



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE NUTRIÇÃO

**EFEITO DO ÔMEGA-3 NA ALERGIA ALIMENTAR EM
CAMUNDONGOS, MODELO DE CURTO PRAZO EXPERIMENTAL**

Autora: Larissa Fernanda Melo Vasconcelos

Orientadora: Tatiana Karla dos Santos Borges

Brasília, 2012.

RESUMO

O papel dos ácidos graxos poli-insaturados sobre o sistema imune tem sido estudado nos últimos anos com o objetivo de elucidar a dinâmica dos eicosanoides derivados dos ácidos graxos da família ômega-3, os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA), na modulação das respostas alérgicas. Os interesses atuais giram em torno dos ácidos graxos ômega-3, uma vez que estes podem atuar como inibidores da síntese dos mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico, pertencente à família ômega-6. Neste trabalho foi investigado o efeito da suplementação dietética com ômega-3 (fonte de óleo de peixe) em um modelo experimental de alergia alimentar de curto prazo. Os camundongos, fêmeas da linhagem C57BL/6 foram sensibilizados ou não com injeção intraperitoneal com 10µg ovalbumina acrescida de hidróxido de alumínio e salina. Os animais foram divididos em quatro grupos cada um com cinco animais, os animais teste alérgicos foram alimentados com a dieta acrescida de 14% de ovalbumina para induzir o processo anafilático em seguida foram tratados com uma dieta regular enriquecida com 10% de óleo de peixe para o grupo de animais teste e controle durante sete dias consecutivos. Os demais grupos receberam apenas ração padrão. Os camundongos do grupo alérgico teste e os animais controles que receberam ração acrescida com ômega-3 apresentaram níveis séricos aumentados de neutrófilos, monócitos e linfócitos, em comparação com os animais alérgicos e controles que receberam apenas ração padrão. No entanto, quando avaliados os animais alérgicos tratados ou não com ômega-3 foi possível observar que a mediana de leucócitos foi maior nos animais que não receberam ração acrescida com ômega-3. Os resultados encontrados indicam que o óleo de peixe pode influenciar em determinados parâmetros hematológicos como na concentração leucocitária. Dessa forma, embora a literatura esteja repleta de estudos inconsistentes, é possível que os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 possam afetar a função da maioria das células imunes, além das contagens hematológicas. Pois como elucidado nesse estudo, a ingestão alimentar deste tipo de ácido graxo modula uma série de eventos envolvidos nos processos alérgicos.

Palavras-chave: ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3, eicosanoides, inflamação alérgica, alergia alimentar.

ABSTRACT

The function of polyunsaturated fatty acids in the immune system has been studied in last years with the purpose of elucidate the dynamics of eicosanoids derived from fatty acids of omega-3 acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic (DHA), in modulation of allergic inflammatory responses. The present concerns revolve around the omega-3, since they can act as inhibitors of the synthesis of inflammatory mediators derived from arachidonic acid, belonging to the omega-6. In this work it was investigated the effect of dietary supplementation with omega-3 (source of fish oil) in an experimental model of short period in food allergy. The mice, female C57BL / 6 were sensitized or not with intraperitoneal injection with 10mg ovalbumin plus aluminum hydroxide and saline. The test animals were fed with the allergenic diet supplemented with 14% albumin to induce anaphylactic process then treated with a regular diet supplemented with 10% fish oil for the group of test and control animals for seven consecutive days. The other groups received only standard chow. Mice in group allergic test and control animals fed diets with added omega-3 exhibited increased in blood levels of neutrophils, monocytes and lymphocytes, in comparison with the allergic animals and controls which received only standard chow. However, when evaluated by the allergic animals treated or not with omega-3 were observed that the average number of leukocytes was higher in animals that don't received a diet with increased omega-3. The results was found it indicate that fish oil can influence hematological parameters in the concentration of leukocytes. In this way, although the literature is replete with inconsistent studies, it is possible that the fatty acids polyunsaturated omega-3 might affect the function of most immune cell, and the blood counts. For as elucidated in this study, the dietary intake of such fatty acid modulates a series of events involved in allergic processes.

Keywords: poly-unsaturated fatty acids, omega-3, eicosanoids, allergic inflammation, food allergy.

1. INTRODUÇÃO

Alergia alimentar foi definida como uma resposta imune exacerbada a proteínas alimentares, absorvidas através da mucosa intestinal permeável (TEIXEIRA, 2010). A prevalência deste grupo de alergia é de 20 a 30% na população dos países desenvolvidos e de 2 a 8% nas crianças e menos de 2% nos adultos dos países ocidentais, sendo, atualmente reconhecida como uma epidemia a nível mundial, representando assim, um grande problema de saúde (ARAUJO et al., 2008).

Os mecanismos imunológicos participantes dos processos alérgicos envolvem reações de hipersensibilidade imediatas e de fase tardia, a primeira é mediada por anticorpo imunoglobulina E (IgE) e mastócitos, e é marcada por respostas vasculares e dos músculos lisos aos mediadores imunológicos. Já a segunda, de fase tardia, se caracteriza por recrutamento de leucócitos e inflamação (ABBAS et al., 2011)

Nesse sentido, é importante referir que as reações de hipersensibilidade imediata, podem ser uma das causas mais comuns de anafilaxia, que apesar de rara, pode ser fatal. Essa se caracteriza por uma reação sistêmica mediada por anticorpos IgE, e pode ocorrer nos primeiros minutos ou até algumas horas após a ingestão do alimento responsável. Nesta condição, além das manifestações clínicas habituais de uma reação mediada por anticorpos IgE, o paciente pode apresentar anormalidades cardiocirculatórias entre as quais hipotensão arterial, arritmias cardíacas e choque (LOPEZ et al., 2003).

Sendo assim, conhecer os mecanismos que controlam a patogênese das alergias alimentares é importante para o estabelecimento de novas condutas terapêuticas para o seu tratamento e para sua melhor condução. Entre as terapêuticas, alguns nutrientes aparecem como potenciais adjuvantes terapêuticos visto que podem afetar o sistema imunológico. Como por exemplo, os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, pois nos processos alérgicos ocorre a produção de mediadores lipídicos e os eicosanóides que possuem vários efeitos sobre os vasos, o músculo liso, os brônquios e os leucócitos (KELEY, 2001).

O principal mediador lipídico participante das reações alérgicas são eicosanóides derivados dos ácidos graxos da família ômega 6, principalmente do ácido araquidônico (AA) encontrados nos óleos vegetais. Esses eicosanóides, dentre outras funções, aumentam a expressão endotelial de moléculas de adesão e a infiltração de leucócitos exacerbando as respostas inflamatórias. Em contrapartida, os ácidos graxos da família ω -3 (encontrados principalmente nos peixes, linhaça e canola) também favorecem a produção desses

eicosanoides, porém em formas menos reativas favorecendo uma resposta anti-inflamatória (MADUREIRA, 2008). Dessa forma, a deficiência, o desequilibrado aporte, assim como a qualidade das gorduras presentes na dieta, compromete a estabilidade do sistema imune (KELEY, 2001). E por isso, é importante inserir gorduras, como ácidos graxos ω -6 e ω -3, de maneira equilibrada na dieta.

Contudo, estudar os possíveis efeitos dos nutrientes sobre a resposta imune em humanos é difícil, pois, muitos fatores podem comprometer o estudo como o controle da ingesta de alimentos quanto ao tipo, qualidade e quantidade. Além disso, o estresse, a quantidade de exposições a doses de antígenos, o uso de medicamentos nos períodos de crise podem influenciar a resposta imunológica e interferir nos resultados do estudo. Diferentes dos humanos esses processos podem ser melhor controlados em estudos com animais, por isso, esta pesquisa avaliou o efeito imunomodulador do ω -3 em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com alergia alimentar induzida contra a ovalbumina.

2. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a influência do ômega 3 sobre a alergia alimentar induzida contra a ovalbumina em camundongos C57BL/6, com dieta suplementada com óleo de peixe.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência do ômega 3 proveniente do óleo de peixe na contagem total de leucócitos, em camundongos C57BL/6 sensibilizados contra a ovalbumina.

Verificar a influência do ômega 3 proveniente do óleo de peixe na contagem diferencial de leucócitos, em camundongos C57BL/6 sensibilizados contra a ovalbumina.

Comparar estes resultados com aspectos clínicos como edema e ganho de peso.

4. JUSTIFICATIVA

A alergia alimentar é um sério problema de saúde pública (NOWAK-WEGRZYN, 2007). Dados referentes ao ano de 2009, por exemplo, citam que a alergia alimentar afeta um percentual de 3% a 4% da população mundial de adultos e de até 6% das crianças e esta prevalência está aumentando (SICHERER; SAMPSON, 2009). Sendo assim, as alergias alimentares possuem um impacto médico, financeiro e social considerável em crianças menores e suas famílias (SEIDMAN, 2003; TRONCONE, 2004).

Diante desse quadro epidemiológico, existem atualmente muitas substâncias disponíveis para o tratamento das alergias, como por exemplo, os agentes antihistamínicos, antialérgicos e corticoides. No entanto, estes fármacos apresentam efeitos colaterais e reações adversas indesejáveis como sonolência, dor de cabeça, distúrbio do trato gastrointestinal, fadiga e xerostomia. Por esse motivo, surgiu a necessidade de investigar a existência de compostos naturais para o tratamento da alergia. E recentemente, tem-se verificado que alguns alimentos possuem nutrientes com funções de defesa relacionada ao sistema imune (CHOI et al., 2004).

Em meio a essa nova perspectiva foi descoberto que uma baixa ingestão de ômega 3 pode trazer importantes consequências sobre a saúde da população, por possuírem efeitos significativos na modulação do sistema imunológico, por isso, as autoridades de saúde e alimentação, recomendam aumentar a ingestão destes nutrientes, seja pelas vias convencionais, tais como o aumento do consumo de sementes vegetais ou de produtos marinhos (principalmente peixes), ou através do desenvolvimento e consumo de alimentos enriquecidos com estes ácidos graxos (MARTINS, 2007).

Assim, o descobrimento de produtos naturais ativos como o ácido graxo ômega-3 pode representar um importante avanço no tratamento da doença, pois são ricos em componentes imunomoduladores que contribuem para a saúde e o bem-estar da população, além de não apresentarem os efeitos colaterais descritos (TEWTRAKUL, 2006).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho somente teve início após a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa do Centro Universitário de Brasília-UniCEUB sob o número 354/11, e foi desenvolvido sem qualquer relação com os laboratórios fornecedores dos reagentes utilizados. Seguiu conforme fluxograma em apêndice I.

Os procedimentos foram realizados nos Laboratórios de Ciências da Saúde (LABOCIEN) da Faculdade de Ciências da Saúde do UniCEUB. As análises imunológicas fizeram parte do estágio de imunologia do curso de Biomedicina do UniCEUB, e o preparo dos *pallets* de ração foram supervisionados durante o estágio do curso de Biologia do UniCEUB e foram efetuados pela aluna pesquisadora. Em todos os procedimentos com os animais, materiais biológicos, reagentes e equipamentos foram utilizados materiais de proteção individual, como luvas e jalecos sempre seguindo as instruções da norma regulamentadora NR-6 do Ministério do Trabalho e também as regras de segurança estabelecidas pelo LABOCIEN.

O estudo avaliou a produção total e diferencial de leucócitos pela contagem de neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos contidas no sangue dos camundongos tanto do grupo controle como teste.

5.1. Animais

Foram utilizados 20 camundongos C57Bl/6, fêmeas, de 2 meses de idade, os animais foram separados em grupo teste e controle. Foram utilizadas fêmeas por serem mais comumente utilizadas em pesquisas, particularmente pela característica de convívio mais dócil e de fácil manipulação, o que facilita a realização das pesquisas em laboratório. Quanto à idade, a maioria dos protocolos de asma aguda são realizados com animais adultos.

O grupo controle foi subdividido em 3 subgrupos cada um com cinco animais: o subgrupo (Con) foi composto por animais não alérgicos que receberam ração padrão; subgrupo (Ome) com camundongos que não tiveram alergia alimentar induzida e receberam ração enriquecida com ômega 3 proveniente do óleo de peixe; e o subgrupo (Ale) com animais alérgicos que receberam ração padrão. O grupo teste foi composto por somente um grupo, sendo ele denominado (Ale+Ome), este grupo foi composto por 5 camundongos com

alergia alimentar induzida e foram tratados com ração acrescida com ômega 3 proveniente do óleo de peixe.

Os camundongos C57BL/6 foram fornecidos pelo biotério do UniCEUB, e durante todo experimento foram mantidos em gaiolas com maravalha limpa, com água e ração específica para cada grupo, sob condições de temperatura e luz controladas e com o mínimo de ruído.

Todos os animais tiveram suas caudas marcadas com caneta retrojetora, para a identificação dos mesmos, uma vez que em cada caixa foram acolhidos 5 animais. A numeração partiu de zero (0) animal sem marcação á quatro (4) animal com quatro marcações na cauda. Para a correta identificação dos animais durante todo o experimento, foi necessário o reforço das marcações duas vezes por semana, toda segunda e sexta-feira.

Existem inúmeras justificativas relacionadas ao uso do modelo murino, bem como de outros modelos, em pesquisa biomédica. A mais importante delas está relacionada às considerações éticas, que limitam a realização de alguns estudos em humanos, em situações que necessitam de procedimentos mais invasivos e quando não existe conhecimento prévio da eficácia e toxicidade *in vivo* das substâncias testadas (FILKELMAN; KARP, 2008).

Outro aspecto importante que deve ser mencionado é a escolha da linhagem para estudos com sensibilização a um alérgeno. Os camundongos do tipo BALB/c, linhagem mais utilizada em estudos de asma, produzem níveis elevados de anticorpos IgE contra ovalbumina (OVA), além de maiores concentrações de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) no lavado broncoalveolar e de peritônio, quando comparados, por exemplo, com animais da linhagem C57BL/6 (KUMAR, 2008). No entanto optou-se pelo uso da linhagem C57BL/6 devido a não existência de animais BALB/c para serem utilizados nesta pesquisa.

5.2. Indução da alergia e tratamento

Os 5 animais do grupo teste e um grupo de 5 camundongos controles tiveram a alergia alimentar induzida (dia 0) por injeção intraperitoneal com ovalbumina (OVA) 10µg acrescido do adjuvante hidróxido de alumínio (1mg) em salina (0,2ml). Após 14 dias (dia 14) foi feita uma nova indução com a injeção intraperitoneal com as mesmas quantidades de OVA, Hidróxido de alumínio e salina, usados na primeira indução, e foi realizada nos mesmos grupos de animais. Enquanto isso os demais animais receberam apenas salina tanto no dia 0 como no dia 14 (SALDANHA, 2004; DOURADO, 2006; REIS, 2007; MOLLICA, 2011; MATOS et al., 2012).

Depois de 7 dias (dia 21), os animais teste receberam uma ração balanceada à base de ovalbumina (OVA) a 14% para o desafio alérgico durante dois dias consecutivos (dia 21 e 22). Sendo que os animais alérgicos do grupo controle (Ale) passaram pelo mesmo procedimento de sensibilização que os animais alérgicos teste (Ale+Ome), porém, não receberam OVA nos dias 21 e 22. Dois dias após (dia 23), foi verificado em todos os animais alérgicos (Ale e Ale+Ome), por meio do teste alérgico cutâneo para ovalbumina, se os mesmos estavam alérgicos. O teste foi positivo e a fase de tratamento foi iniciada, nesta, os camundongos teste e controles dos subgrupos Ome e Ale+Ome receberam a ração enriquecida com óleo de peixe durante sete dias. Depois deste período os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂.

Para o desafio alérgico foi utilizado como alérgeno a ovalbumina (OVA) que é o antígeno mais popular na pesquisa de asma em camundongos, por se tratar de uma substância disponível comercialmente, de fácil manipulação e com a qual o camundongo de laboratório não tem contato ambiental (GUALDI et al., 2010).

A OVA é a principal proteína encontrada na clara do ovo (cerca de 60% do conteúdo proteico), fazendo parte da superfamília das serpinas. Sua função ainda é desconhecida, embora se acredite que ela funcione como um armazenamento protéico (HUNTINGTON; STEIN, 2001). Sendo assim a OVA é uma proteína muito importante em pesquisa, particularmente em imunologia (GUALDI et al., 2010).

Como adjuvante foi utilizado o hidróxido de alumínio, pois esse promove uma ativação intensa da resposta Th2, quando o sistema imune é exposto a um antígeno (BREWER et al., 1999). O uso de hidróxido de alumínio em modelos de resposta pulmonar alérgica em murinos é constante na metodologia das publicações.

5.3 Dieta

O estudo iniciou com a ração padrão por 21 dias, dia 0 ao dia 21, período até o dia do desafio alérgico, para o qual a ração padrão foi substituída pela ração enriquecida com ovalbumina a 14% para o grupo teste alérgico (Ale+Ome). A ração padrão também foi oferecida até o dia de início da fase de tratamento para todos os animais dos grupos controle e teste (Con, Ome e Ale), e ainda foi fornecida até o fim do experimento para o grupo de 5 animais alérgicos (Ale), e os 5 não alérgicos controles (Con), que não receberam ração

enriquecida com ω -3 durante o experimento. Somando um total de aproximadamente 5.000g de ração padrão, considerando que cada camundongo consome em média 8g de ração por dia.

As proporções da ração padrão (R1) foram: 85% de ração padrão comercial triturada, 15% de polvilho doce e 5.000ml de água destilada. Esta foi submetida a desidratação em estufa à 65°C por 24h.

A ração dois (R2) que foi utilizada para o desafio alérgico com ovalbumina (OVA) foi oferecida a 5 camundongos alérgicos do grupo teste (Ale+Ome), por um período de dois dias. E teve as seguintes proporções: 71% de ração base (comercial) trituradas, 14% de ovalbumina (OVA), 15% de polvilho doce e 40ml de água destilada. Esta também foi submetida à desidratação em estufa a 65°C por 24h.

A ração três (R3) enriquecida com 10% óleo de peixe foi oferecida aos 10 camundongo do grupo controle e teste (Ome e Ale+Ome) que receberam o ômega-e (ω -3) provenientes do óleo de peixe, por 7 dias de experimento, e seguiu a proporção de 75% de ração base triturada, 10% de óleo de peixe (1g possui 750 mg de ômega 3, sendo 500mg de EPA e 250mg de DHA) , 15% de polvilho doce e 600ml de água destilada. A ração foi submetida à desidratação em estufa a temperatura de 45°C, por um período de aproximadamente 48h, protegida da incidência de luz para evitar a oxidação do ômega 3. As tabelas 1, 2 e 3 demonstram a composição da ração utilizada como base para o preparo de todos os tipos de ração utilizados no experimento.

Tabela 1- Ingredientes da ração padrão comercial (base):

Composição básica
Milho grão moído, farelo de trigo, farelo de soja, cloreto de sódio, carbonato de cálcio, premix vitamínico-mineral-aminoácidos, farinha de carne, farelo de arroz cru e fosfato bicálcico.

Tabela 2- Composição nutricional da ração padrão comercial (base) por kg de produto:

Enriquecimento por Kg de produto
Ácido fólico (1 mg), antioxidante (100 mg), Vitamina A (6.000 UI), Vitamina B1 (1,6 mg), riboflavina (3,6 mg), Vitamina E (40 mg), Vitamina D3 (1.100 UI), Ácido pantotênico (10 mg), Niacina (35 mg), promotor de crescimento (51 mg) e coccidiostático (50 mg).

Tabela 3- Níveis de garantia da ração padrão comercial (base):

Níveis de garantia	
Umidade máxima	12%
Proteína bruta mínima	24%
Extrato etéreo mínimo	3%
Matéria fibrosa máxima	8%
Matéria mínima	10%
Fósforo mínimo	0,8%
Cálcio máximo	1,9%

5.3. Teste alérgico cutâneo a ovalbumina

Foi realizado pela técnica do teste de punctura (MOTTA, 2005), na qual uma gota de solução de ovalbumina foi colocada na pele (epiderme) do camundongo. Para tanto pequena parte do pelo da pata do animal foi rapada, com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Logo após a pele foi limpa com algodão e álcool etílico, foi verificada a não existência de lesões ou dermatites, após esse procedimento, a pele foi raspada para facilitar a penetração da solução na mesma. A leitura foi realizada após 15 minutos, tempo suficiente para ocorrer a reação alérgica. O teste foi considerado positivo quando a pele apresentou coloração vermelha intensa e quando os animais apresentaram prurido acima do normal (**Figura 4**).

Figura 4- Teste cutâneo



5.4. Avaliação da ingestão de alimento

O peso da ração oferecida e a sobra foram computados todos os dias, no mesmo horário e foram anotados em planilha disposta no apêndice 2. Todos os dias as sobras foram descartadas e foi oferecida uma nova quantia de 8g/dia de ração para cada animal, dessa

forma, cada caixa recebia um total de 40g de ração por dia, uma vez que em cada uma permaneciam 5 animais.

5.5. Avaliação do peso corpóreo

O peso individual de cada animal foi obtido desde o início do experimento (dia0) até o término (dia 30) e expresso em gramas, sempre na mesma balança e no mesmo horário. Os dados foram registrados em planilha presente no apêndice B.

5.6. Avaliação da resposta alérgica

Foi feita através da contagem diferencial e total de leucócitos, uma vez, que os processos alérgicos são acompanhados pelo aumento dos níveis séricos de eosinófilos e basófilos e os processos alérgicos agudos e crônicos pela elevada quantidade de neutrófilos, monócitos e linfócitos.

Para tanto foi coletada uma pequena amostra de sangue da cauda dos animais. Da amostra foi confeccionada uma lâmina de distendido sanguíneo corado pelo método panótico e uma pequena amostra foi utilizada para a leucometria.

A confecção da lâmina do distendido sanguíneo foi realizada depositando cerca de 1cm da extremidade de uma lâmina limpa, sobre uma superfície plana. Com o dedo polegar e o indicador da mão direita, a extremidade de outra lâmina (extensora) ligeiramente menor que a primeira, foi segurada para deslizá-la contra a superfície da primeira lâmina, para assim espalhar o sangue e formar um distendido sanguíneo moderadamente fino.

Em seguida a lâmina com o distendido foi corada pelo método panótico. Neste método, existem três reagentes. O primeiro é um fixador; o segundo é um corante ácido; e, o terceiro é um corante básico. Após a coloração, as lâminas foram analisadas pelo método de Schilling (zigue-zague), pelo qual foram contados 100 leucócitos que depois de separados conforme sua morfologia e coloração resultaram em porcentagem de células.

A leucometria foi feita pela contagem diferencial, para qual, foram observados os em microscópio ótico diferentes tipos de leucócitos, levando em conta suas características morfológicas e tinturiais. Os elementos normalmente encontrados neste método são neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. A cada contagem, os leucócitos foram distribuídos em seus grupos até um total de 100 células contadas. Esses valores foram,

então, anotados para a obtenção da fórmula leucocitária relativa, que representa a porcentagem aproximada de cada tipo celular no sangue examinado. A variabilidade estatística foi, evidentemente, considerável; uma vez que esses leucócitos aparecem em baixa concentração.

Para a contagem do total de leucócitos foi coletado 5µl sangue da cauda do animal, logo após esse sangue foi diluído em 95µl de líquido de Turk e colocado em hematocítmetro (câmara de Neubauer) para contagem total de leucócitos. Os resultados foram expressos em número de células por mililitro de sangue através da fórmula: número absoluto de leucócitos = número de leucócitos / 4 x 10 x 20.

5.7. Analgesia e Eutanásia dos Animais

Durante o experimento não foram utilizados, anestésicos, analgésicos ou tranquilizantes, pois estes influenciam no sistema imunológico do animal, o que prejudicaria análise dos resultados do experimento.

A eutanásia foi realizada pela utilização do CO₂, o que leva à uma morte rápida, indolor, sem, no entanto, interferir nos parâmetros hemodinâmicos ou hematológicos do animal.

5.8. Observações clínicas

Uma vez que as reações inflamatórias alérgicas cursão com a liberação de mediadores dos mastócitos e basófilos, dentre eles a histamina e os leucotrienos, que resultam em vasodilatação, edema, produção de muco e broncoconstricção. Também participam dessa reação os eosinófilo, através da liberação da proteína básica principal e da proteína catiônica eosinofílica e agressão tecidual. As citocinas e quimiocinas produzidas por essas células da resposta imune inata perpetuam a resposta inflamatória, recrutando mais eosinófilos e neutrófilos, e mantendo ativada a resposta imune do tipo Th2 (FOSTER et al., 1996).

O que segundo a Associação Brasileira de Nutrologia (2011) compromete o estado nutricional, por aumentar as necessidades de energia e reduzir a ingestão energética por diminuição do apetite (anorexia), diminuição da assimilação de energia e nutrientes (má absorção), perda de nutrientes pela mucosa intestinal inflamada, disfagia, saciedade precoce e dor abdominal. Além disso, o Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar (2008) ainda

descrevem como sintomatologia o edema, a hiperemia, o prurido, a sensação de queimação de lábios, língua, palato e garganta, além de irritabilidade e distúrbio do sono.

Assim, a alergia pode provocar diversos sintomas devido a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias. Por isso, os animais foram avaliados diariamente para a observação de seu comportamento, grau de atividade, estresse, prurido, além da avaliação do consumo de ração e do peso corpóreo.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados foi utilizado o programa estatístico *Graph Pad Prism* versão 5.00 (Trial). As comparações entre os grupos, em cada parâmetro analisado, foi avaliado quanto a distribuição gaussiana normal ou não dos dados utilizando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os valores foram expressos em mediana, média, desvio padrão percentis máximo e mínimo. Quando mais de dois grupos foram comparados utilizamos o teste ANOVA para parâmetros normais ou *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$. Quando constatada diferença significativa pela ANOVA ou teste *Kruskal-Wallis*, empregou-se, respectivamente, os testes de comparação *Newman-Keuls* e *Dunn's* para a localização das diferenças. Para as correlações foi utilizado o teste de Pearson para dados não paramétricos.

8. RESULTADOS

8.1. Observações clínicas

Para a identificação dos sintomas os animais foram avaliados desde o início do experimento, por meio de observações e filmagens, estas foram posteriormente analisadas, momento no qual, as observações foram anotadas em planilhas a fim de verificar se os animais apresentavam alguns sintomas como: edema, hiperemia, prurido, irritabilidade, ansiedade e se estavam deambulantes ou apáticos.

No início do experimento (Dia 0), todos os animais se apresentavam ativos (deambulantes) e sem muitas incidências de prurido. No dia seguinte a primeira indução à alergia (Dia 2), os grupos de animais alérgicos (Ale e Ale+Ome) se apresentaram apáticos e ainda com pouco prurido. Após a segunda indução à alergia (Dia 15) os animais que tiveram a alergia induzida a ovalbumina (Ale e Ale+Ome) se apresentaram mais ativos do que quando

avaliados no dia posterior a primeira indução (Dia 2), no entanto, se apresentaram mais apáticos do que os animais (Con e Ame) que receberam apenas salina no processo de indução.

No Dia 21, os animais do grupo teste Ale+Ome receberam uma ração balanceada enriquecida com 14% de ovalbumina (OVA) substância usada como alérgeno para a indução do processo anafilático. Dois dias após, os animais foram submetidos ao um teste alérgico cutâneo a OVA, durante o qual, os camundongos pertencentes aos grupos Ale+Ome e Ale apresentaram maior grau prurido na região da pata e na boca, devido ao contato com a solução de OVA utilizada no teste alérgico, demonstrando que a indução a alergia tinha sido efetiva, uma vez que os animais apresentaram pruridos intensos nos 15 minutos de observação após o teste alérgico.

Nos dias seguintes ao teste alérgico, os animais dos grupos testes Ale+Ome e controle alérgico Ale apresentaram mais incidências de prurido do que os animais do grupo controle não alérgicos (Con e Ome) ambos os grupos se apresentaram ativos e deambulantes. No dia 21 também foi dado início do tratamento como ômega-3 (ração enriquecida com 10% de óleo de peixe), e no dia 23 foi observado que os animais do grupo Ale+Ome e Ome estavam bastante apáticos e não apresentavam nenhuma reação ao ambiente, pois mesmo quando manipulados os animais se mantinham letárgicos.

O mesmo comportamento de letargia se manteve até o final do experimento (dia 30), neste dia foi observado que os animais do grupo Ale+Ome haviam matado um dos camundongos de seu grupo e o comido. Neste mesmo dia foi observado que um dos camundongos deste grupo se apresentava bastante agitado e agressivo, por isso o mesmo teve que ser separado do restante do grupo até o momento da eutanásia.

8.2. Resultado do peso corpóreo

Foi realizada a avaliação do peso corpóreo uma vez por semana tanto para os grupos (Ale e Ale+Ome) que foram sensibilizados com uma injeção intraperitoneal com a solução de ovalbumina (OVA) 10µg + o adjuvante hidróxido de alumínio (1mg) + salina (0,2ml) no dia 0 e no dia 14, como para os grupos controles (Con e Ome) que receberam apenas salina nestes dias. Sete dias após a sensibilização secundária (dia 21), a ração do grupo sensibilizado Ale+Ome foi substituída por uma ração enriquecida com 14% de ovalbumina (OVA), enquanto os demais grupos (Con, Ome e Ale) permaneceram ingerindo ração padrão. Dois dias após (dia 23) a troca da ração do grupo Ale+Ome, foi feita a confirmação da alergia pelo

teste cutâneo a OVA nos grupos (Ale e Ale+Ome) e iniciado o tratamento com a ração enriquecida com óleo de peixe (10%) para os grupos Ale+Ome e Ome, enquanto os demais grupos (Con e Ale) permaneceram recebendo ração padrão até o fim do experimento. Os animais foram pesados uma vez por semana ao longo de todo o experimento, no mesmo horário e na mesma balança.

A avaliação da variação de peso dos animais demonstrou que a diferença de peso entre os animais no início do experimento (dia 0) não era estatisticamente significativa ($P=0,171$, KW, Figura 5), sendo assim a média dos pesos dos animais era semelhante, aproximadamente (21,5g). O mesmo teste mostrou que durante as quatro semanas seguintes o peso dos animais não apresentou variações significativas, sendo no Dia 7 ($P= 0,929$, KW, Figura5), no Dia 14 ($P= 0,885$, KW, Figura5), no Dia 21 ($P=0,969$, KW, Figura5) e no Dia 23 ($P= 0,914$, KW, Figura5). Já na ultima semana de experimento, na qual os animais foram pesados duas vezes, nos dias 28 e 30, a variação de peso foi estatisticamente significativa apresentando nestes dias respectivamente ($P=0,005$, KW, Figura5) e ($P= 0,004$, KW, Figura5).

A variação encontrada nos dias 28 e 30 foram comparadas, e foi detectado que a diferença estatística ocorreu entre os grupos controle com ração enriquecida com ômega 3 (Ome) e o grupos controle alérgico com ração padrão (Ale), sendo que o Ome teve a mediana de peso menor do que a mediana do grupo Ale nos dois dias.

Em relação à variação ponderal de cada grupo, os animais controles (Con) que receberam apenas ração padrão não apresentaram variação de peso estatisticamente significativa ($P=0,674$, ANOVA, Figura5) durante todo o experimento, mesmo apresentando uma diferença de 4,2% na mediana de peso do início do experimento (dia 0), no qual a mediana de peso do grupo foi de 22,60g, até o fim quando o grupo apresentou mediana de peso de 21,65g.

Já o grupo controle (Ome) que recebeu ração enriquecida com ômega 3 apresentou variação de peso significativa ($P=0,038$, ANOVA, Figura5), tendo uma diferença na mediana de peso de 23,9% do início do experimento (Dia 0), quando a mediana de peso do grupo era 21,7g, até o fim (Dia 30) dia no qual a mediana de peso do grupo era de 16,5g.

O grupo controle (Ale) que também teve a alergia alimentar induzida a OVA e recebeu ração padrão durante todo o experimento, e não apresentou perda de peso significante ($P= 0,937$, ANOVA, Figura5). E o grupo teste (Ale+Ome) alérgico com ração enriquecida com ômega 3 apresentou perda de peso bastante significativa ($P<0,0001$, ANOVA, Figura5)

durante o experimento apresentando uma perda de peso de 20,0% do início (Dia 0), quando a mediana de peso do grupo era 20,70g, até o dia de término do experimento (Dia 30), quando a mediana de peso passou a ser 16,75g. A Tabela 4 com os valores de média, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo da variação do peso dos animais encontra-se em apêndice C.

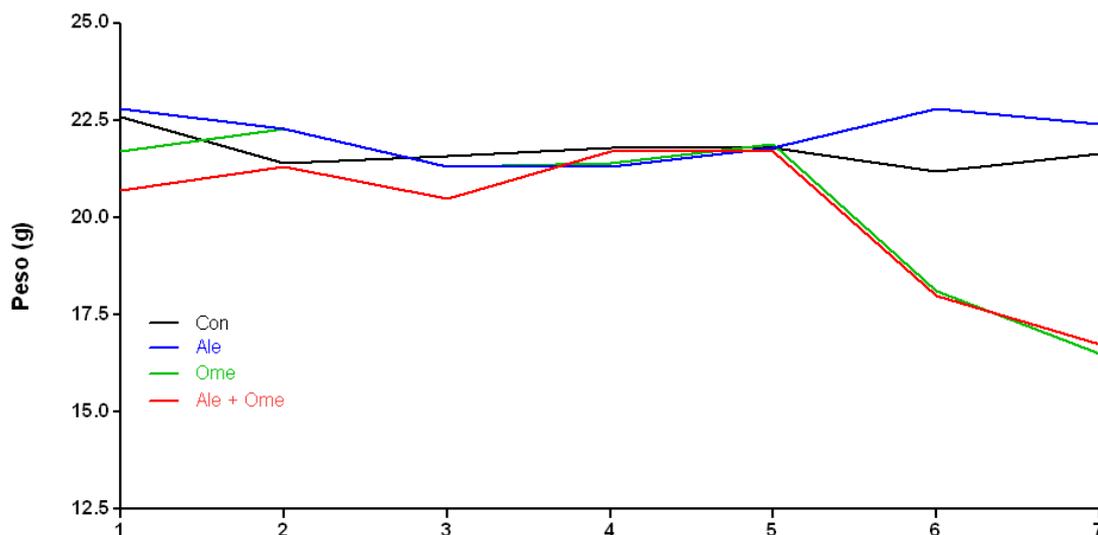


Figura 5- Variação do peso corpóreo em gramas durante as quatro semanas de experimentação. Em camundongos C57BL/6 pertencentes aos grupos controles com ração padrão (Con), controle alérgico com ração padrão (Ale), controle não alérgico com ração acrescida com ômega 3 (Ome) e grupo teste alérgico (Ale + Ome) com ração enriquecida com ômega 3. Os animais dos grupos Ale e Ale+Ome foram sensibilizados (OVA+) com 10 μ g OVA + 1mg Al(OH)³⁺ + 0,2ml salina no dia 0 e no dia 14. Os grupos controles Con e Ome (OVA-) receberam apenas salina nos dias 0 e 14. Sete dias após a sensibilização secundária, a ração do grupo teste Ale+Ome foi substituída por ração enriquecida com 14% de OVA, enquanto o grupo controle permaneceu recebendo ração padrão, dois dias após foi realizado teste alérgico e dado início ao tratamento com ômega 3, este se estendeu durante sete dias consecutivos, nos quais os grupos Ale+ome e Ome receberam ração enriquecida com óleo de peixe enquanto os grupos Ale e Con receberam ração padrão. O peso foi avaliado semanalmente no Dia 0 que corresponde a pesagem 1, Dia 7 correspondentes a pesagem 2, Dia 15 a pesagem 3, Dia 21 a pesagem 4, Dia 23 a 5, Dia 28 a 6 e Dia 30 a pesagem 7. A análise foi realizada pelo teste *Kruskal-Wallis* nos modelos Ome e Ale e pelo teste de ANOVA nos animais Con e Ale + Ome. O valor de P foi definido pra cada grupo separadamente sendo: Con (p= 0,67, ANOVA), Ale (p= 0,78, KW), Ome (p= 0,03, KW) e Ale+Ome (p>0,0001, ANOVA). Segundo o método comparativo de aplicado ao teste *Kruskal-Wallis*, a variação de peso foi maior nos grupos Ome e Ale+Ome, nos dia 28 correspondente a 6ª pesagem (p=0,005) e dia 30 (7ª pesagem) (p=0,004).

8.3. Resultado do consumo de ração

O consumo de ração por grupo foi avaliado diariamente a fim de verificar a aceitabilidade da ração pelos animais. A análise estatística apontou que houve diferença estatisticamente significativa entre o consumo de ração durante as quatro semanas de experimento (p<0,0001, ANOVA, Figura 6) As medianas de consumo por grupo foram Con (Mediana= 13,4g, p=0,0186, KS), Ome (Mediana= 13,2g, p=0,0005, KS), Ale (Mediana=

12,8g, $p=0,009$, KS) e Ale+Ome (Mediana= 11,1g, $p=0,09$, KS) o que mostra que apenas o grupo Ale+Ome não apresentou variação de consumo estatisticamente significativa, apesar de ser a mediana de consumo deste grupo (Ale+Ome), composto por animais alérgicos que receberam no dia 21 ração com 14% de ovalbumina para o desafio alérgico e a partir do dia 23 foram tratados com ômega 3 proveniente do óleo de peixe acrescido na proporção de 10% à ração padrão, menor do que a mediana de consumo dos demais grupos (Con, Ome e Ale). O que indica que o grupo Ale+Ome manteve um menor consumo de ração, em relação aos demais animais, durante todo período de experimento, mas vale destacar que ambos os grupos alérgicos Ale e Ome+Ale apresentaram menor mediana de consumo de ração durante todo experimento, apesar dos animais que receberam ração acrescida e óleo de peixe terem apresentado uma queda de consumo importante na última semana de estudo. A Tabela 5 (apêndice D) mostra os valores da média em gramas, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo do consumo dos diferentes tipos de ração oferecidas ao longo do estudo aos animais.

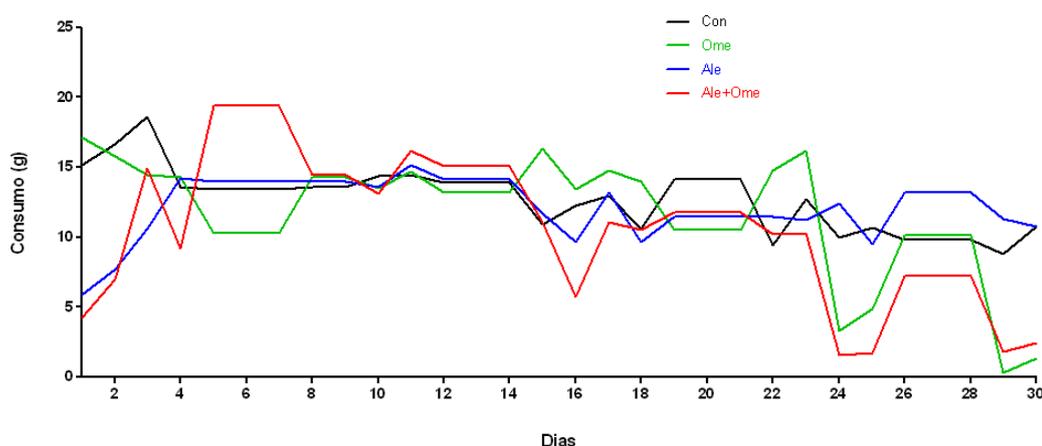


Figura 6- Consumo de ração em gramas durante os 30 dias de experimento. Os camundongos C57BL/6 controles com ração padrão (Con) (Média=12,7g \pm 0,4), controle alérgico com ração padrão (Ale) (Média=12,15g \pm 0,3), controle não alérgico com ração acrescida com ômega 3 (Ome) (Média=11,67g \pm 0,7) e grupo teste alérgico (Ale + Ome) (Média=10,68g \pm 0,9) com ração enriquecida com ômega 3. Os animais dos grupos Ale e Ale+Ome foram sensibilizados (OVA+) com 10 μ g OVA + 1mg Al(OH)³ +0,2ml salina no dia 0 e no dia 14. Os grupos controles Con e Ome (OVA-) receberam apenas salina nos dias 0 e 14. Sete dias após a sensibilização secundária, a ração do grupo teste Ale+Ome foi substituída por ração enriquecida com 14% de OVA, enquanto o grupo controle permaneceu recebendo ração padrão, dois dias após foi realizado teste alérgico e dados início ao tratamento com ômega 3, este se estendeu durante sete dias consecutivos, nos quais os grupos Ale+ome e Ome receberam ração enriquecida com óleo de peixe enquanto os grupos Ale e Con receberam ração padrão. A análise foi realizada pelo teste ANOVA para todos os grupos ($p<0,0001$) e pelo teste de normalidade Klamogona-Snirnov (KS) para cada grupo separadamente, pode-se observar variação estatisticamente significativas entre os grupos Con ($p=0,01$, KS), Ome ($p=0,0005$, KS) e Ale ($p=0,009$, KS) apenas o grupo Ale+Ome não apresentou resultado estatístico ($p=0,09$, KS) apesar de ter apresentado a menor mediana de consumo durante todo o experimento.

8.4. Correlação entre consumo e peso

Foi avaliado se houve correlação entre o consumo de ração e a variação de peso durante o experimento, e pode-se verificar que apenas o peso do grupo Ome apresentou distância da curva gaussiana estatisticamente significativa ($p=0,03$, KS, Figura B), já a avaliação do seu consumo em relação ao peso não teve resultado estatístico ($p=0,054$, KS, Figura7B), os demais grupos não apresentaram distância significativa, sendo assim a correlação do peso com o consumo de ração não apresentou valores de relevância estatística tendo o grupo Con ($p=0,326$, Figura7A), Ome ($P=0,054$, Figura7B), Ale ($p=0,994$, Figura7C) e Ale+Ome ($p=0,069$, Figura7D), apesar do grupo Ale+Ome ter apresentado menor média de peso (Media=19,9), os valores das medianas e percentis máximo e mínimo encontram-se na tabela 6 em apêndice D.

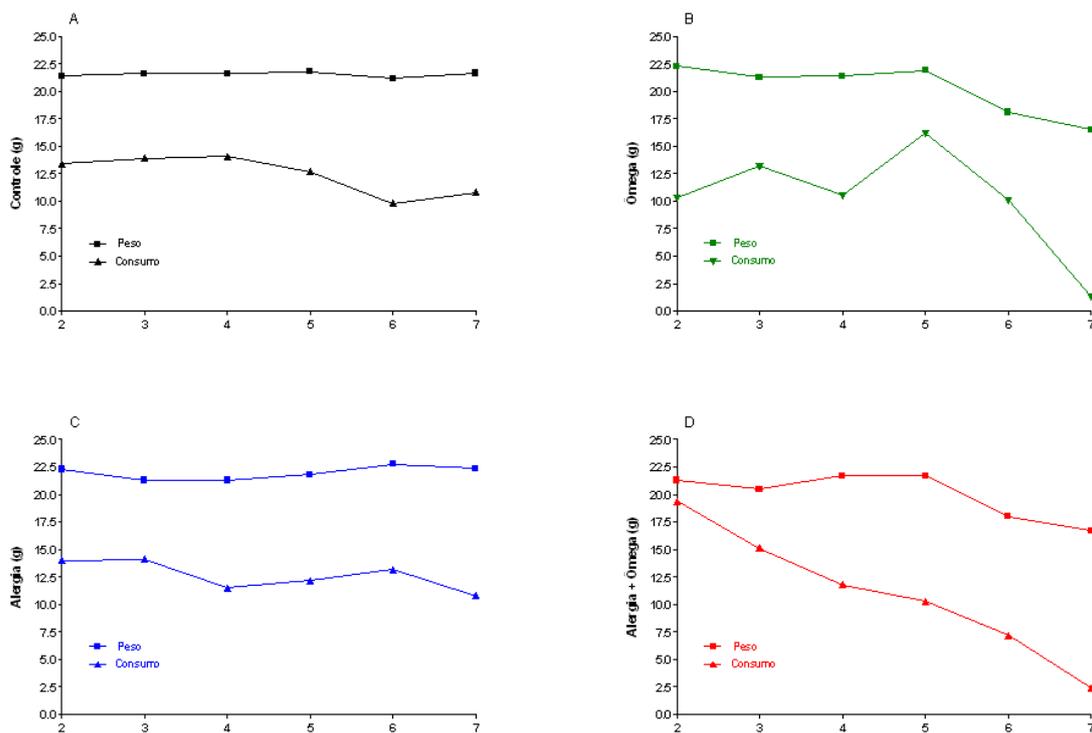


Figura 7- Correlação entre o peso corpóreo dos animais e o consumo de ração em gramas ao longo do experimento. Camundongos C57BL/6 controles não alérgico (OVA-) com ração padrão (Con), controle alérgico (OVA+) com ração padrão (Ale), controle não alérgico (OVA-) com ração acrescida com ômega 3 (Ome) e grupo teste (Ale + Ome) alérgico (OVA+) com ração enriquecida com ômega 3. O peso foi avaliado uma vez por semana sendo, no Dia 0 que corresponde a pesagem 1, Dia 7 correspondentes a pesagem 2, Dia 15 a pesagem 3, Dia 21 a pesagem 4, sendo que na última semana de experimento os animais foram pesados 3 vezes, Dia 23 pesagem 5, Dia 28 pesagem 6 e dia 30 a pesagem 7, os pesos foram aferidos no mesmo horário e na mesma balança. E o consumo foi observado diariamente ao longo dos 30 dias de experimento. Sendo marcados nas figuras os dias congruentes, cruzando os valores de consumo referentes aos sete dias de pesagem dos animais

com o consumo de ração referente há esses dias. A análise foi realizada pelo teste *Pearson*, o valor de p foi definido pra cada grupo separadamente sendo: A figura 7A apresenta que não houve correlação entre o consumo de ração e a variação do peso no grupo Con ($p= 0,36$, KS), A figura7B expõe que também não houve correlação entre o perda de peso observada nos animais do grupo Ome e o seu consumo de ração ($p= 0,056$, KS). A Figura 7C exprime que também não houve correlação entre o peso dos animais do grupo Ale com o consumo de ração ao longo do estudo ($p= 0,99$, KS) e a figura7D assim como as demais demonstra a não existência de correlação entre a perda de peso observada no grupo Ale+Ome e o seu consumo de ração ao longo das quatro semanas de experimentação ($p=0,06$, KS).

8.4. Resultados do leucograma

8.4.1. Leucócitos totais

Para avaliar a influencia do ômega 3 na alergia alimentar induzida a ovalbumina em camundongos, foram analisados os valores médios de leucócitos totais por animais dos grupos controle com ração padrão (Con), controle com ração enriquecida com ômega 3 (Ome), controle (Ale) com animais alérgicos com ração padrão e grupo teste (Ale+Ome) com camundongos alérgicos que receberam o tratamento com ração enriquecida com ômega 3.

Os valores de leucócitos totais foram avaliados, para os quais o valor foi considerado estatisticamente significativo quando $p<0,05$. Ainda utilizou-se a estatística de coluna, pela qual foi possível observar a média, mediana, o percentil máximo e o mínimo da contagem total de leucócitos, que abrange o total de células imunológicas observadas por microscopia óptica em hematocitômetro (câmara de Neubauer).

Para o grupo controle (Con) foi observado que a contagem total de leucócitos não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p= 0,06$, KW, Figura 8) durante todo o experimento, o mesmo foi observado nos grupos Ome ($p=0,85$, KW, Figura 8), Ale ($p=0,18$,KW, Figura 8) e Ale+Ome ($p=0,96$, KW, Figura 8), sendo assim não houve diferença estatísticas no número total de leucócitos durante todo o experimento.

Apesar dos valores de leucócitos totais não apresentarem relevância estatística ao longo do estudo a Figura 4A revela que no início do experimento as medianas entre os grupos era semelhante, e foi se diferenciando ao longo do estudo, uma vez que 14 dias pós a primeira indução a alergia (Figura 4B) a mediana nos grupos alérgicos (Ale e Ale+Ome) foi maior do que a observada nos animais controle não alérgicos (Con e Ome), já no dia após o desafio alérgico para o grupo teste (Ale+Ome) os grupos controle Con, Ale e o grupo teste Ale+Ome tiveram medianas semelhantes enquanto o grupo controle Ome apresentou mediana inferior a estes. No ultimo dia de experimento após o tratamento com ômega-3 os animais tratados com este ácido graxo apresentaram medianas inferiores aos animais controle que receberam

somente ração padrão, a Tabela 7 mostra os valores das medianas de cada grupo ao longo do experimento, esta se encontra no apêndice E.

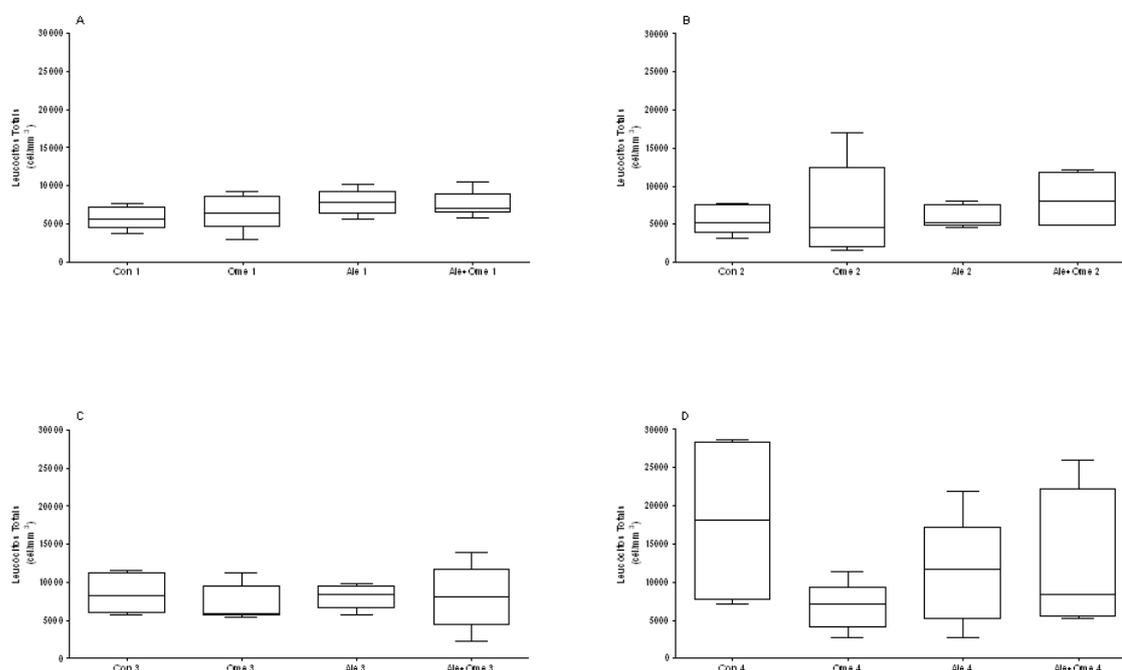


Figura 4- Leucócitos totais por mm³ de sangue nos quatro dias de coleta de sangue. Modelos de animais C57BL/6 controles com ração padrão (Con), controle alérgico com ração padrão (Ale), controle não alérgico com ração acrescida com ômega 3 (Ome) e grupo teste alérgico (Ale + Ome) com ração enriquecida com ômega 3. Os animais Ale e Ale+Ome foram sensibilizados (OVA+) com 10 μ g OVA + 1mg Al(OH)³ + 0,2ml salina no dia 0 e no dia 14. Os grupos controles Con e Ome (OVA-) receberam apenas salina nestes dias. Sete dias após a sensibilização secundária, a ração do grupo teste Ale+Ome foi substituída por ração enriquecida com 14% de OVA, enquanto o grupo controle permaneceu recebendo ração padrão, dois dias após foi realizado teste alérgico e dado início ao tratamento com ômega 3, este se estendeu durante sete dias consecutivos, nos quais os grupos Ale+ome e Ome receberam ração enriquecida com óleo de peixe enquanto os grupos Ale e Con receberam ração padrão. A figura A representa o primeiro dia de coleta, antes da indução da alergia e do tratamento, a figura B o segundo dia de coleta que ocorreu antes da segunda indução à alergia, a Figura C representa o terceiro dia de coleta que ocorreu após o desafio alérgico aos animais teste (Ale+Ome) e a Figura D apresenta os valores coletados no quarto dia de coleta que corresponde ao ultimo dia de experimento após o tratamento com ômega-3. A análise foi realizada pelo teste *Kruskal-Wallis* para todos os grupos, o valor de p foi definido para cada grupo separadamente sendo: Con (p=0,06, KW), Ale (p=0,18, KW), Ome (p=0,85, KW) e Ale+Ome (p=0,18, KW), mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa ao longo do experimento.

Ao avaliar individualmente cada dia de coleta de sangue foi possível averiguar que na coleta 1 no dia 0, no qual foi dado início ao experimento com o primeiro procedimento de indução a alergia, momento no qual os animais dos grupos Ale e Ale+Ome receberam a primeira injeção intraperitoneal com solução de ovalbumina (OVA) 10 μ g + o adjuvante hidróxido de alumínio (1mg) + salina (0,2ml), enquanto os animais Con e Ome receberam apenas injeção com salina, não foi verificada diferença estatística (p=0,26, KW, Figura 5A) entre o número de leucócitos totais nos quatro grupos de estudo.

Na coleta 2 efetuada no dia 14, no qual foi realizado o segundo procedimento de indução com a mesma metodologia que o primeiro, também não foi encontrada diferença

estatística entre os grupos ($p=0,67$, KW, Figura 5B). O mesmo foi observado na análise da 3ª coleta ($p=0,72$, KW, Figura 5C), que ocorreu no dia 23, dia após o desafio alérgico com ração acrescida do alérgeno OVA aos animais do grupo Ale+Ome, nesse dia também foi dado início ao tratamento com o ômega 3. E na coleta 4 no ultimo dia de experimento, após o tratamento com o ômega 3 para os animais Ale+Ome e Ome, também não foi encontrado resultado estatístico ($p=0,75$, KW figura 5D) para a contagem total de leucócitos, no entanto mesmo não apresentando resultado estatístico a Figura 5 permite observar que existiu uma tendência de aumento do número de células ao longo do estudo, principalmente nos animais que não receberam ração acrescida com ômega-3, uma vez que esses apresentaram maior variação da mediana em relação aos animais suplementados com ômega-3, o que indica que os animais suplementados com ômega-3 tiveram menores oscilações no número de células ao longo do experimento.

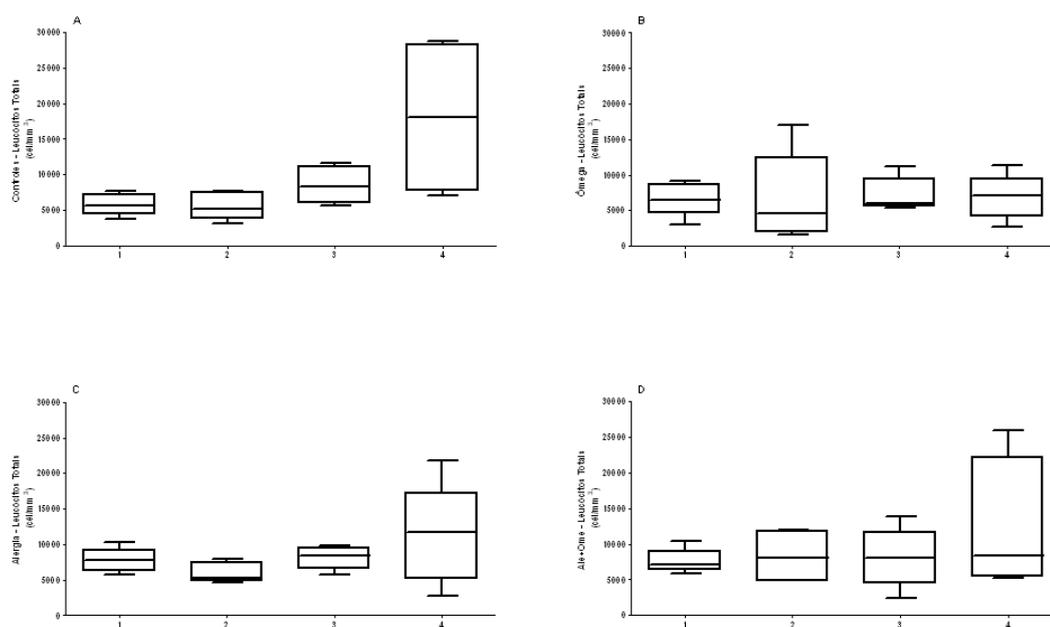


Figura 5- Leucócitos totais por mm^3 de sangue em modelos de animais C57BL/6 controles com ração padrão (Con), Controle alérgico com ração padrão (Ale), controle não alérgico com ração acrescida com ômega 3 (Ome) e grupo teste alérgico (Ale + Ome) com ração enriquecida com ômega 3. Nos quatro dias de coleta de sangue referentes aos dias 0 dia de início do experimento representados nas figuras como coleta 1, a coleta 2 foi realizada no dia 14, na qual os animais Ale e Ale+Ome passaram pelo segundo procedimento de indução da alergia alimentar, Coleta 3 no dia 23, dia que os animais do grupo Ale+ome passaram pelo desafio alérgico com ração adicionada de 14% de OVA, dia esse que também teve início do tratamento da alergia com ração enriquecida com 10% de óleo de peixe como fonte de ômega-3, e coleta 4 realizada no ultimo dia de experimento após o tratamento com ômega-3 durante sete dias. Para todos os dias de coleta a análise foi realizada pelo teste *Kruskal-Wallis*. O valor de p foi definido pra cada dia de coleta separadamente e representa a variação entre todos os grupos: coleta 1 ($p= 0,26$, KW), coleta 2 ($p= 0,67$, KW), coleta 3 ($p= 0,75$, KW) e coleta 4 ($p=0,35$, KW).

No entanto, a mediana de leucócitos encontrados no sangue periféricos dos animais aumentou ao longo do experimento mesmo não apresentando diferença estatística. No início do experimento (Dia 0) o grupo controle (Con) apresentou uma mediana de 5.600 leucócitos por mm^3 de sangue, sendo que ao final (Dia 30) apresentou 18.125 células por mm^3 de sangue. O grupo Ome não alérgico que recebeu ração acrescida de ômega-3 apresentou um total de 6.450 leucócitos por mm^3 de sangue no Dia 0 e de 7.100 células por mm^3 de sangue no Dia 30. O grupo Ale que teve alergia alimentar a OVA induzida, apresentou no início do experimento (Dia 0) um total de 7.800 leucócitos por mm^3 de sangue e ao final (Dia 30) 11.650 leucócitos por mm^3 de sangue periféricos e no grupo Ale+Ome que também teve alergia induzida e foi tratado com o ômega 3 durante sete dias foram encontrados 7.050 leucócitos por mm^3 de sangue no início do experimento (Dia 0) e ao final do experimento 8.375 células por mm^3 de sangue. O que mostra que em todos os grupos o número de leucócitos no sangue periférico dos animais aumentou ao longo do estudo, mesmo não apresentando valores estatisticamente significativos, a Tabela 7 mostra os valores das médias, medianas, desvio padrão com erro e percentis máximo e mínimo do número total de leucócitos ao longo do experimento, esta se encontra em apêndice E.

8.4.2 Neutrófilos

A análise estatística mostrou que no grupo Con não existiu diferença estatística ($p=0,059$, KW, Figura10) durante todo o experimento, o mesmo foi observado no grupo Ale ($p=0,186$, KW, Figura10). Já os grupos Ome e Ale+Ome que receberam ração enriquecida com ômega 3, apresentaram diferença estatisticamente significativa no número relativo de neutrófilos ao longo do experimento, sendo o Ome ($p=0,004$, ANOVA, Figura10) e o Ale+Ome ($p=0,013$, KW, Figura10).

De maneira geral, entre todos os grupos de estudo, os dias de análise sanguínea que apresentaram diferença estática, foram no dia após os animais do grupo (Ale+Ome) receberem ração adicionada de 14% de ovalbumina para o desafio alérgico (dia 23), no qual ocorreu diferença estatística no número de neutrófilos ($p=0,019$, ANOVA, Figura10). E no o ultimo dia de experimento (dia 30), após o tratamento com ração enriquecida com 10% de óleo de peixe nos animais Ome e Ale+Ome, o número de neutrófilos também apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p=0,022$, KW, Figura 6) entre todos os grupos de estudo.

Ao se comparar os valores encontrados do dia 23, pode-se observar que as diferenças se deram entre os animais Con3, Ome3 e Ale3 e o animal Ale+Ome3 ($p < 0,05$). O teste estatístico apontou que os animais Con, Ome e Ale apresentaram uma diferença mediana de menos 39,4%, 36,8% e 13,1% respectivamente em relação ao animal Ale+Ome, mostrando que grupo possuía uma contagem estatisticamente superior de neutrófilos que os demais animais neste dia ($p < 0,05$). (Figura 10).

Já no dia 30, dia de término do experimento, os animais apresentaram uma contagem de neutrófilos significativa ($p = 0,022$, KW, Figura 6), no entanto, o teste comparativo, utilizado para verificar as diferenças entre os indivíduos pertencentes ao mesmo grupo de análise, não detectou diferença significativa ($p > 0,05$) entre o número de neutrófilos no sangue periférico dos animais, demonstrando que os camundongos pertencentes a todos os grupos apresentaram contagens semelhantes de neutrófilos neste dia de coleta sanguínea.

A tabela 8 mostra os valores médios, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo de neutrófilos encontrados no sangue periférico dos animais e encontra-se em apêndice F.

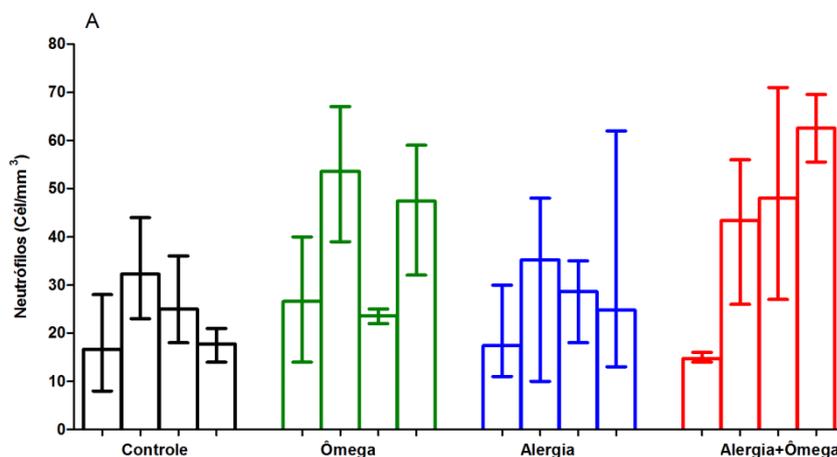


Figura 6- Avaliação do número relativo (%) de neutrófilos por mm^3 de sangue ao longo do experimento. Em camundongos C57BL/6 controles com ração padrão (Con), controle não alérgico com ração acrescida com ômega 3 (Ome), controle alérgico com ração padrão (Ale) e grupo teste alérgico (Ale + Ome) com ração enriquecida com ômega 3. A figura representa a variação da contagem de neutrófilos nos quatro dias de coleta sanguínea (coletas 1, 2, 3 e 4). Coleta 1 realizada no dia 0 de início do experimento, a coleta 2 foi obtida no dia 14, no qual os animais Ale e Ale+Ome passaram pelo segundo procedimento de indução da alergia alimentar, Coleta 3 no dia 23 quando os animais do grupo Ale+ome passaram pelo desafio alérgico com ração adicionada de 14% de OVA, dia esse, que também teve início com o tratamento da alergia com ração enriquecida com 10% de óleo de peixe como fonte de ômega-3, e coleta 4 realizada no último dia de experimento após o tratamento com ômega-3 durante sete dias. A análise foi realizada pelo teste *Kruskal-Wallis* nos modelos Com, Ale e Ale+Ome, e pelo teste de ANOVA no modelo Ome. O valor de p foi definido para cada grupo separadamente sendo: Con ($p = 0,059$, KW), Ome ($p = 0,004$, ANOVA), Ale ($p = 0,18$, KW) e Ale+Ome ($p = 0,01$, KW). Foi aplicado teste de normalidade que apontou que no dia 23 houve diferença estatística entre os quatro grupos

estatísticos ($p=0,019$, ANOVA) e no dia 30 ($p=0,02$, KW). Segundo o método comparativo *Newman-Keuls* aplicado ao teste de ANOVA, a variação no número de neutrófilos por mm^3 de sangue foi maior no animal Alerg+Ome3 quando comparado com os animais Con3, Ome3 e Ale3. Para análise comparativa do dia 30, foi utilizado o teste *Dunn's* aplicado ao teste *Kruskal-Wallis*, permitindo observar que não houve diferença estatística entre os grupos neste dia ($p>0,05$), indicando que todos os animais apresentavam níveis semelhantes de neutrófilos ao final do experimento.

8.4.3. Monócitos

Por meio da análise estatística pôde-se observar que o animal Con4 apresentou diferença na contagem de monócitos significativa durante o estudo ($p=0,022$, KS, Figura 11) enquanto os demais animais não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$) ao longo da pesquisa (Tabela 9).

Também foram aplicados os testes de normalidade *Kruskal-Wallis* e ANOVA, e apenas apresentaram diferenças significativas os grupos Ale ($p= 0,005$, ANOVA, Figura 11) e Ale+Ome ($p= 0,034$, KW, Figura 11), os quais foram submetidos aos procedimentos de indução da alergia alimentar a ovalbumina nos dias 0 e 14 do estudo, enquanto os grupos Con ($p=0,22$, KM, Figura 611) e Ome ($p=0,10$, ANOVA, Figura 11) não apresentaram diferença significativa no número de monócitos ao longo do experimento.

Ao se analisar a contagem de monócitos nos quatro dias de coleta de sangue (Dias 0, 14, 23 e 30). Apenas no dia 0 houve diferença estatística ($p=0,016$, KW, Figura 7). O teste de comparação *Dunn's* foi aplicado para verificar quais animais proporcionaram esta diferença estatística, e foi revelado que a diferença se deu entre os animais Con1 e Ale1, o animal controle 1 apresentava 10,8% menos monócitos em seu sangue periférico do que o animal Ale1, mostrando que este camundongo possuía maior número de monócitos em seu sangue periférico no dia de início do experimento. A Tabela 9 mostra os valores médios, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo dos monócitos séricos dos animais controles e testes e encontra-se em apêndice F.

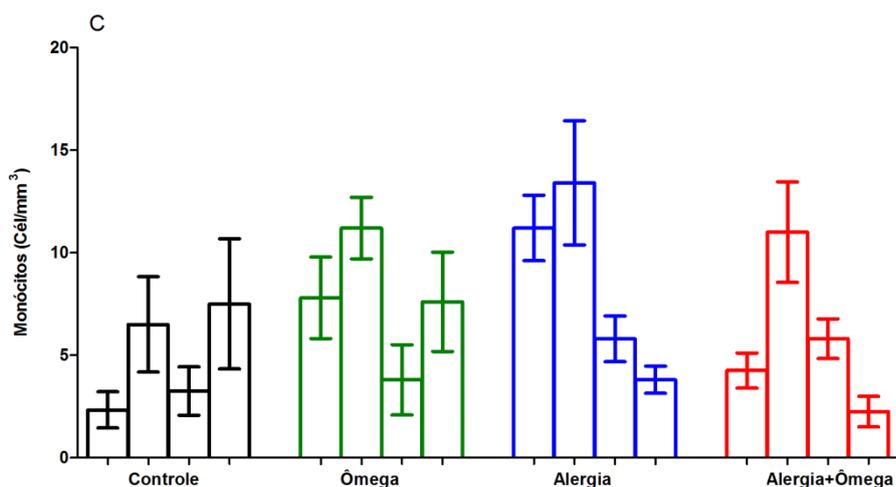


Figura 7- Avaliação do número de monócitos por mm³ de sangue. Em modelos de animais C57BL/6 controles com ração padrão (Con), controle não alérgico com ração acrescida com ômega 3 (Ome), controle alérgico com ração padrão (Ale) e grupo teste alérgico (Ale + Ome) com ração enriquecida com ômega 3. A figura representa a variação da contagem de neutrófilos nos quatro dias de coleta sanguínea (coletas 1, 2, 3 e 4). Coleta 1 realizada no dia 0 de início do experimento, a coleta 2 foi obtida no dia 14, no qual os animais Ale e Ale+Ome passaram pelo segundo procedimento de indução da alergia alimentar, Coleta 3 no dia 23 dia que os animais do grupo Ale+ome passaram pelo desafio alérgico com ração adicionada de 14% de OVA dia esse que também teve início do tratamento da alergia com ração enriquecida com 10% de óleo de peixe como fonte de ômega-3, e coleta 4 realizada no ultimo dia de experimento após o tratamento com ômega-3 durante sete dias. A análise foi realizada pelo teste *Kruskal-Wallis* nos modelos Con e Ale+Ome, e pelo teste de ANOVA nos modelos Ome e Ale. O valor de p foi definido pra cada grupo separadamente sendo: Con (p= 0,22, KW), Ome (p= 0,10, ANOVA), Ale (p= 0,006, NOVA) e Ale+Ome (p=0,034, KW), sendo assim apenas os grupos alérgicos apresentaram diferenças estatísticas ao longo do estudo. Para verificar em quais momentos essa diferença estatística se deu foi aplicado o teste de normalidade *Kruskal-Wallis* que apontou que apenas no dia 0 houve diferença estatística entre os quatro grupos (p=0,017, KW). Segundo o método comparativo Dunn's aplicado ao teste *Kruskal-Wallis*, foi possível observar que a diferença se deu entre o animal Con1 e Ale1 com uma diferença de 10,8% entre os mesmos.

8.4.4 Linfócitos

A análise dos linfócitos periféricos apontaram diferenças significativas entre os animais do grupo Ale+Ome (p=0,025, KW, Figura 12) e do Ome (p=0,0006, ANOVA, Figura12), enquanto os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas Con (p=0,150, KW, Figura12), Ale (p=0,141, ANOVA, Figura12).

Nos diferentes dias de coleta sanguínea (Dia 0, 14, 23 e 30), apenas apresentaram diferença estatística os dias 23 (p=0,018, ANOVA, Figura 8) e 30 (p=0,034, KW, Figura8), sendo que no Dia 23 a diferença foi observada entre o animal Ale+Ome3 e os camundongos Con3, Ome3 e Ale3, os quais apresentaram maior contagem de linfócitos do que Ale+ome3, tendo este uma diferença média de menos 26,4%, 25,5% e 22,8%, indicando que o camundongo Ale+Ome3 apresentou menor número de linfócitos após o desafio alérgico com

OVA. No Dia 30 a diferença no número de linfócitos entre os animais também foi significativa ($p=0,034$, KW, Figura8) não apresentando diferença estatística entre os animais, pois todos apresentaram $p>0,05$ neste dia, indicando que todos os camundongos estudados apresentaram contagens de linfócitos semelhantes, o que sugere que a média do número de linfócitos no sangue periférico dos animais foi diminuindo ao longo do estudo, como mostra a Tabela 10 em apêndice G, mesmo o a Figura 8 mostrando que os animais do grupo alérgico não tratado com ômega-3 tiveram uma tendência de aumento no número de linfócitos maior que os demais grupos.

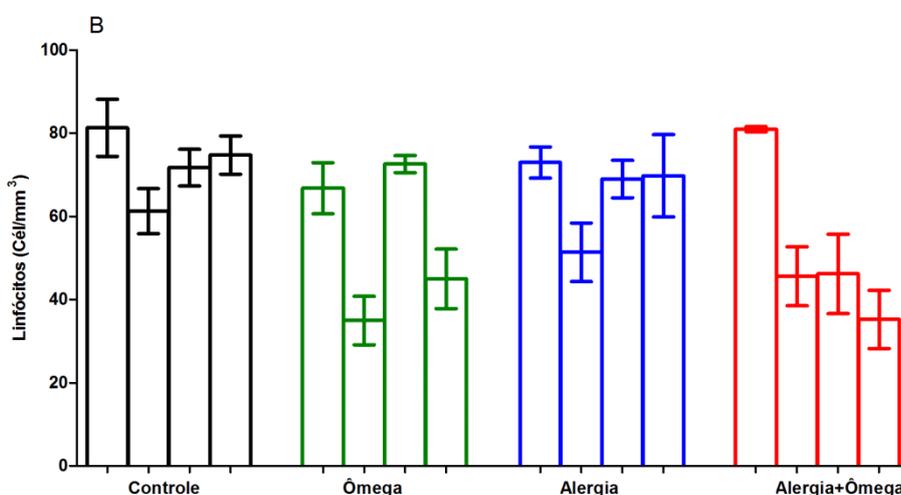


Figura 8- Avaliação do número de linfócitos por mm^3 de sangue. Em modelos de animais C57BL/6 controles com ração padrão (Con), controle não alérgico com ração acrescida com ômega 3 (Ome), controle alérgico com ração padrão (Ale) e grupo teste alérgico (Ale + Ome) com ração enriquecida com ômega 3. A figura representa a variação da contagem de neutrófilos nos quatro dias de coleta sanguínea (coletas 1, 2, 3 e 4). Coleta 1 realizada no dia 0 de início do experimento, a coleta 2 foi obtida no dia 14, qual os animais Ale e Ale+Ome passaram pelo segundo procedimento de indução da alergia alimentar, Coleta 3 no dia 23 dia que os animais do grupo Ale+ome passaram pelo desafio alérgico com ração adicionada de 14% de OVA, dia esse que também teve início com o tratamento da alergia com ração enriquecida com 10% de óleo de peixe como fonte de ômega-3, e coleta 4 realizada no último dia de experimento após o tratamento com ômega-3 durante sete dias. A análise foi realizada pelo teste *Kruskal-Wallis* nos modelos Con e Ale+Ome, e pelo teste de ANOVA no modelo Ome e Ale. O valor de p foi definido para cada grupo separadamente sendo: Con ($p= 0,15$, KW), Ome ($p= 0,006$, ANOVA), Ale ($p= 0,14$, NOVA) e Ale+Ome ($p=0,025$, KW), indicando que apenas os animais alérgicos apresentaram valores significativos de linfócitos por mm^3 de sangue. Para verificar em quais momentos essa diferença estatística se deu foi aplicado o teste de normalidade que apontou que apenas nos dias 23 ($p=0,018$, ANOVA) e 30 ($p=0,037$, KW) houve diferença estatística entre os quatro grupos. Segundo o método comparativo *Newman-Kellus* aplicado ao teste ANOVA mostrou que no dia 23 esta diferença se deu entre o animal Ale+Ome3 e os camundongos Con3, Ome3 e Ale3, os quais apresentaram menor contagem de leucócitos do que Ale+ome3 ($p<0,05$). E o teste *Dunn's* aplicado ao teste *Kruskal-Wallis*, permitiu observar que a diferença encontrada no dia 30 não foi estatisticamente significativa entre os quatro grupos estudados, pois todos apresentaram $p>0,05$ neste dia, indicando que todos os camundongos estudados apresentaram contagens de linfócitos semelhantes ao final do estudo.

9. DISCUSSÃO

A alergia é uma reação de hipersensibilidade iniciada por mecanismos imunológicos sendo mediada por anticorpos ou por células. Na grande maioria dos casos, os anticorpos responsáveis pela reação alérgica, pertencem ao isótopo de imunoglobulina E (IgE), que é o principal anticorpo produzido nas alergias alimentares e acomete o trato gastrointestinal com diferentes graus de inflamação eosinofílica e edema (JOHANSSON. et al., 2004).

Esses anticorpos se fixam a receptores de mastócitos e basófilos (SICHERER, SAMPSON, 2010) e em contatos posteriores com o alérgeno levam a libertação de mediadores como a histamina, prostaglandinas e leucotrienos, sendo estes os responsáveis pelas manifestações clínicas (WANG et al., 2009), que ocorrem imediatamente após a ingestão do alimento e podem manifestar-se como erupção cutânea aguda em redor da boca, rubor e edema da face (HODGE et al, 2009).

As proteínas alimentares também podem ser responsáveis por mecanismos imunológicos não mediadas por IgE (HODGE et al., 2009). E sim através de reações mediadas por células que são mais tardias, e representam a minoria das reações imunológicas aos alimentos e ocorrem na ausência de anticorpos IgE. Estas reações devem-se normalmente a uma inflamação aguda ou crônica no trato gastrointestinal, onde eosinófilos e linfócitos T parecem desempenhar um importante papel (CIANFERONI et al., 2009). As manifestações clínicas mais comuns são a proctite e a enterocolite (WANG et al., 2009), além de dermatite de contato, dermatite herpetiforme, síndrome de Heiner e doença celíaca.

Sendo assim, se faz necessário o tratamento destes sintomas e de acordo com o Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar (2008), o tratamento convencional dos sintomas da alergia é baseado principalmente na abordagem farmacológica, por isso atualmente existem muitas substâncias disponíveis para o tratamento das alergias, como por exemplo, os agentes anti-histamínicos, antialérgicos e corticóides. No entanto, estes fármacos apresentam efeitos colaterais e reações adversas indesejáveis como sonolência, cefaléia, desconfortos gastrointestinais, fadiga e xerostomia.

Nesse sentido faz-se importante estudar os efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados no tratamento da alergia alimentar, e o óleo de peixe pode ser uma boa opção para o tratamento, uma vez, que este óleo possui as formas ativas do ômega-3, os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) (C22:5) e o ácido decosaenóico (DHA) (C22:6) (DUARTE,

2003, p138) que participam ativamente da produção eicosanóides com atividade menos inflamatória (NETTLETON, 1991).

Os ácidos graxos poli-insaturados, incluindo ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6) são precursores dos eicosanoides diversos, tais como prostaglandinas (PG), leucotrienos (LX), tromboxanos (TX), ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenóicos (HPETE) e ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE), e cada uma dessas famílias dá origem a uma série diferente de eicosanóides que participam ativamente no sistema imunológico, pois são mediadores de reações alérgicas (ABBAS et al., 2011).

E já foi observado que o ômega 6 leva a condução de um subconjunto de resposta Th2, a qual cursa com a liberação de interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5 e IL-13 que promovem à proliferação de eosinófilos, leucócito responsável, dentre outras funções, em promover a expansão de células Th2 (mastócitos, basófilos, eosinófilos) em tecidos inflamados, e a liberação de mediadores pró-inflamatórios com ativação de sistemas de adesão, tráfico e regulação da permeabilidade vascular, além da secreção de muco, tecido celular (MATOS et al., 2012) e anticorpo IgE (ABBAS et al., 2011)

Por outro lado, um aumento da ingestão de ω -3 conduzirá uma menor resposta anafilática, uma vez que o ω -3 compete metabolicamente com ω -6, pois seus mecanismos de ação são semelhantes, culminando assim na diminuição da síntese de PGE2, e dessa forma levará a uma redução dos intermediários IL-4 e IgE. Além disso, a suplementação com o ω -3 em subconjuntos alérgicos pode ser benéfica, uma vez que um ambiente menos inflamatória pode ser conseguido durante o metabolismo desse ácido graxo (MATOS et al., 2012).

Durante o experimento foram avaliadas as características clínicas da alergia alimentar, tanto para os animais alérgicos como para os controle não alérgicos, os animais foram observados diariamente, e observamos o que os animais alérgicos apresentaram maior incidência de prurido, apatia, perda de peso, oscilações entre agitação e apatia e menor consumo de ração. Estes dados estão de acordo com o Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar (2008) que descreveu que as reações alérgicas cursam com alguns sintomas que podem ser facilmente observados, como: anorexia, edema, hiperemia, prurido, irritabilidade e sonolência.

Sintomas esses que podem levar a modificações no comportamento alimentar, e culminar em caquexia, uma vez que um dos componentes importantes na gênese da caquexia é a anorexia que pode ser causada pelo acúmulo de citocinas inflamatória como o fator de

necrose tumoral (TNF- α) e IL-6 (CAMPOS et al., 2011) características das respostas de hipersensibilidade alérgica (ABBAS et al, 2011).

Observou-se também que o peso dos animais alérgicos diminuíram com o tempo. É possível que os animais tenham perdido peso pela caquexia gerada no mecanismo tardio de hipersensibilidade. No processo tardio, os eosinófilos e mastócitos presentes no tecido de resposta produzem citocinas como o TNF e IL-6. Campos (2011) em um estudo realizado com seres humanos observou que a caquexia manifesta-se clinicamente por perda tecidual, podendo-se ainda observar apatia e fadiga. Corcos et al. (2003 *apud* Moreira 2006), em estudo feito com paciente oncológicos, observaram que a caquexia está associada a níveis elevados de TNF- α e IL-6 que são também encontradas dos processos alérgicos, e o aumento destas citocinas leva a um quadro clínico semelhante ao observado no nosso modelo, não apenas pela perda de peso corpóreo e consequente perda proteica, mas também pela aparência debilitada observadas nos animais alérgicos como também encontrado em outros estudos (DELANO et al., 2006).

Além disso, é importante referir que existem evidências que sugerem que a alergia alimentar é capaz de influenciar mudanças de comportamento e de alterar funções cerebrais (DOURDO, 2006). Foi demonstrado, por exemplo, que a aversão à ingestão do antígeno por animais sensibilizados está associada a níveis aumentados de ansiedade e aumento da ativação de neurônios de áreas cerebrais relacionadas à emoção (DOURDO, 2006). Tanto o desenvolvimento da aversão alimentar quanto a ativação cerebral parecem ser induzidos pela degranulação de mastócitos dependente de IgE, uma vez que alguns estudos demonstraram que estes eventos não acontecem após o tratamento dos animais com anticorpo anti-IgE (BASSO et al., 2004). Esse fato pode explicar o comportamento encontrado em alguns animais alérgicos do grupo Aler+Ome que apresentaram aversão à ração e bastante agitação em alguns momentos do estudo.

Quanto à perda de peso, em nosso estudo foi observado que os animais teste (Ale+Ome) que foram submetidos aos procedimentos de indução da alergia alimentar nos dias 0 e 14 e ao desafio alérgico com ração enriquecida com ovalbumina (OVA) nos dias 21 e 22, e que receberam tratamento com ômega-3 por um período de sete dias correspondentes aos dias 23 à 30, apresentaram perda de peso bastante significativa ao longo do experimento. Resultado semelhante foi observado nos animais não alérgicos que também receberam ração acrescida de ômega-3 pelo mesmo período de tempo, no entanto para esses animais acredita-

se que a perda de peso tenha ocorrido em recorrência ao baixo consumo de ração observado no período final da pesquisa.

Em estudo realizado no ano de 2004 por Saldanha e colaboradores com camundongos BALB/c para o modelo de alergia alimentar também contra a ovalbumina, demonstraram que um dos sintomas mais significativos apresentados foi a perda de peso corpóreo. No entanto o grupo de animais Ome não alérgico que recebeu ração acrescida de ômega-3 também apresentou perda de peso significativa. Sendo assim a perda de peso verificada durante o estudo também pode ter ocorrido devido à aversão a ração acrescida de óleo de peixe como fonte de ômega-3, uma vez que esses animais não foram sensibilizados a ovalbumina e não passaram pelo desafio alérgico, mas mesmo assim, apresentaram perda de peso significativa. Enquanto os animais do grupo Ale que tiveram alergia alimentar induzida nos dias 0 e 14, e receberam apenas ração padrão durante todo experimento não apresentaram perda de peso significativa. Dessa forma, a significativa perda de peso, encontrada quando analisados todos os grupos de estudo, não pode ser atribuída exclusivamente ao processo alérgico.

Em outro estudo realizado em 2006 por Dourado também com modelo C57BL/6 de alergia alimentar, foi observado que a produção de muco intestinal nos animais C57BL/6 era maior do que nos animais da linhagem BALB/c, sendo assim o aumento do muco diminuiria a absorção antigênica evitando, assim, a perda de peso corpóreo e a produção de IgE e IgG1 decorrentes da alergia alimentar (DOURADO 2006). Não foi possível observar esses parâmetros em nosso estudo, no entanto, a perda de peso nos nossos animais teste (Ale+Ome), poderia estar associada a fatores imunológicos dependentes de citocinas Th2, caracterizada pela produção do anticorpo IgE, uma vez que na pesquisa realizada por Saldanha e colaboradores (2004) os animais BALB/c deficientes para a citocina IL-4, importante na produção de IgE, além de não produzirem anticorpos anti-OVA, não perderam peso corpóreo quando submetidos ao protocolo de indução da alergia alimentar. Pode-se sugerir, portanto, que o aumento de IgE é necessário para que ocorra o emagrecimento observado no processo alérgico (DOURADO, 2006).

Entretanto, apenas níveis elevados desse anticorpo não são suficientes para desencadear a perda de peso, uma vez que no estudo feito por Dourado (2006) os animais C57BL/6, mesma linhagem utilizada em nosso estudo, apesar de produzirem maior quantidade de IgE que os seus controles após sensibilizados e desafiados, mesmo assim, não emagreceram. Esse fator pode ser explicado pela maior retenção de líquidos corporais nos tecidos dos animais do nosso estudo que foram sensibilizados, os comparando com os seus

controles. O mesmo foi observado em estudo feito por Moreira 2006 com animais C57BL/6 com alergia induzida a OVA.

Diante disso, podemos atribuir a retenção de líquidos aos animais pertencentes ao grupo Ale, que passaram pelo procedimento de indução da alergia a OVA, e não apresentaram perda de peso significativa durante o experimento. Esses achados demonstram que, mesmo sem sinais aparentes como a perda de peso, a alergia pode estar desencadeando alterações nestes animais (MOREIRA, 2006).

Sendo assim algumas pesquisas demonstraram que os camundongos da linhagem C57BL/6 quando submetidos a protocolos de indução da alergia alimentar a OVA, diferente do encontrado nos animais testes (Ale+ome) em nossa pesquisa, não apresentavam perda de peso (DOURADO, 2006; MOREIRA, 2006; SALDANHA, 2004).

No intuito de encontrar um fator para explicar essa perda de peso, foi feita avaliação do consumo de ração, através da qual foi verificado que houve diferenças estatisticamente significativas entre o consumo de ração do início ao fim do estudo.

Moreira (2006) em um estudo que dentre outros objetivos avaliou a relação entre emagrecimento com níveis séricos de anticorpos específicos, níveis hepáticos da citocina TNF- α , nível de desidratação, quantificação da absorção protéica, e alterações morfológicas em diversos tecidos em animais C57BL/6 e BALB/c que receberam ração padrão comercial e ração acrescida de Ovalbumina, diferente do encontrado em nosso estudo, não observaram diferenças significativas no consumo das rações ao longo de todo experimento, sendo assim esse autores não correlacionaram a perda de peso ao consumo de ração.

Mesmo assim, vale ressaltar que os animais que se alimentaram com a ração acrescida de OVA no estudo de Moreira, receberam essa dieta desde o início do experimento, não sendo submetidos à troca do padrão alimentar ao longo da pesquisa, esse fator pode ter contribuído para melhor aceitabilidade da dieta, outro fator interessante é que mesmo estes animais tendo sido sensibilizados a OVA, não apresentaram aversão a ração acrescida desta. Uma vez que é comum os animais rejeitarem o alérgeno, por associarem o sabor ao desconforto causado pelo processo alérgico. Segundo Garcia e colaboradores (1985) à teoria geral da aversão condicionada ao sabor correlaciona sensações gustatórias e consequências gastrointestinais. Segundo esses autores diversas áreas do cérebro estão interligadas ao trato gastrointestinal, e projeções neurais do trato gastrointestinal e gustatórias convergem para o mesmo local no cérebro: a região caudal do núcleo solitário. Baseado nessas relações anatômicas e fisiológicas sugere-se que qualquer distúrbio gastrointestinal, via nervo vago ou via sanguínea, pode

chegar ao cérebro concomitantemente a estímulos originados dos nervos gustatórios. Então a aversão ao sabor estaria relacionada com o estabelecimento dessa associação (MOREIRA, 2006).

Esse fato também foi observado por Cara e colaboradores em estudos realizados em 1994 e 1997 (CARA et al, 1997; CARA et al., 1994). Esses pesquisadores observaram que frente a duas opções líquidas, uma de água e outra de clara de ovo adocicada com sacarina, animais não sensibilizados à ovalbumina preferiam ingerir a solução adocicada, enquanto que animais sensibilizados mostravam aversão a essa solução. Acredita-se, então, que mesmo com uma única fonte líquida, a ingestão de solução de clara de ovo causou um desconforto nos animais sensibilizados no período inicial da ingestão e isto os levou a relacionar o sabor da clara ao mal estar.

Acredita-se que os animais alérgicos pertencentes ao grupo Ale+Ome podem ter relacionado o fato de comer com o mal estar causado pelo alérgeno OVA, uma vez que passaram pelo desafio alérgico, no qual, receberam ração acrescida com 14% de OVA, e como essa ração foi trocada abruptamente pela ração enriquecida com ômega-3 os animais podem ter continuado a relacionar o ato de se alimentarem ao mal estar provocado pela alergia, o que os pode ter levado a rejeitarem a ração acrescida com ômega-3.

No entanto, diferente do observado por Moreira (2006) em nosso estudo a análise estatística demonstrou que não houve correlação entre o consumo de ração e a variação de peso dos animais, apesar dos camundongos suplementados com ômega 3 terem apresentado perda de peso significativa ao final do experimento, concomitante a redução no consumo de ração.

Em outro estudo realizado em 2004 por Saldanha, a perda de peso dos animais BALB/c no modelo de alergia alimentar não foi associado a um menor consumo líquido, nem a um menor consumo de ração, assim como encontrado em nossa pesquisa. Nesse estudo a redução de peso observada foi correlacionada as sintomatologias da alergia alimentar, contudo esses autores encontraram um tipo de resposta alérgica de caráter Th2 com a participação das citocinas IL-4 e IL-5.

Dessa forma pode-se atribuir a perda de peso em nosso modelo de alergia (grupo Ale+Ome) ao processo alérgico. No entanto, os animais não alérgicos que também receberam a ração acrescida de óleo de peixe (Ome), assim com os animais alérgicos (Ale+Ome) apresentaram perda de peso significativa, porém, nesses animais, descarta-se que a causa tenha sido a alergia, pois estes não foram submetidos a processos alérgicos. Sendo assim, a perda de peso nesse grupo pode ter ocorrido simplesmente pela aversão á ração acrescida de

ômega-3 que apresentava sabor e odor diferentes dos da ração padrão, mesmo não apresentando correlação estatística entre o consumo de ração e o peso corpóreo dos animais. Uma vez que foi, nitidamente observado que no período no qual os animais receberam a ração acrescida de ômega-3, os mesmos perderam mais peso do que no período que receberam apenas ração padrão. Outro fator que pode ter levado a perda de peso, é a ocorrência de alguma infecção, no entanto não foi possível avaliar se esses animais tinham alguma patologia.

Diante disso nosso estudo avaliou a cinética das reações alérgicas por meio do leucograma, uma vez que algumas das células efetoras envolvidas na hipersensibilidade imediata (alergia) como os linfócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos (SOLÉ, et al., 2011) podem ser observadas através desse exame.

Apesar dos valores de leucócitos totais não apresentarem relevância estatística ao longo do experimento, foi possível observar que no início deste as medianas entre os grupos eram semelhantes, e foram se diferenciando ao longo do estudo, uma vez que 14 dias pós a primeira indução a alergia (Figura 4B) a mediana dos grupos alérgicos (Ale e Ale+Ome) foi maior do que a observada nos animais controle não alérgicos (Con e Ome). Outro fator importante é que no ultimo dia de experimento, após o tratamento com ômega 3, os animais tratados com esses ácidos graxos apresentaram medianas inferiores aos animais controle que receberam somente ração padrão, sendo assim foi possível observar que existiu uma tendência de aumento do número de células ao longo do estudo, principalmente nos animais que não receberam ração acrescida com ômega-3, uma vez que esses apresentaram maior variação da mediana em relação aos animais suplementados com óleo de peixe, que apresentaram menor oscilação no número de células ao longo do experimento.

Diante disso, é possível que esses achados tenham ocorrido devido ao efeito imunomodulador dos ácidos graxos ômega-3, uma vez que estudos realizados por Bassaganya-riera e Hontecillas em 2010 demonstraram que a suplementação com óleo de peixe conduz a uma redução no número total de leucócitos, devido uma indicação da interação endotelial de leucócitos reduzida. Pois foi evidenciado por esses autores que o ácido graxo eicosapentaenoico (EPA), pertencente a família ômega-3 (ω -3) e presente em quantidade considerável no óleo de peixe, é um potente inibidor da interação de leucócitos com o endotélio vascular.

O mecanismo proposto responsável por este efeito parece ser a ativação dos receptores nucleares *proliferator-activatedperoxissoma α* (PPAR α) e *downregulation* responsáveis pelo

rolamento de leucócitos para o local de inflamação (BASSAGANYA-RIERA, 2010). Por isso, a suplementação com ω -3 pode reduzir a resposta inflamatória em várias doenças de caráter inflamatório crônico caracterizadas por acúmulo de leucócitos, tais como a aterosclerose, asma, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória do intestino e artrite reumatoide (LEHR et al, 1991; BASSAGANYA-RIERA, 2010).

Diante disso o tratamento com ômega-3 mesmo não apresentou eficácia estatisticamente comprovada em nosso estudo pode ter contribuído para o controle das respostas alérgicas nos animais suplementados. Dessa forma pode-se atribuir os valores elevados de p ($P > 0,05$) ao tamanho da amostra utilizada, apenas 5 animais, o que diminui a probabilidade do resultado ser significativo. Outro fator que pode ter contribuído para esse achado foi o curto prazo experimental, portanto o tempo de tratamento pode não ter sido suficiente para se ter eficácia, e assim pode não ter ocorrido redução significativa no número de leucócitos ou mesmo não existiu tem hábil para o aumento relevante dessas células.

Esse achado também foi observado em pesquisa realizada por Baqueiro e colaboradores em 2010, na qual os animais foram sensibilizados a *Blomiatropicalis*(*Bt*) por injeções subcutâneas com 100 μ g ou 10 μ g de *Blomiatropicalis* adsorvido a 1,6mg de hidróxido de alumínio [Al (OH) 3] gel. Nesse estudo os animais, assim como no nosso, foram submetidos a um modelo de alergia de curto prazo experimental, e os grupos teste também não apresentaram diferença estatística na contagem total de leucócitos em relação aos animais controle.

Esses autores descreveram que o curto prazo de experimento pode ter contribuído para a não detecção de diferenças estatísticas no total de leucócitos (BAQUERO et al., 2010), sendo assim, pode-se considerar que esse fator também pode ter colaborado para os nossos achados, uma vez que nossa pesquisa, assim como a deles, foi realizada em curto período, apenas quatro semanas.

Nesse sentido com o intuito de melhor investigar a cinética da reação alérgica em nosso modelo de alergia, foi realizada a contagem diferencial de leucócitos (Leucometria), pela qual observamos os leucócitos eosinófilos, neutrófilos, monócito e linfócitos. Em nosso estudo foi observado um pequeno número de eosinófilos no sangue periférico dos animais, mas mesmo assim foi possível verificar uma contagem maior nos camundongos alérgicos (Ale e Ele+Ome), porém não foi observado se estes leucócitos estavam ativos.

Acredita-se que o número de eosinófilos foi reduzido em nosso modelo, devido ao as análises não terem sido realizadas no período aguda da resposta alérgica, na qual os

eosinófilos ainda estão na corrente sanguínea. Em modelos de alergia alimentar em animais um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o processo alérgico é número de eosinófilos na mucosa intestinal do intestino delgado (REIS, 2007), uma vez que nas reações alérgicas essas células migram para o tecido. Em nosso modelo acredita-se que os eosinófilos migraram para o peritônio dos animais, local no qual foi feita a indução da alergia alimentar, no entanto não foi possível realizar lavagem peritoneal para analisar de forma fidedigna o número dessas células.

Quanto a contagem de neutrófilos, célula efetora importante na hipersensibilidade Th1 (ABBAS et al., 2011) foi observado uma aumento significativo nos grupos Ale+Ome e Ome, ambos os grupos receberam ração acrescida de ômega 3, no entanto, somente os animais do grupo Ale+Ome passaram pelo procedimento de indução da alergia alimentar e desafio alérgico. Dessa forma, o aumento na contagem de neutrófilos encontrada nesses animais pode ter ocorrido tanto em resposta aos estímulos alérgicos, pois como já dito, animais da linhagem C57BL/6 tendem a uma resposta anafilática (REIS, 2006), na qual apresentam um aumento na produção de interleucina-2 (IL-2) e conseqüentemente produção do Interferon-alfa (IFN- γ), citocina efetora de respostas imunes, e dentre suas funções destaca-se a promoção da diferenciação de células T CD4+ inativas (naïves) para o subgrupo Th1, fator que inibi a proliferação de células Th2 (Mastócitos, basófilos e eosinófilos) (ABBAS et al., 2011).

E para que essa resposta alérgica se desenvolva, é necessária inicialmente uma resposta imunológica natural (inespecífica), e as principais células efetoras da imunidade natural são os neutrófilos e os fagócitos mononucleares que em conjunto com outras células imunológicas participam das reações de hipersensibilidade alérgica (ABBAS, 2011). Sendo assim o elevado número de neutrófilos encontrados nos animais Ale+Ome pode ser explicado pelo padrão de resposta inflamatória característico da linhagem C57BL/6 (REIS, 2006). Uma vez que o teste estatístico mostrou ser significativo o aumento ocorridos após o desafio alérgico com OVA.

Outro fator que também pode ter contribuído para esse resultado é o estresse, pois como relatado por Ferraz (2011), a contagem absoluta e relativa de neutrófilos segmentados tende a aumentar durante o estresse agudo, como observado em humanos (BRUUNSGARD, 1999), em macacos Rhesus (MORROW-TESCH, et al., 1993) e hamsters (CUNHA, et al., 2005) e reflete alterações fisiológicas ou patológicas em diferentes espécies de mamíferos (FERRAZ, 2011). Sendo assim, o estresse causado pelos sintomas da alergia nos animais

Ale+Ome também pode ter corroborado para o aumento nos níveis de neutrófilos, nesse grupo.

Quanto aos demais animais pertencentes aos grupos Ale e Con, os níveis de neutrófilos não tiveram valores elevados. Acredita-se que esses resultados foram encontrados devido esses animais não terem sido submetidos ao desafio alérgico, sendo assim, os grupos Ale e Con não foram expostos a reações alérgicas durante o experimento, por isso, era esperado que os números de neutrófilos nesses animais não variasse significativamente durante o estudo, mesmo o grupo Ale tendo sido sensibilizado a OVA, uma vez que estes não foram submetido ao desafio alérgico com OVA.

Em estudo realizado por Baqueiro e colaboradores em 2010, no qual os animais foram sensibilizados a *Blomiatropicalis* (*Bt*). Diferente da nossa pesquisa o número de neutrófilos no sangue periférico dos camundongos C57BL/6 alérgicos também não foi significativo em relação aos seus controles, estes autores atribuíram esse resultado ao pouco tempo de pesquisa, pois os mesmos testaram a alergia respiratória em camundongos de várias linhagens dentre elas a C57BL/6, também em um modelo de curto prazo experimental, e apesar de terem utilizado alérgeno e metodologia diferentes das do nosso estudo, o curto período não possibilitou a observação desses leucócitos, diferente do observado em nossa pesquisa que também teve curto período de duração e, no entanto foi possível observar diferenças estatísticas na contagem desses leucócitos, o que indica que esses animais apresentaram uma resposta alérgica acentuada que não foi contida no curto período de tratamento.

Outro leucócito participante das respostas de hipersensibilidade imediata são os monócitos, estes são células produzidas na medula óssea e liberadas no sangue, onde circulam antes de se estabelecerem em local específico permanente, sendo denominados então de macrófagos. Estas células são importantes para o sistema imune celular inespecífico (natural), por apresentarem capacidade de fagocitose, atividade microbicida e também por produzirem citocinas que regulam a resposta tanto inespecífica (natural) quanto específica (adquirida) (ABBAS et al., 2012).

Em nosso estudo foi observado que apenas apresentaram diferenças estatísticas na contagem de monócitos os grupos Ale e Ale+Ome, os quais foram submetidos aos procedimentos de indução da alergia alimentar a ovalbumina nos dias 0 e 14 do estudo, enquanto os grupos Con e Ome não apresentaram significativa diferença na contagem desses leucócitos ao longo do experimento. O que indica um possível processo anafilático nos grupos

Ale e Ale+Ome, uma vez que em nosso modelo de alergia foram utilizados camundongos C57BL/6 que fazem uma resposta alérgica mais tardia (Th1) (REIS, 2006).

No entanto, é importante destacar que os animais alérgicos tratados com ômega 3 apresentaram médias de monócitos inferiores a dos animais alérgicos que não foram tratados com esse ácido graxo, mostrando que mesmo esses animais tendo apresentado valores de monócito estatisticamente superiores do que os animais controle não tratados com o óleo de peixe, a resposta alérgica foi menos exacerbada do que nos animais alérgicos não tratados, o que indica que mesmo em curto período de tratamento o ômega-3 teve efeito imunomodulador, uma vez que estes promovem diminuição da oferta do ácido araquidônico que dá origem a mediadores lipídicos com caráter inflamatório (ABBAS et al., 2011). Além de inibirem o rolamento de leucócitos para a corrente sanguínea (BASSAGANYA-RIERA, 2010).

Sendo assim a suplementação com ômega 3 pode ter sido eficiente na diminuição dos mediadores humorais da resposta alérgica como as prostaglandinas e principalmente os leucotrienos, este atua em receptores específicos para ativação de monócitos e consequente proliferação de macrófagos (SILVA, 2006).

Ainda em relação à leucometria, cabe dizer que os linfócitos são leucócitos responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, e atuam na produção de anticorpos, memória imunológica, além de promoverem a liberação de fatores que regulam a resposta imunológica, como as citocinas (FERRAZ, 2011). Em nosso estudo houve significativas diferenças na contagem de linfócitos para os animais dos grupos Ale+Ome e Ome, enquanto os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas (Con e Ale), sendo que a diferença encontrada se deu ao final do estudo, quando os animais teste (Ale+Ome) e controle Ome apresentaram maiores valores de linfócitos quando comparado com os demais dos grupos (Con e Ale). No entanto apesar dos animais teste alérgicos tratados com ômega-3 terem apresentado números de linfócitos estatísticos ao longo do estudo, os animais alérgicos que não foram tratados com ômega-3 apresentaram médias de linfócitos maiores do que o grupo teste nas análises realizadas após o tratamento com o ômega-3, o que mostra a eficácia desses ácidos graxos na modulação da resposta alérgica. Uma vez que o grupo alérgico que recebeu apenas ração padrão apresentou medianas maiores do que os demais grupos.

Pompéia em 2000 citou que em modelos experimentais de animais alimentados com dietas ricas em ácidos graxos ômega-3, estes tendem a diminuir a resposta proliferativa de linfócitos, como encontrado em nosso modelo.

Em relação aos animais controle Ome, os quais não tiveram alergia alimentar induzida e mesmo assim apresentaram níveis elevados de linfócitos quando comparados com os animais Controle que também receberam apenas ração padrão, acredita-se que esses linfócitos de apresentaram elevados pelos mesmos motivos que provocaram o aumento no número de neutrófilos, ou seja, por alguma infecção, que não pode ser avaliada em nosso estudo, ou mesmo pelo estresse causado devido a restrição alimentar ao final do experimento (CHABEL, et al., 2009; LOPES, et al., 2009), pois como já dito anteriormente houve uma redução significativa no consumo de ração nesse grupo no período final da pesquisa, concomitante ao aumento dos níveis de linfócitos.

Diante do disposto, pode-se destacar que mesmo não existindo diferença estática na contagem total de leucócitos, foi observado variação significativa entre os diferentes tipos de leucócitos, principalmente nos grupos Ale+Ome e Ome que receberam ração acrescida com ômega-3. No entanto, deve-se referir que apesar dos animais alérgicos não tratados (Ale) não terem apresentado variações estatísticas na contagem de neutrófilos, linfócito e leucócitos totais, estes animais apresentaram resultados estatísticos para os monócitos, e não demonstraram perda de peso que pode ter sido mascarada pela presença de edema, o que indica que mesmo não aparentando níveis estatísticos de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos, possivelmente esses animais apresentaram resposta anafilática. Uma vez que estes animais apresentaram maior tendência de aumento nos leucócitos, monócitos e linfócitos ao final do estudo quando comparados com animais alérgicos que foram tratados com ômega-3, demonstrando um potencial efeito imunomodulador do ômega-3.

Dessa forma, mesmo o experimento não demonstrando um resposta estatisticamente significativa do ômega-3 na alergia alimentar induzida contra a ovalbumina para o nosso modelo experimental, acredita-se que este ácido graxo teve efeito biológico, uma vez que os animais tratados apresentaram maior tendência de redução de leucócitos ao final do estudo, o que nos leva a inferir que este composto apresenta um potencial efeito antialérgico.

10. CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível observar que os animais apresentaram características típicas do processo alérgico como à perda de peso, redução no consumo de ração, número elevado de linfócitos, neutrófilo e monócitos ao longo do experimento. No entanto após o tratamento com ômega-3 observou-se que os animais alérgicos não tratados com ômega-3, proveniente do óleo de peixe, apresentavam número maior de leucócitos do que os animais tratados com ração acrescida de ômega-3. Dessa forma, pode-se inferir estes valores a um possível efeito imunomodulador do ômega-3, pois mesmo em um modelo de curto prazo experimental, foi possível observar que os animais tratados com o óleo de peixe apresentaram níveis de leucócitos totais, linfócito e monócitos inferiores aos animais que não receberam ração acrescida com óleo de peixe.

Sendo assim os resultados encontrados condizem com um grande número de estudos em animais que indicam que o óleo de peixe, administrado nas mais variadas dosagens, induz um decréscimo em determinados parâmetros imunes apresentando assim efeito biológico. Porém os estudos são ainda inconclusivos em decorrência dos diversos desenhos experimentais empregados. Mas, em geral, os relatos são de que o tratamento com ômega-3 leva a uma diminuição da resposta proliferativa de linfócitos, redução da quimiotaxia de monócitos e neutrófilos, redução da produção de IL1, IL2, IFN- γ , IL6 e TNF, além da menor expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) II e de algumas moléculas de adesão em monócitos.

Sendo assim, embora a literatura esteja repleta de estudos inconsistentes, é evidente que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 apresentam grande potencial em afetar a função da maioria das células imunes. Pois como elucidado nesse estudo, a ingestão alimentar deste tipo de ácido graxo modula uma série de eventos envolvidos nos processos alérgicos.

No entanto, são necessárias mais pesquisas envolvendo o uso e os possíveis benefícios dos ácidos graxos ômega-3 em toda a dinâmica imune das reações alérgicas com o objetivo de encontrar melhores protocolos para a avaliação do efeito imunomodulador dos ácidos graxos ômega-3. Diante disso sugere-se novos estudos com o intuito de melhor quantificar os marcadores importantes das respostas alérgicas como os eosinófilos, imunoglobulinas-E (IgE), IFN- γ , IL6 e TNF dentre outros que não puderam ser avaliados em nosso experimento.

11. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. et al. *Imunologia celular e molecular*. 7.ed. Rio de Janeiro: Saunders, 2012.

ARAUJO, Maria Ilma. et al. Sistema de regulação da resposta imune alérgica. *Gaz. méd. Bahia*, n.78, p.18-25, out. 2008

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NUTROLOGIA. *Terapia Nutricional no Paciente com Alergia ao Leite de Vaca*. Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/9_volume/terapia_nutricional_no_paciente_com_alergia_ao_leite_de_vaca.pdf> Acesso em: 12 abr. 2012.

BAQUEIRO. et al. Alergia respiratória a *Blominatropicalis*: A resposta imune em quatro linhagens de camundongos isógenos e avaliação de uma baixa dose de alérgeno, modelo de curto prazo experimental, *Respiratory Research*, v.11, 2010.

BASSAGANYA-RIERA. Ácido linoleico conjugado e n-3 ácidos graxos poliinsaturados na doença inflamatória intestinal. *Current Opinion in Clinical Nutrition e Cuidados Metabólica*, v.13, n.5, p.569-573, 2010.

BASSO, et al. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. *Brain Res*, v.1009, n.1-2, p.181-188, maio. 2004.

BREWE. et al. Aluminium 24. hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13 mediated signaling. *J Immunol*, v.163, p.6448-54. 1999.

BRUUNSGARD. Exercise induces recruitment of Lymphocytes with an activated phenotype and short telomeres. *Life Sci*, v. 18, p.383-95, 1999.

CAMPOS, Stepheny Carneiro de. et al. Influência da Suplementação com Ácidos Graxos n-3 no Desenvolvimento do Estresse Oxidativo em Camundongos. UNOPAR: *Cient Ciênc Biol Saúde*, v.13, n.4, p.251-6, set. 2011.

CARA. et al. Immunological induction of flavor aversion in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.27, p.1331-1341. 1994.

CARA. et al. Immunological induction of flavour aversion in mice. II. Passive/adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.45, p.16-20. 1997.

CHABEL, et al., Efeito de um complexo homeopático “*HomeobaseConvert H®*” em ovinos sob condições de restrição Alimentar. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v. 46, n. 5, p. 412-423, 2009.

CHOI, E.M. et al. Immune cell stimulating activity of mucopolissacharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J. Ethnopharmacol*, v.91, p.1-6, 2004.

CIANFERONI. et al. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int*, v.58, n.4, p.457-66. 2009.

CONSENSO BRASILEIRO SOBRE ALERGIA ALIMENTAR, Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia, *Rev. bras. alerg. imunopatol*, 2008. Disponível em:<<http://www.funcionali.com/php/admin/uploaddeartigos/Consenso%20Brasileiro%20sobre%20Alergia%20Alimentar.pdf>>. Acesso em: 22 de ago. 2011.

CUNHA. et al. Variação na contagem de leucócitos em *Callithrix jacchus*(Linnaeus, 1758) submetidos a uma situação de estresse agudo. *Revista Brasileira de Zoociencias*, v.7, p. 217-29, 2005.

DELANO. et al. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. *Nutr Clin Pract*, v.21, n.1, p.68-81. fev. 2006.

DOURADO, Luana Pereira Antunes, *Participação das citocinas na aversão e alergia alimentar induzida à ovalbumina em camundongos*, 2006. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

DUARTE, Antonio Cláudio, *Semiologia Imunológica Nutricional*, 1.ed. Rio de Janeiro: Axcel books, 2003.

FERRAZ. et al. Ação da própolis sobre as proteínas do soro e aspectos hematológicos em *Callithrix sp.* Submetidos ao estresse em cativeiro. *Vet. E Zootec*, v.18, n.1, p.70-80, mar. 2011.

FOSTER. et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*, n.183, p.195-201, 1996.

GARCIA. et al. A general theory of aversion learning. *Ann. N.Y.Acad. Sci*, v.443, p.8-21, 1985.

GUALDI, Lucien Peroni. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada, *Scientia Medica*, v.20, n. 3, p. 236-242, 2010.

HODGE. et al. Food allergy and intolerance. *Aust Fam Physician*, v.38, n.9, p.705-7. 2009.

JOHANSSON S. et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *J Allergy ClinImmunol*. n.113, p. 832-6. 2004.

KELLEY . Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*, v.17, p.669-673. set/ago. 2001.

LEHR, et al. Óleo de peixe reduz leucócitos / endotélio interação após a administração sistêmica da lipoproteína de baixa densidade oxidadas baixo. *Circulation*, v.84, n.4, p.1725-1731. 1991

LOPES, Heitor Corrêa. et al. Homeopatia no comportamento de camundongos sob estresse agudo. *Rev. Bras. Saúde Prod. An*, v.10, n.4, p.840-851 out/dez. 2009.

LOPEZ, et al. *Nutrição e Dietética em Clínica Pediátrica*. São Paulo: Atheneu; 2003.

MADUREIRA, Efeitos antiinflamatórios dos ácidos gordos poliinsaturados n-3 de cadeia longa, *revista Nutricias*, n.7, p.25, 2008.

MARTINS et al. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados: Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça, *Ver Ins tCiênc Saúde*, v.26, p.153-6, fev. 2007.

MATOS, Olívia Gonçalves de. et al., Suplementação dietética com ácidos Omega-3-PUFA-Rich óleo de peixe reduz os sinais de alergia alimentar em camundongos sensibilizados à ovalbumina, *Clin Immunol Dev*, 2012.

MATYSIAK-BUDNIK. et al. Alergia alimentar e *Helicobacter pylori*. *Jornal de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição*, v.34, n.1, p.5-12. 2002.

MOLLICA, Juliana Quadros, *Potencial de Dioscoreatrifida L.f. E DioscoreaoppositaThunb. (dioscoreaceae, inhames) no tratamento da alergia alimentar induzida com ovalbumina em camundongos BALB/c. 2011*. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MOREIRA, Letícia Figueiredo, *Estudo dos Componentes Nutricionais e Imunológicos na Perda de Peso em Camundongos com Alergia Alimentar*. Dissertação (Mestrado) programa de pós-graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

MORROW-TESCH, et al. consequences of restraint stress on natural killer activity, behavior, and hormone levels in rhesus macaques (MacacaMulatta). *Psychoneuroendocrinology*, v.18, p. 383-95, 1993.

NETTLETON. Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *J Am Diet Assoc*. v.91, p.331-7, maio, 1991

NOWAK-WEGRZYN. New Perspectives for Use of Native and Engineered Recombinant Food Proteins in Treatment of Food Allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, v.27, n.1, p.105–127, 2007.

POMPÉIA. et al. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res*, p.33, n.11, p.1255-68, 2000.

REIS, Luiza de Campo. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana, *Revista de Patologia Tropical*, v. 35, n.2, p.103-115, maio/ago. 2006.

REIS, Maria Letícia Costa. *Efeito do tratamento com selênio orgânico, vitamina E e aminoguanidina na alergia alimentar induzida em camundongos*. Dissertação (Mestrado) - Programade Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SALDANHA. et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Medical and BiologicalResearch*. v.37, p. 809-816, 2004.

SEIDMAN E. et al, Alergia alimentar e gastroenteropatiaeosinofílica: Gastroenterologia e hepatologia em pediatria. Rio de Janeiro: Medsi; 2003.

SICHERER. et al. A alergia alimentar. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.125, n.2, p.116-125. 2010.

SICHERER. et al. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu. Rev. Med.*, v.60, p.261-277, 2009.

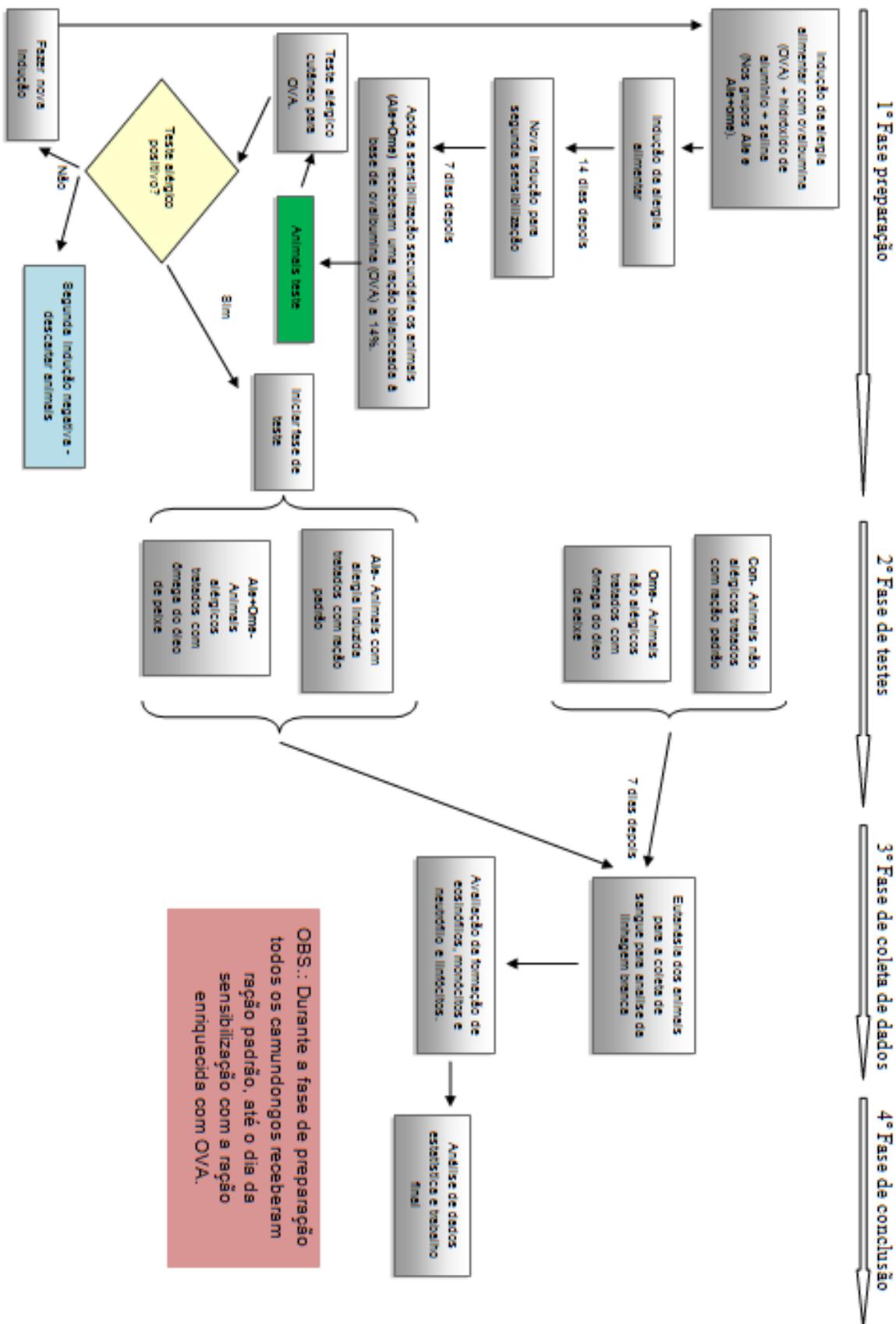
SILVA. Farmacologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

TEIXEIRA, Ana Rita Neves. *Alergias Alimentares na Infância*, 2010. (Monografia)- Faculdade de Ciência da Alimentação e Nutrição, Universidade do Porto, Porto, 2010.

TEWTRAKUL. et al. Anti-allergic substances from rhizomesof Dioscoreamem branacea. *Bioorganic Med. Chemistry*, v.14, p.8707-8711, 2006.

WANG. et al. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Allergy Asthma Immunol Res*, v.1, n.1, p.19-29. 2009.

APÊNDICE A



APÊNDICE C

Tabela 4

Média, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo da variação do peso dos animais pertencentes aos grupos controles (Con, Ome e Ale) e teste (Ale+Ome) ao longo do estudo.

GRUPO	Dia de coleta	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Percentil máximo	Percentil mínimo
Con	Dia 0	5	22,24	0,67	22,60	24,00	20,20
Con	Dia 7	4	21,44	0,25	21,40	22,40	20,90
Con	Dia 14	4	21,34	0,52	21,60	22,40	19,60
Con	Dia 21	4	21,55	0,25	21,60	22,10	20,90
Con	Dia 23	4	21,80	0,60	21,80	22,90	20,70
Con	Dia 28	4	21,05	0,33	21,20	21,70	20,10
Con	Dia 30	4	21,60	0,26	21,65	22,10	21,00
Ome	Dia 0	5	20,66	1,26	21,70	22,80	15,70
Ome	Dia 7	5	20,30	1,4	22,30	22,50	15,50
Ome	Dia 14	5	20,52	0,97	21,30	22,20	16,70
Ome	Dia 21	5	20,92	1,01	21,40	22,60	17,00
Ome	Dia 23	5	21,18	0,87	21,90	22,50	17,80
Ome	Dia 28	5	17,38	0,77	18,10	18,50	14,30
Ome	Dia 30	5	15,94	0,72	16,50	17,20	13,20
Ale*	Dia 0	5	22,44	0,85	22,80	24,50	19,40
Ale*	Dia 7	5	21,60	1,06	22,30	23,70	18,00
Ale*	Dia 14	5	21,14	0,97	21,30	23,90	18,20
Ale*	Dia 21	5	20,88	1,16	21,30	24,10	17,00
Ale*	Dia 23	5	21,02	1,05	21,80	23,80	17,50
Ale*	Dia 28	5	21,80	1,01	22,80	24,20	18,60
Ale*	Dia 30	5	21,64	0,85	22,40	23,90	19,40
Ale+Ome*	Dia 0	5	20,82	0,34	20,70	21,80	19,70
Ale+Ome*	Dia 7	5	21,22	0,59	21,30	22,70	19,40

Ale+Ome*	Dia 14	5	20,92	0,47	20,50	22,60	19,80
Ale+Ome*	Dia 21	4	20,76	0,71	21,70	22,10	18,60
Ale+Ome*	Dia 23	5	21,24	0,62	21,70	22,90	19,30
Ale+Ome*	Dia 28	5	21,24	0,68	18,00	20,10	16,10
Ale+Ome*	Dia 30	4	16,65	0,65	16,75	17,90	15,20

*Animais alérgicos.

APÊNDICE D

Tabela 5

Média em gramas, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo do consumo dos diferentes tipos de ração oferecidas ao longo do estudo aos animais pertencentes aos grupos controles Con, Ome e Ale e teste Ale+Ome.

GRUPOS	Consumo de ração durante o experimento					
	n	Média (g)	Desvio padrão	Mediana	Percentil máximo	Percentil mínimo
Con	4	12,77	±0,4	13,40	18,60	14,10
Ome	5	11,67	±0,7	13,20	17,13	14,55
Ale*	5	12,15	±0,3	12,80	15,20	14,00
Ale+Ome*	5	10,68	±0,9	11,10	19,40	14,95

*Animais alérgicos.

Tabela 6

Correlação entre o peso corpóreo dos animais e o consumo dos diferentes tipos de ração oferecidas ao longo do estudo aos animais pertencentes aos grupos controles Con, Ome e Ale e teste Ale+Ome.

GRUPOS	Consumo de ração e variação do peso durante todo experimento						
	Nº de animais	Mediana do peso	Mediana do consumo	Percentil máximo do peso	Percentil máximo do consumo	Percentil mínimo do peso	Percentil mínimo do consumo
Con	4	21,560	13,05	21,80	14,10	21,20	9,80
Ome	5	21,35	10,40	22,30	16,20	16,50	1,30
Ale*	5	22,05	12,70	22,80	14,10	21,30	10,80
Ale+Ome*	5	20,90	11,05	21,70	19,40	16,75	2,400

*Animais alérgicos.

APÊNDICE E

Tabela 8

Valores médios, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo de neutrófilos encontrados no sangue periférico dos animais pertencentes os grupos controle com ração padrão (Con), controle com ração enriquecida com ômega 3 (Ome), controle alérgicos (Ale) com ração padrão e grupo testes alérgico (Ale+Ome) que recebeu o tratamento com ração enriquecida com ômega 3. Foi utilizado o teste Kalmagona-snirnav (KS).

GRUPO	Dia de coleta	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Percentil máximo	Percentil mínimo
Con	Dia 0	5	16,67	±5,9	14,00	28,00	8,000
Con	Dia 14	4	32,25	±4,4	31,00	44,00	23,00
Con	Dia 23	4	25,00	±3,8	23,00	36,00	18,00
Con	Dia 30	4	17,75	±1,8	18,00	21,00	14,00
Ome	Dia 0	5	26,60	±4,5	24,00	40,00	14,00
Ome	Dia 14	5	53,60	±5,3	59,00	67,00	39,00
Ome	Dia 23	5	23,60	±0,5	24,00	25,00	22,00
Ome	Dia 30	5	47,40	±5,6	51,00	59,00	32,00
Ale*	Dia 0	5	17,40	±3,5	14,00	30,00	11,00
Ale*	Dia 14	5	35,20	±6,7	40,00	48,00	10,00
Ale*	Dia 23	5	28,60	±3,4	33,00	35,00	18,00
Ale*	Dia 30	5	24,80	±9,3	15,00	62,00	13,00
Ale+Ome*	Dia 0	5	14,75	±0,4	14,50	16,00	14,00
Ale+Ome*	Dia 14	5	43,40	±5,3	42,00	56,00	26,00
Ale+Ome*	Dia 23	5	48,00	±9,1	38,00	71,00	27,00
Ale+Ome*	Dia 30	4	62,50	±7,0	61,00	81,00	47,00

*Animais alérgicos.

APÊNCICE F

Tabela 9

Valores médios, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo dos monócitos séricos dos animais pertencentes os grupos controle com ração padrão (Con), controle com ração enriquecida com ômega 3 (Ome), controle alérgicos (Ale) com ração padrão e grupo testes alérgico (Ale+Ome) que recebeu o tratamento com ração enriquecida com ômega 3. Foi utilizado o teste Kalmagona-snirnav (KS).

GRUPO	Dia de coleta	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Percentil máximo	Percentil mínimo
Con	Dia 0	5	2,33	0,8	2,00	4,000	1,000
Con	Dia 14	4	6,50	2,3	5,50	13,00	2,000
Con	Dia 23	4	3,25	1,1	4,000	5,000	0,0
Con	Dia 30	4	7,50	3,1	4,500	17,00	4,000
Ome	Dia 0	5	7,80	1,9	6,000	13,00	3,000
Ome	Dia 14	5	11,20	1,4	11,00	15,00	7,000
Ome	Dia 23	5	3,80	1,7	2,000	10,00	1,000
Ome	Dia 30	5	7,60	2,4	7,000	14,00	1,000
Ale*	Dia 0	5	11,20	1,5	10,00	15,00	8,000
Ale*	Dia 14	5	13,40	3,0	15,00	22,00	4,000
Ale*	Dia 23	5	5,80	5,8	5,000	10,00	4,000
Ale*	Dia 30	5	3,80	0,6	4,000	6,000	2,000
Ale+Ome*	Dia 0	5	4,25	0,8	4,500	6,000	2,000
Ale+Ome*	Dia 14	5	11,00	2,4	11,00	17,00	3,000
Ale+Ome*	Dia 23	5	5,80	5,9	7,000	8,000	3,000
Ale+Ome*	Dia 30	4	2,25	0,7	2,000	4,000	1,000

*Animais alérgicos.

APÊNDICE G

Tabela 10

Valores médios, desvio padrão com erro, mediana e percentis máximo e mínimo de linfócitos no sangue periférico dos animais pertencentes aos grupos controle com ração padrão (Con), controle com ração enriquecida com ômega 3 (Ome), controle alérgicos (Ale) com ração padrão e grupo testes alérgico (Ale+Ome) que recebeu o tratamento com ração enriquecida com ômega 3. Foi utilizado o teste Kalmagona-sniirnav (KS).

GRUPO	Dia de coleta	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Percentil máximo	Percentil mínimo
Con	Dia 0	5	81,33	±6,8	85,00	91,00	68,00
Con	Dia 14	4	61,25	±5,4	61,50	72,00	50,00
Con	Dia 23	4	71,75	±4,4	74,50	79,00	59,00
Con	Dia 30	4	74,75	±4,6	77,50	82,00	62,00
Ome	Dia 0	5	66,80	±6,1	65,00	83,00	47,00
Ome	Dia 14	5	35,00	±5,8	33,00	52,00	18,00
Ome	Dia 23	5	72,60	±2,0	75,00	77,00	66,00
Ome	Dia 30	5	45,00	±7,1	37,00	63,00	27,00
Ale*	Dia 0	5	73,00	±3,7	71,00	84,00	62,00
Ale*	Dia 14	5	51,40	±7,0	48,00	75,00	33,00
Ale*	Dia 23	5	69,00	±4,4	72,00	78,00	56,00
Ale*	Dia 30	5	69,80	±9,9	81,00	85,00	32,00
Ale+Ome*	Dia 0	5	81,00	±0,5	81,00	82,00	80,00
Ale+Ome*	Dia 14	5	45,60	±7,0	43,00	71,00	32,00
Ale+Ome*	Dia 23	5	46,20	±9,5	58,00	65,00	22,00
Ale+Ome*	Dia 30	4	35,25	±6,9	35,50	52,00	18,00

*Animais alérgicos.