,5)^2]$, $n = 1 + [21,02 * (0,4)^2]$, $n = 1 + [21,02 * 0,16]$, $n = 1 + 3,36$, $n = 5$ 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.

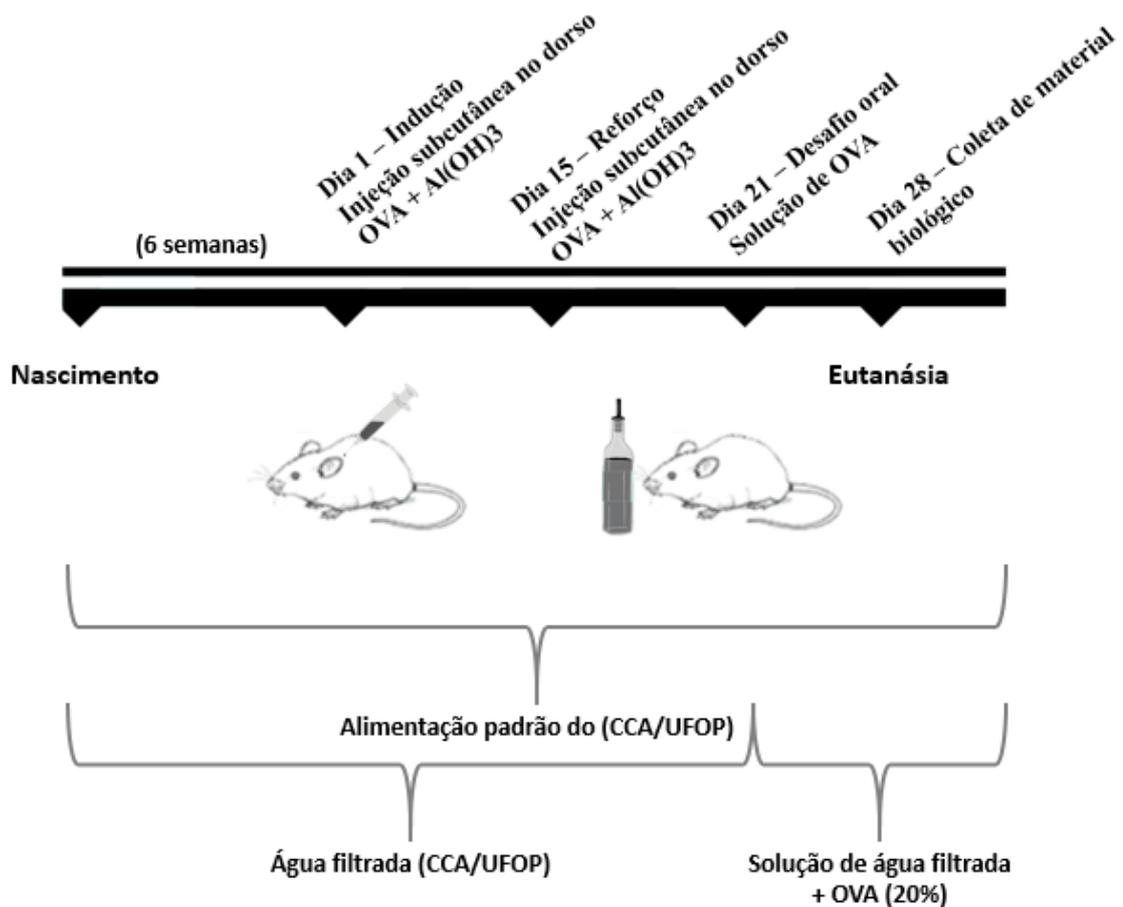


Figura 01: Modelo experimental para a indução da alergia Camundongos BALB/C. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

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

Para assegurar uma alimentação adequada dos animais, foi fornecida uma dieta padrão do Centro de Ciência Animal da UFOP, acompanhada de água sem restrições até o 20º dia do experimento. Posteriormente, a alimentação foi mantida sem restrições ao longo de todo o estudo. 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

Nesta etapa do estudo, estabeleceram-se os dias 07, 14, 21 e 28 como referenciais para a coleta das amostras sanguíneas através de punção caudal, com o objetivo de obter uma gota de sangue. Essa gota foi utilizada para a confecção de esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro. Após a secagem, as lâminas foram imediatamente fixadas e coradas utilizando a técnica do Panótico Rápido. Em seguida, foi realizada a contagem em microscopia óptica dos 100 primeiros leucócitos, utilizando a objetiva de 100x e uma técnica de visualização em "zig zag". Com base nessa contagem, foi determinado o percentual de cada tipo de leucócito, conforme 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 de quetamina e xilasina, sendo a quantidade da mesma calculada para a massa individual do animal no dia da eutanásia. Em necropsia, foram coletados o baço dos animais referidos. As porções do baço foram então fixadas em solução de formalina tamponada por pelo menos 72 horas. Após fixação, os tecidos foram processados para análises histopatológicas de rotina, emblocados em parafina e confeccionadas lâminas histológicas de, aproximadamente, quatro micrômetros.

Posterior a essa etapa, as lâminas foram desparafinadas e reidratadas seguindo o protocolo descrito no Manual de Procedimentos do LMP - UFOP, procedendo as colorações necessárias para as análises. As lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina para avaliação das lesões histológicas aparentes (SALDANHA *et al.*, 2004). Nessa etapa, focou-se nas análises das estruturas do baço – cápsulas, trabéculas e nódulos – na verificação de diferença no grupo Alergia e grupo Controle.

Para análise dos tecidos do baço utilizou-se o Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB, UFOP. Para tal, 7 imagens foram capturadas aleatoriamente, na objetiva de 10 x, de cada órgão por meio do uso do Sistema de captura digital Leica™ (Wetzlar, Alemanha). As medições foram realizadas por técnicas de morfometria digital, com a utilização do programa FIJI™ (NIH-USA).

4.6.1 Coloração em Hematoxilina e Eosina – HE

Em relação a coloração em HE dos tecidos do baço, utilizou-se também o protocolo descrito no Manual de Procedimentos do LMP da UFOP. Após a coloração, essas lâminas foram fotografadas no Laboratório Multiusuários 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 campal do baço.

Uma vez as referidas capturas de imagens estando prontas, iniciou-se a análise das estruturas de interesse, a saber: tamanho dos nódulos e espessura das trabéculas e cápsulas dos Grupos Alergia e Grupo Controle. Desta maneira, ao fim das análises 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.

4.7 Avaliações séricas

Ao final do protocolo de estabelecimento do modelo alergênico, em necropsia, o sangue periférico foi coletado. O soro foi obtido em centrifugação e 50 microlitros foram utilizados para quantificação de anticorpos IgE antiOVA pelo método de ELISA, descrito por Saldanha *et al.* (2004).

4.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram tabulados, incluindo a determinação das médias, medianas, desvios-padrão e erros, juntamente com os percentis. A normalidade dos dados foi avaliada através de dois testes estatísticos: o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Shapiro-Wilk, ambos com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados normais foram analisados utilizando o teste T de Student não paramétrico cuja significância estatística adotada foi de 5% ($p < 0,05$).

Para a análise do percentual de leucócitos, foi empregado o teste Exato de Fisher, com uma significância estatística estabelecida em 5% ($p < 0,05$). Este procedimento foi adotado para garantir uma avaliação robusta e abrangente da normalidade e do percentual de leucócitos nos dados obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No que concerne aos estudos imunológicos sabe-se que ele possui uma maturação ao longo do tempo de vida, estendendo-se desde a fase embrionária até a adolescência, na qual ele se torna mais similar ao de uma pessoa adulta devido às exposições corriqueiras a alérgenos e à criação de anticorpos ao longo desse período. Portanto, a fase mais crítica aos desenvolvimentos de AAs é o período neonatal, caracterizado por um período crítico de processos infecciosos, devido à imaturidade do sistema imunológico (PASTOTINO *et al.*, 2016).

Factualmente, sabe-se que em sua estrutura primordial, 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). Com isso, na busca de estabelecer um dado confirmatório com relação a esta torna-se importante a quantificação de tais granulócitos 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).

No intento de estabelecer um modelo de alergia para o referido estudo, o procedimento de sensibilização publicado por Saldanha *et al.* (2004), foi de fundamental importância visto que para os camundongos do grupo Alergia foi imprescindível o contato prévio com o antígeno, OVA. Mostrou-se muito relevante para a pesquisa e sua efetivação com o inóculo de interesse o uso 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), tracejando em sua abordagem que o complexo OVA-Al (OH)₃ contribui para que ocorra melhor interação com as células apresentadoras de antígeno - APCs. Tal adsorção do antígeno no alumínio desencadeia a interação com as células apresentadoras que ativam a resposta imune. Este processo é relatado como efeito causado principalmente pela alteração das características físicas dos adjuvantes a base de alumínio, tais alterações como carga elétrica, área da superfície, estrutura, entre outras (SHI *et al.*, 2001). Ressalta-se também que é preciso delinear o local de 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, normalmente usados em estudos. Mediante a esse fato, escolheu-se para a

sensibilização dos camundongos BALB/C a via subcutânea, pelos dados apresentados e uma opção metodológica nessa presente pesquisa.

Concernente a sensibilização prévia do grupo Alergia, observou-se também que a introdução do adjuvante levou a estabilização do 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. Fornecendo assim um padrão em que todos os animais do grupo Alergia obtivessem a mesma quantidade de antígeno inoculado.

Na elucidação do desenvolvimento e o estabelecimento do modelo de alergia alimentar, fez-se o acompanhamento dos camundongos da linhagem BALB/C nos parâmetros corpóreos e alimentares no decorrer do experimento, coletando-se as amostras para exames histológicos e bioquímicos. No término dessa etapa, com a devida mensuração da massa corpórea semanalmente, compilou-se os resultados extraídos na Figura 02.

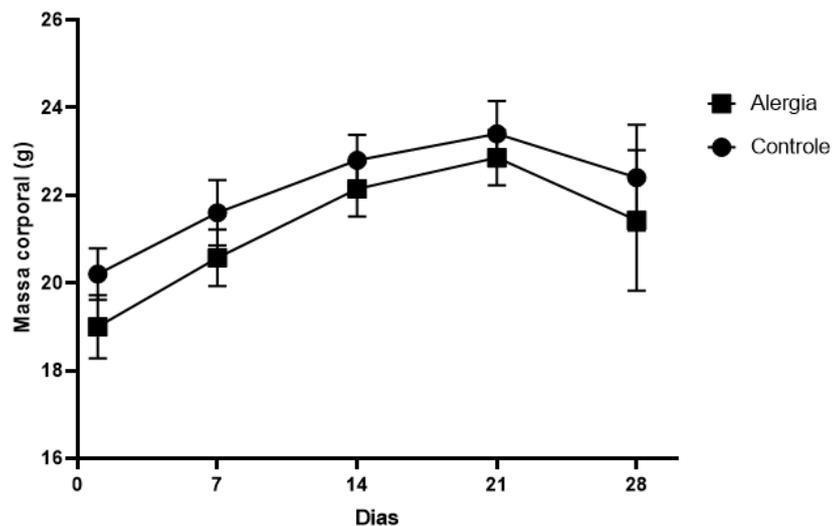


Figura 02: Gráfico do perfil da massa corporal dos camundongos ao longo do protocolo de 28 dias. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Observou-se no presente estudo que durante todo o tempo de experimento, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o Grupo Controle e Grupo Alergia. Ressalta-se que os animais desses dois grupos foram adquiridos em momentos distintos, sendo os mesmos divididos em três levas. Concerne aqui a apresentação de um dado relevante a abordagem: embora o protocolo alimentar e de sensibilização tenha sido idêntico para as três levas, o Grupo Alergia da última leva desenvolveu uma desidratação e debilitação maior, com o aumento expressivo de perda de massa. Diante desse fato, realizou-se uma interferência para mediar o sofrimento dos animais usados na presente pesquisa, mediante uma decisão em conjunto com

o veterinário do CCA. Com isso, buscou-se intercalar na dieta do dia 21 a 28 (do desafio oral a OVA) a mamadeira de solução de albumina com água, via oral, ao invés de somente solução de albumina como única fonte hídrica feitas nas duas levas anteriores, o que pode ter dado um viés na presente análise.

Mensurou-se o consumo alimentar e hídrico dos animais dos grupos Controle e Alérgico ao longo de todo o experimento e os dados foram relatados respectivamente nas figuras 02 e 03. Frente aos mesmos, nossa análise observou que não houve uma diferença significativa nos grupos com relação ao consumo de ração e hídrico. Contudo, a partir da segunda semana na qual foi realizado o primeiro desafio alérgico (OVA + Hidróxido de alumínio), no Grupo Alergia, nota-se uma diminuição significativa no consumo de ração, isso comparando com o consumo do primeiro ao 14º dia, de cada grupo separadamente.

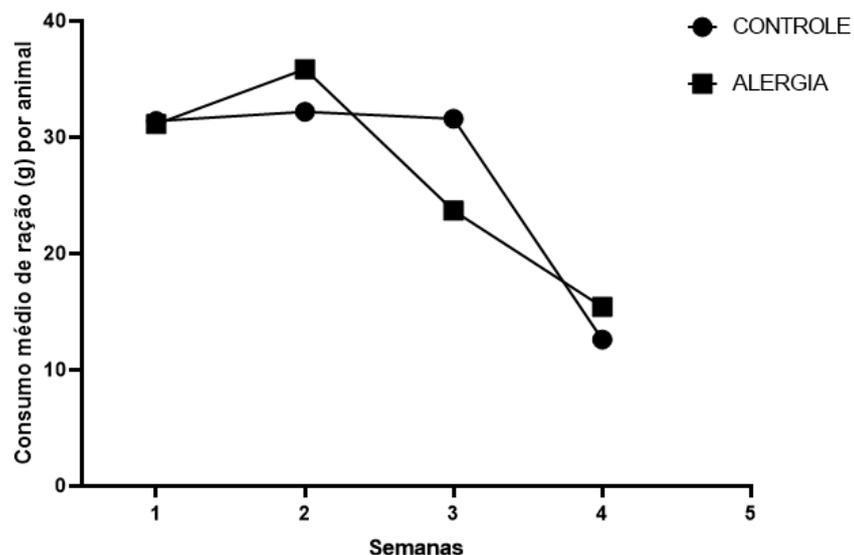


Figura 03: Gráfico do perfil de consumo médio de ração ao longo do protocolo de 28 dias. Teste T-Student.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo os dados relatados nos gráficos, observou-se que o consumo alimentar dos animais se manteve estável nas duas primeiras semanas de experimento. A partir da terceira semana de experimento, evidenciou-se que tanto o Grupo Controle quanto o Grupo Alergia, desafiados com a mamadeira de OVA, apresentaram um decréscimo no consumo de ração. Para devida comprovação desta hipótese, tornou-se preciso uma análise através das técnicas de imunoensaios. Sugere-se também a possibilidade de uma rejeição dietética à mamadeira de OVA, levando-os a um quadro de redução de massa visualizada em um processo de desnutrição, assim como ao estado de desidratação que foram vistos em animais do Grupo Alergia.

Evidenciando assim a importância frente a um novo experimento da realização de um período adaptativo da dietética desses animais.

O gráfico referente a figura 04, demonstra que o consumo de água do Grupo Alergia e do Grupo Controle apresentam uma linearidade na sua fase inicial. Contudo, após o desafio alergênico do Grupo Alegria, com a injeção de OVA + hidróxido de alumínio + salina 9%, observou-se uma progressiva queda no consumo de água desse grupo em relação ao Grupo Controle que recebeu a injeção contendo apenas hidróxido de alumínio + salina 9%. Destaca-se no gráfico que após o desafio alimentar com mamadeira de OVA, o Grupo Controle teve uma respectiva queda no consumo da mamadeira de OVA e o Grupo Alergia, que havia reduzido seu consumo de água, esse consumo nos últimos oito dias, do desafio oral da mamadeira de OVA, continuou em decréscimo significativo.

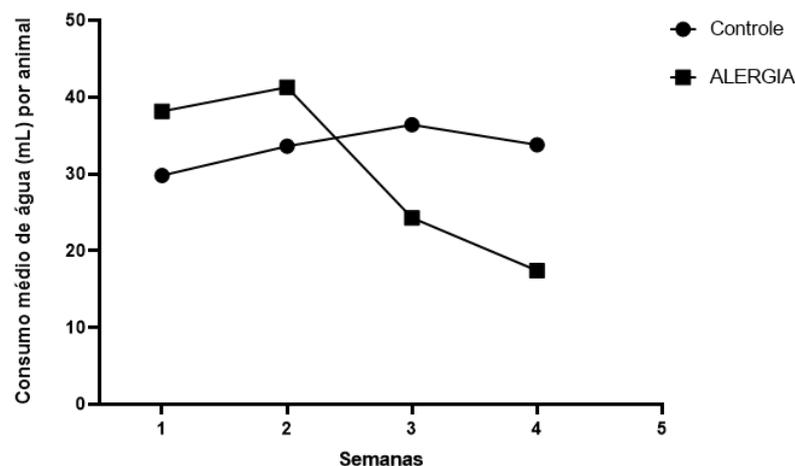


Figura 04: Gráfico do perfil de consumo médio de água e albumina ao longo do protocolo de 28 dias. Teste T-Student. **Fonte:** Elaborado pelo autor

Em relação à não ingestão da mamadeira de albumina, podemos relacionar esse dado aos estudos experimentais conduzidos por Bills *et al.* (2005), conforme citado por Dourado e Machado (2006). Esses estudos demonstraram que camundongos desenvolvem uma associação negativa entre um determinado sabor presente na dieta e uma experiência desagradável. Essa correlação do sabor do alimento com o desconforto resulta em um fenômeno conhecido como “Aversão condicionada ao sabor”. Como contorno a este problema sugere-se em futuras pesquisas a utilização do sistema de gavagem, administração intragástrica, para o alimento OVA. No experimento mencionado, os pesquisadores ilustraram esse fenômeno ao associar uma solução de sacarina a uma prévia exposição à injeção de cloreto de lítio. Embora

o desconforto tenha sido causado pela injeção de lítio, não pela sacarina em si, os animais passaram a rejeitar a ingestão da sacarina em futuras exposições devido à associação negativa com o fator causador do desconforto, a injeção de lítio.

5.1 Perfil leucocitário

Nas semanas consecutivas ao desenvolvimento 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.
^a – Dado representa 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, A. H. *et al.* 2013), nos dados obtidos no experimento observou-se um percentual aumentado de ambas as células inflamatórias no grupo alergia em correlação ao grupo controle. De tal forma que essa alteração do perfil sérico de células do sistema imunológico no sangue, representado no esfregaço sugere provável desenvolvimento de hipersensibilidade imediata nesses animais, que será confirmada posteriormente pelo imunoensaio, apresentado em materiais e métodos, através da quantificação de IgE.

Concernente a figura 5, notou-se uma mudança significativa de eosinófilos ($p < 0,05$), evidenciando um aumento suscetível a porcentagem numérica deles no decorrer do desenvolvimento do experimento. Observou-se essa mudança inicial no grupo alergia já na

primeira semana, em que esse já foi sensibilizado com o antígeno, albumina, no primeiro dia do experimento. De tal modo que o observado se correlaciona visivelmente com o aumento no percentual de eosinófilos de maneira 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.

Vale a pena detalhar que esse aumento de eosinófilos não ocorreu apenas em comparação com o Grupo Controle, observou-se também em comparação entre as quatro semanas do protocolo do mesmo grupo. Desta maneira, fica pontuado de maneira significativa a efetivação do experimento.

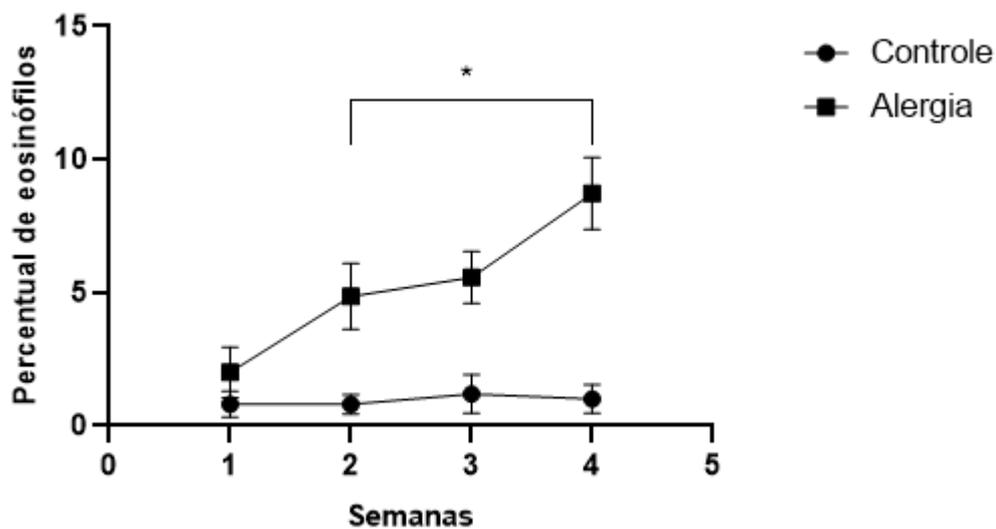


Figura 05: Gráfico do perfil de eosinófilos do grupo Controle e grupo Alergia ao longo do protocolo de 28 dias. O símbolo “*” indica a diferença entre os grupos. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, Teste *T-Student*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os gráficos apresentados na figura 06, figura 07 e figura 08, bem como as pranchas expressas na figura 09 e figura 10, dizem respeito à avaliação campal das áreas estruturais do baço, respectivamente nódulos, trabéculas e cápsulas. Nas avaliações pontuadas para a pesquisa das estruturas, os achados no estudo evidenciaram que não houve uma variação significativa nas avaliações comparativas do Grupo Controle em relação ao Grupo Alergia, por mais que já tenha sido previamente relatado que as respostas imunes esplênicas desempenham papéis centrais no desenvolvimento de doenças alérgicas. (TOYOSHIMA, SHOTA *et al.* 2017).

Dessa forma para estudos futuros torna-se pertinente avaliar o uso de uma outra técnica de coloração como Azul de Toluidina, para validar e quantificar a presença de mastócitos nos tecidos. Uma vez que o baço é o local onde os mastócitos são induzidos no desenvolvimento da alergia alimentar (TOYOSHIMA, SHOTA *et al.* 2017).

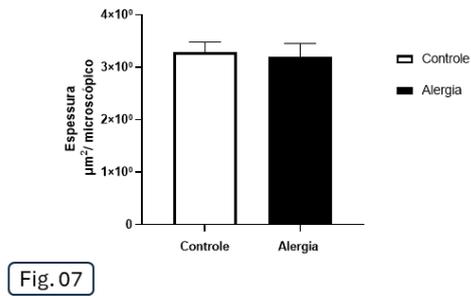
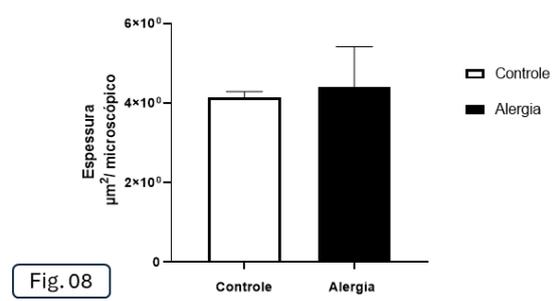
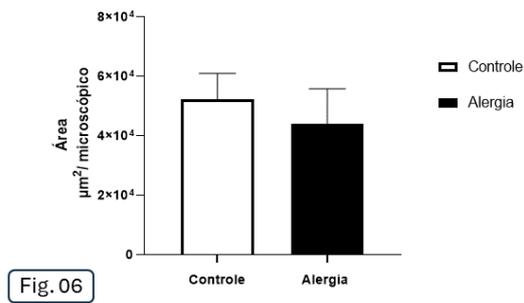


Figura 06: Gráfico da correlação analítica de mensurações realizadas nas estruturas nodais por μm^2 em objetiva de 10x, Grupo Controle e Grupo Alergia. Os dados são expressos em média \pm erro padrão, teste T não pareado.

Figura 07: Gráfico da correlação analítica de mensurações realizadas nas estruturas da trabécula por μm^2 em objetiva de 10x, Grupo Controle e Grupo Alergia. **Figura 08:** Gráfico da correlação analítica de mensurações realizadas nas estruturas da cápsula por μm^2 em objetiva de 10x, do Grupo Controle e Grupo Alergia.

Fonte: Elaborado pelo autor.

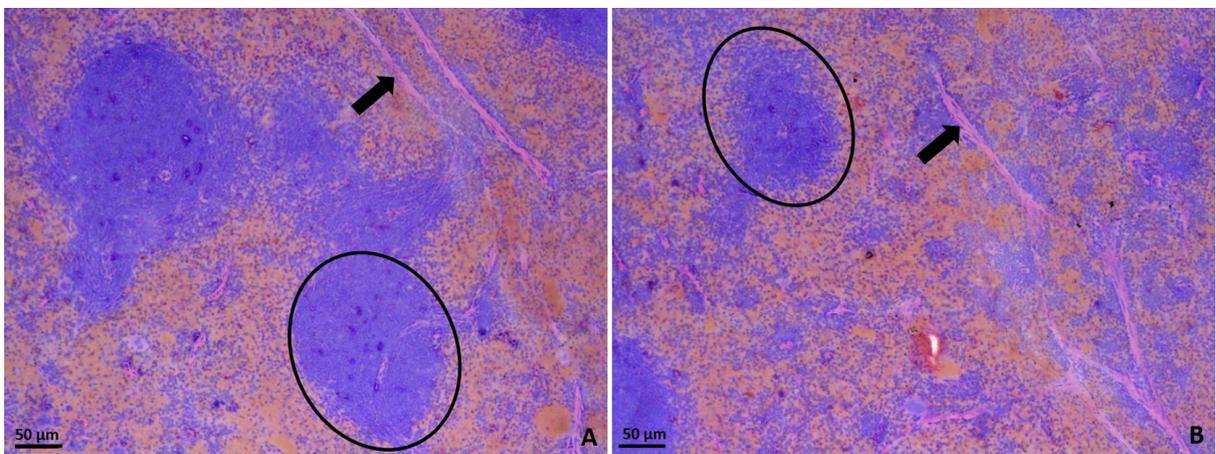


Figura 09: Cortes histológicos representativos do baço do Grupo Controle (A) e do Grupo Alergia (B). As áreas dos nódulos (μm^2) estão "indicadas pelas circunferências" e as trabéculas "indicadas pelas setas" de ambos os grupos, ao longo do protocolo de 28 dias. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

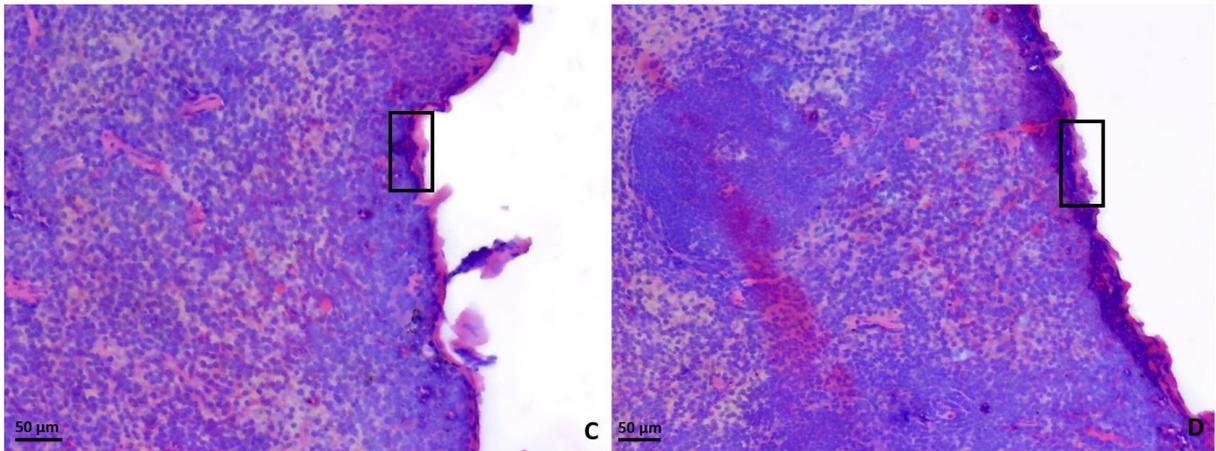


Figura 10: Cortes histológicas representativas do baço do grupo controle (C) e do grupo alergia (D). As áreas das cápsulas (μm^2) estão "indicadas pelos retângulos" de ambos os grupos, ao longo do protocolo de 28 dias. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Dada a necessidade identificada de analisar a presença de IgE nos grupos estudados para verificar se a rejeição alimentar está vinculada apenas a um desconforto gastrointestinal ou se ocorre devido a um quadro alérgico estabelecido que os debilita, buscou-se neste estudo realizar a dosagem de IgE. Essa abordagem lançou uma luz mais criteriosa sobre nossas afirmações em relação à queda na ingestão alimentar, investigando se está exclusivamente associada a esse desconforto ou se está relacionada a uma alergia, que procuramos identificar com a OVA. Essa análise visa elucidar o mecanismo pelo qual os animais desenvolveram aversão ao alimento oferecido.

A imunoglobulina E é compreendida como uma classe de anticorpos (proteínas do sistema imunológico) encontrada no sangue. Tendo em vista que ela desempenha um papel fundamental na resposta do sistema imunológico a alérgenos e está intimamente associada a respostas alérgicas e hipersensibilidade, mediando as reações alérgicas frente à exposição a um alérgeno, ao ligar-se a receptores na superfície de células chamadas mastócitos e basófilos, que estão envolvidos nas reações alérgicas. Esse tipo de reação ocorre quando proteínas alimentares desencadeiam inadequadamente uma resposta Th2 predominante, resultando em uma alergia alimentar mediada por IgE, também classificada como hipersensibilidade do tipo I (TURNBULL, Adams *et al.* 2015).

Para quantificar a concentração de IgE nas amostras de soro obtidas do Grupo Controle e do Grupo Alergia, inicialmente realizou-se a diluição das amostras na proporção de 1:10.000. Posteriormente, a placa do kit ELISA foi lida no aparelho de espectrofotometria, na linha visível do UV a 450 nm. Os dados obtidos foram então tabulados e utilizados para análise estatística por meio do programa GraphPad Prism 8.0. Contudo, observou-se uma discrepância

nos dados que sugeriam uma queda na concentração de IgE nos animais do Grupo Alergia com relação ao Grupo Controle, o que seria improvável pelos dados encontrados na literatura.

Embora os dados tenham resultados numa concentração de IgE diminuído no Grupo Alergia, e sendo esse um biomarcador importante e que se apresentaria numa concentração maior que o Grupo Controle, dados literários sugerem que as abordagens em estudos de IgE mensurados em desafios alérgenos sustentam a necessidade de busca por uma IgE específica. Mediante a isso, nossa hipótese discursiva é de que o teste de IgE não específica (sIgE) não consegue distinguir entre um indivíduo que é meramente sensibilizado ao alérgeno (tem sIgE circulante detectável) e um que é clinicamente alérgico (tem IgE ligada aos mastócitos levando à liberação imediata do mediador) (TURNBULL, Adams *et al.* 2015). Desta forma, como nosso estudo não buscou evidenciar uma IgE específica, pode ter ocorrido o desfecho encontrado na análise pontuando, para futuros estudos, que uma análise direcionada a sIgE evidenciou-se como pertinente.

Outro dado hipotético importante, levantado nessa diferença observadas, estabelece-se numa possibilidade de se perder os picos de concentrações importantes para a análise na leitura espectrofotométrica - erro provável advindo de uma diluição maior do que a necessária para a leitura no equipamento; e considerando que, segundo dados literários, a diluição é uma etapa crítica na preparação da amostra, erros eventuais na preparação das soluções de amostra ou em suas diluições podem caracterizar concentrações de amostra incorretas, resultando em valores de absorvância semelhantes para ambos os grupos ou discrepantes. As diferenças em variáveis experimentais no momento da medida do branco, da amostra e dos padrões também podem invalidar uma calibração estabelecida (SKOOG *et al.*; 2005).

Uma vez que os dados amostrais obtidos demonstraram uma diferença nas concentrações de IgE conforme objetivo adotado frente a literatura disponível, ainda que os valores de IgE observados em maiores concentrações no Grupo Controle quando comparado ao Grupo Alergia, tornou-se pertinente a realização de uma nova análise, porém em uma diluição menor para a qual adotamos a diluição na proporção 1:100. Isso se justifica pela observação de que, em análises de espectrofotometria para determinar a concentração de IgE ou qualquer outra substância, quando se tem dois grupos com dados de absorvância muito próximos, isso pode ser indicativo de erros na diluição ou em outros aspectos da preparação da amostra. Frente a isso, nessa nova análise da leitura espectrofotométrica, observou-se que a diluição escolhida conferiu à nossa análise um resultado mais preciso, e os dados corroboram com o esperado em

uma averiguação confirmatória sorológica de IgE no Grupo Controle em relação ao Grupo Alergia, como expresso na figura 11 e tabulado no gráfico expresso na figura 12.

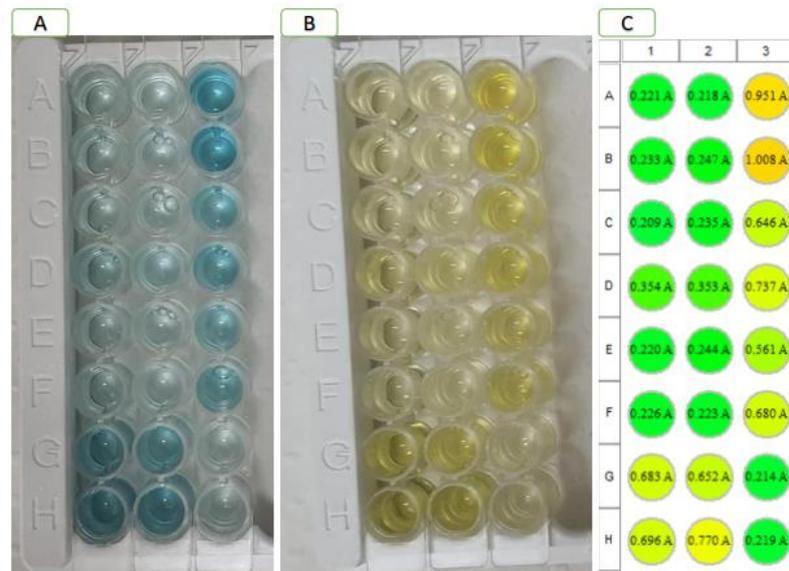


Figura 11: Amostras sensibilizadas foram preparadas com suas respectivas diluições, além do branco, utilizando uma solução de reação (A). Da mesma forma, amostras diluídas e sensibilizadas, juntamente com as respectivas diluições e o branco, foram tratadas com uma solução de parada de reação (B). Leitura das respectivas absorvâncias para análise (C). **Fonte:** Elaborada pelo autor.

No gráfico, Figura 12, apresenta-se os dados relacionados às absorvâncias obtidas no teste ELISA na diluição 1:100 adotada, utilizando o espectrofotômetro UV calibrado para a linha visível a 450 nm. Nele observa-se um aumento significativo nas concentrações de IgE no grupo Alergia em comparação com o Grupo Controle. Esse aumento é confirmado pelo valor de $p < 0,05$, considerado como índice de significância na análise estatística deste estudo, indicando o estabelecimento de um quadro alérgico.

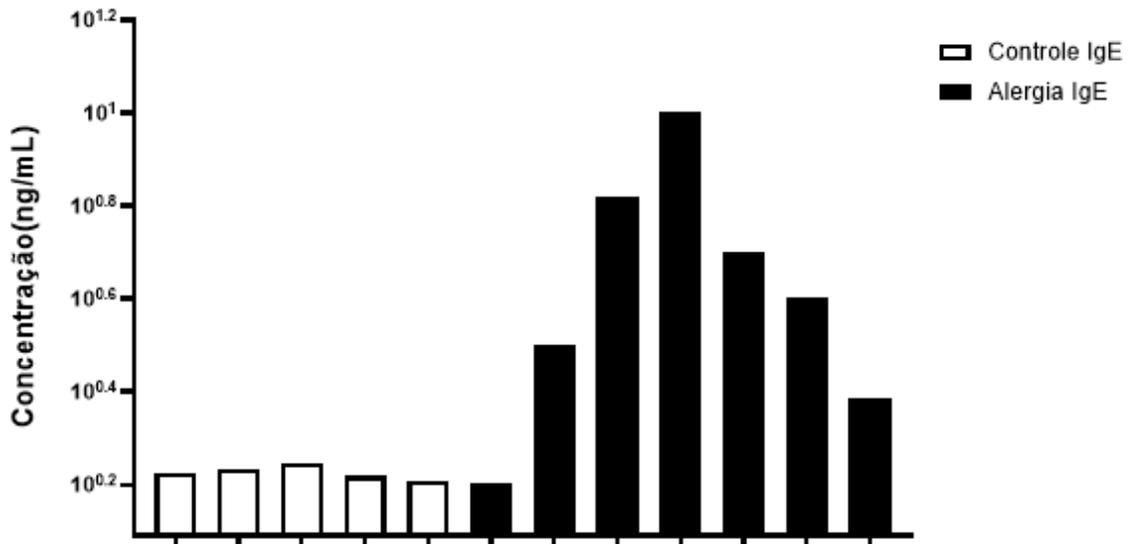


Figura 12. Gráfico da concentração média de imunoglobulina E - IgE do Grupo Controle e Grupo Alergia após o imunoenensaio ELISA, destacando o aumento de IgE nos animais do Grupo Alergia. O soro foi coletado, sem anticoagulante, no último dia do protocolo de 28 dias, antes da eutanásia. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Dessa forma, podemos concluir que as absorvâncias obtidas no Grupo Controle e Grupo Alergia, durante a análise de IgE no soro dos animais, foram bem-sucedidas. Esses resultados não apenas corroboram, de maneira pontual, os objetivos do presente estudo, mas também fornecem uma confirmação sólida do aumento na presença de IgE no Grupo Alergia.

Na análise dos dados observamos uma elevação significativa nas concentrações de IgE no Grupo Alergia em comparação com o Grupo Controle, o que fortalece a associação entre a presença dessa imunoglobulina e a condição alérgica nos animais estudados. Essa confirmação reforça a relevância da nossa pesquisa na compreensão dos mecanismos imunológicos subjacentes às reações alérgicas.

Para a análise estatística, os dados foram submetidos a dois testes com o objetivo de verificar sua normalidade: o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Shapiro-Wilk. No teste de Kolmogorov-Smirnov, a hipótese nula, que assume uma distribuição normal dos dados, foi aceita, pois o valor-p obtido (0,1) foi superior ao nível de significância (0,05). Da mesma forma, no teste de Shapiro-Wilk, a hipótese nula também foi aceita, visto que o valor-p obtido (0,8) foi superior ao nível de significância (0,05). Diante dos resultados encontrados, conclui-se que os dados seguem uma distribuição normal, e nossa análise foi efetivada com sucesso.

6. CONCLUSÕES

Diante das análises e discussões apresentadas neste trabalho do desenvolvimento de alergia alimentar, podemos concluir que:

- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à massa corporal e ao consumo médio de ração e água no Grupo Controle em comparação com o Grupo Alergia.
- Observou-se no Grupo Alergia uma alteração no perfil leucocitário, caracterizada por linfocitose e neutropenia, em comparação com o Grupo Controle.
- Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas análises histológicas do baço – cápsulas, nódulos e trabéculas - entre o Grupo Alergia e o Grupo Controle.
- Evidenciou-se um aumento significativo nas concentrações de Imunoglobulina E (IgE) nos animais alérgicos em comparação com os animais controle.

REFERÊNCIAS

- ANVARI, S. *et al.* IgE-Mediated food allergy. *Clin Rev Allergy Immunol*, v. 57, n. 2, p. 244-260, oct. 2019.
- DE FREITAS, Anna Carolina Carvalho; FERREIRA, Pollyanna Ayub. The impact of food allergy on human health: a literature review. 2022.)
- DE SOUSA BARBOSA, Brenna *et al.* Perfil hematológico e bioquímico de camundongos da linhagem Balb-c. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 45, p. 3, 2017.
- DEVADAS, J. M. *et al.* Allergy in children: an overview. *Indian J Pediatr*, v. 85, n. 5, p. 369-374, may 2018.
- HAUSMANN, O. *et al.* Drug hypersensitivity reactions involving skin. *Exp Pharmacol.*, v. 196, p. 29-55, 2010.
- IWEALA, O. I. *et al.* Food allergy. *Curr. Gastroenterol Rep.*, v. 20, n. 5, p. 17, apr. 5 2018.
- LICHTMAN, A. H. *et al.* Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, vol. 4, pp. 270-539, 2013.
- MARTINS, L. E.; REIS, V. M. Immunopathology of allergic contact dermatitis. *An. Bras. Dermatol.*, v. 86, n. 3, p. 419-433, may/jun. 2011.
- 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.
- PASTOTINO, Antonio Carlos; JACOB, Cristina Miuki Abe; DORNA, Mayra de Barros. Knowing the child's immune system. In: RULLO, Veras Esteves Vagnozzi; ROXO JUNIOR, Pérsio; VILELA, Maria Marluce dos Santos (Org.). Update on Pediatric Allergy and Immunology: São Paulo Pediatrics Society. São Paulo: Atheneu, 2016. Chapter 1. p. 24-34.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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

SHI, Yi et al. Detoxification of endotoxin by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine*, v. 19, n. 13-14, p. 1747-1752, 2001.

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.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F. *Fundamentos de química analítica*. 8° ed. p 179.

Turnbull, J. L., H. N. Adams and D. A. Gorard (2015). "Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances." *Aliment Pharmacol Ther* 41(1): 3- 25.

TOYOSHIMA, Shota et al. The spleen is the site where mast cells are induced in the development of food allergy. *International Immunology*, v. 29, n. 1, p. 31-45, jan. 2017.

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.