

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

Marcilene Gomes Evangelista Ambrósio

**Obesidade e Esofagite Eosinofílica:
Caracterização Imunopatológica e Efeito do Tratamento com Cromoglicato de Sódio**

Juiz de Fora

2019

Marcilene Gomes Evangelista Ambrósio

**Obesidade e Esofagite Eosinofílica:
Caracterização Imunopatológica e Efeito do Tratamento com Cromoglicato de Sódio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Doutora em Saúde. Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ana Paula Ferreira

Co-Orientadora: Dr^a. Flávia Márcia de Castro Silva

Juiz de Fora

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ambrósio, Marcilene Gomes Evangelista.

Obesidade e Esofagite Eosinofílica: Caracterização Imunopatológica e Efeito do Tratamento com Cromoglicato de Sódio / Marcilene Gomes Evangelista Ambrósio. -- 2019.
133 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Coorientadora: Flávia Márcia de Castro Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2019.

1. Esofagite Eosinofílica. 2. Obesidade. 3. Alergia . 4. Cromoglicato de sódio. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. de Castro Silva, Flávia Márcia, coorient. III. Título.

Marcilene Gomes Evangelista Ambrósio

**Obesidade e Esofagite Eosinofílica:
Caracterização Imunopatológica e Efeito do Tratamento com Cromoglicato de Sódio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Doutora em Saúde. Área de concentração: Imunologia

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Paula Ferreira - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Isabel Vieira de Assis Lima
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde

Dr. Fábio Barrozo do Canto
Universidade Federal Fluminense

Dra. Ana Eliza Andreazzi
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho

*ao meu pai,
minha referência de caráter e honestidade.*

*O maior homem que já conheci e,
o melhor pai que alguém poderia ter.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada detalhe trabalhado em minha vida, por ter iluminado o meu caminho durante todos esses anos e, ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir, crescer e conhecer todas as pessoas que citarei abaixo.

Aos meus pais, J3sus (*in memoriam*) e Ivone, por tudo que fizeram em minha vida, especialmente quanto à minha forma33o.

Ao meu esposo Rodrigo, grande incentivador e companheiro, que me apoiou em todos os momentos, n3o me deixando jamais desistir. Meu exemplo de persist3ncia e coragem, que me ensinou a nunca abandonar um sonho, mesmo que tudo conspire contra.

A minha querida irm3 M3rcia, meu cunhado Jerry, e aos meus sobrinhos, Fellipe e Lorena, por torcerem por mim, compreenderem minha aus3ncia em certos momentos e, principalmente, pelo est3mulo, contribuindo em mais essa etapa de minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, por ter acreditado em mim e na possibilidade de execu33o desse trabalho e, principalmente, pelos grandes ensinamentos que me proporcionou.

À minha co-orientadora Dra. Fl3via, exemplo de dedica33o, persist3ncia e amor pelo o que faz. Incans3vel, adjetivo que a melhor define, sempre disposta e com ideias essenciais que contribu3ram de forma direta para a finaliza33o desse trabalho. Minha eterna gratid3o pela oportunidade de estar ao seu lado nesses anos e ter aprendido, al3m de tudo, a ser perseverante.

Aos professores Henrique e Jacy, pelos ensinamentos e por se disponibilizarem a contribuir sempre. A professora Dion3ia, que mesmo de forma indireta, pude aprender muito com seu profissionalismo e dedica33o.

A professora Juciane, a qual posso, com toda certeza, chamar de amiga, obrigada por tudo que compartilhamos.

Em especial, ao professor Gilson, por nos ajudar em momentos cruciais de maneira t3o s3bia e por estar sempre presente com uma palavra incentivadora e alegre.

Aos amigos Erick e Marina, com os quais dividi muitas horas de trabalho. Compartilhamos momentos de ansiedade, cansa3o e realiza33es. Muito obrigada pelas palavras e atitudes de incentivo. Imposs3vel esquecer de pessoas t3o especiais, fizeram parte de maneira direta nessa etapa de minha vida. A colabora33o de voc3s foi indispens3vel para a realiza33o e conclus3o dessa tese. Erick, uma pessoa fant3stica, inteligente e muito dedicada. Obrigada, pelo

carinho e paciência nos “cálculos” noite a dentro. Gostaria de fazer um agradecimento especial à Marina, sempre disposta a ajudar, uma grande companheira e uma amiga que levarei para vida toda.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Imunologia, pelo convívio e por me acolherem com tanto carinho, em especial a Poly, Bárbara, Luiz e Ari, que dedicaram muitas horas de seu dia a ajudar de forma incondicional sempre.

Ao Luan, um amigo de todas as horas, presente desde o início, há 9 anos. Obrigada por de alguma forma, fazer parte desse momento.

Aos amigos Sandra, Alyria e Caio Cesar, com os quais iniciei minha caminhada na pesquisa, e aprendi muito, não poderia deixar de citá-los.

Aos alunos de iniciação científica que contribuíram com profissionalismo e responsabilidade. A Noemy, Elisa e Viviane, personagens fundamentais na execução desse trabalho.

À Sirley e Leidiana, pessoas excepcionais, de um coração puro, sempre prontas a ajudar com presteza e muito carinho. Com a Sirley, dividi momentos de angústia e dificuldade, mas sua sabedoria, me incentivou e me guiou com uma “mãe”, obrigada.

Aos amigos que, mesmo distantes, me acompanham, me incentivam e torcem por mim. Em especial ao Márcio, por ter sido o responsável pelo início dessa caminhada. À Cláudia e Luciana, por estarem sempre ao meu lado e entenderem a minha ausência. Obrigada a todos pelo carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFJF, pelo apoio financeiro indispensável para a elaboração do projeto e produção científica.

E a todos que de alguma maneira me ajudaram a concluir esse trabalho e me deram o incentivo para leva-lo adiante.

“Prefiram a minha instrução à prata, e o conhecimento ao ouro puro, pois a sabedoria é mais preciosa do que rubis; nada do que vocês possam desejar compara-se a ela”.

Provérbios 8:10-11

RESUMO

A esofagite eosinofílica (EoE) é uma doença inflamatória crônica que apresenta sintomas clínicos como disfagia, vômitos, impactação alimentar, dor retroesternal e epigástrica. Na EoE a resposta imune é caracterizada por níveis séricos elevados de IgE antígeno-específica e uma resposta imune de perfil Th2, com aumento das citocinas IL-4 e IL-5. É uma patologia de difícil diagnóstico e tratamento. Sua prevalência vem aumentando significativamente nas últimas décadas em todo o mundo. Dentre os vários fatores que podem estar contribuindo para esse aumento estão mudanças no estilo de vida, principalmente quando relacionado a hábitos alimentares e sedentarismo. Relacionado a isso, está a obesidade que é uma doença inflamatória crônica e sistêmica, caracterizada por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Acredita-se que esta inflamação participe da etiologia de várias doenças autoimunes e alérgicas. No entanto, não existe ainda na literatura estudos com o objetivo de avaliar se a obesidade tem alguma influência no desenvolvimento ou agravamento da inflamação eosinofílica da EoE. Por isso o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da obesidade e o efeito do tratamento com cromoglicato de sódio (CG), sobre a resposta imune na EoE. Para isso foi utilizado camundongos machos BALB/c, nos quais foi induzida a obesidade por dieta hiperlipídica, por dez semanas e houve também, a indução do modelo de EoE, que ocorreu pela administração subcutânea e desafios orais com ovalbumina (OVA). O tratamento com CG foi concomitante ao protocolo de indução da alergia. A dieta hiperlipídica promoveu aumento da massa corporal, acúmulo de gordura perigonadal, além do aumento da glicemia de jejum, triglicerídeos (TG), colesterol total (Col), colesterol-HDL (lipoproteína de alta densidade - HDL-C) e colesterol-LDL (lipoproteína de baixa densidade - LDL-C), TNF- α e leptina. A obesidade promoveu, nos animais desse grupo, um maior aumento de mastócitos, eosinófilos e remodelamento tecidual acompanhado de maior expressão de RNAm de TSLP, menor expressão dos RNAm de Foxp3 e IL-10, após os desafios com a OVA, quando comparado ao grupo alérgico magro. Esse acúmulo de células no tecido esofágico foi associado a um maior número de linfócitos Th2, DCs CD11c⁺MHC^{hi}CD80⁺, em ambos órgãos linfoides periféricos. Em contraste, houve redução no número de DCs CD11c⁺MHC^{hi}PDL1⁺ e linfócitos B CD19⁺CD40⁺, no baço. Os níveis de IgE antígeno-específica estavam reduzidos nos animais obesos alérgicos comparados aos alérgicos magros. Os animais obesos, apresentaram aumento de mastócitos e eosinófilos independente da indução da alergia. O tratamento com CG, reduziu o número de mastócitos, eosinófilos e o remodelamento tecidual. Também induziu o aumento de células T regulatórias CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em ambos órgãos linfoides e aumentou a expressão do RNAm de IL-10 no tecido esofágico. Dessa forma, a obesidade aumentou o risco de desenvolvimento e agravamento da EoE, mediado pelo desequilíbrio entre os mecanismos regulatórios e efetores. Esses dados fornecem um novo conhecimento sobre outro fator de risco para EoE, contribuindo para futuras estratégias de tratamento em subgrupos de pacientes específicos. Reforçando também, o efeito protetor do cromoglicato de sódio, que poderia ser utilizado como mais uma abordagem terapêutica na prevenção e tratamento da EoE.

Palavras-chave: Esofagite Eosinofílica. Obesidade. Alergia. Cromoglicato de sódio.

ABSTRACT

Eosinophilic esophagitis (EoE) is a chronic inflammatory disease that presents clinical symptoms such as dysphagia, vomiting, food impaction, retrosternal and epigastric pain. The immune response in EoE is characterized by elevated serum levels of antigen-specific IgE and a Th2 immune response profile, with increased IL-4 and IL-5 cytokines. It is a difficult to diagnose disease and so to treat. Its prevalence has been significantly increased in the recent decades around the world. Lifestyle changing is among the several factors that may be contributing to this increasing, especially when related to eating habits and sedentarism. Related to it there is obesity, a chronic and systemic inflammatory disease characterized by elevated levels of proinflammatory cytokines. It is believed that this inflammation participates in the etiology of various autoimmune and allergic diseases. However, there are no studies in the literature to evaluate whether obesity has any influence on the development or worsening of eosinophilic inflammation of EoE. Therefore, the present study aimed to evaluate obesity influence and treatment effect with sodium cromoglycate (CG) on the immune response in the EoE. For this male Balb/c mice were used, in which obesity was induced by a hyperlipid diet for ten weeks. There was also EoE model induction, which occurred by subcutaneous administration and ovalbumin (OVA) oral challenges. GC treatment was concomitant with the allergy induction protocol. The hyperlipid diet has promoted increased body mass, accumulation of perigonadal fat, and increased fasting glycemia, triglycerides (TG), total cholesterol (Col), HDL-cholesterol (HDL-C), and LDL-cholesterol (low density lipoprotein - LDL-C), TNF- α and leptin. Obesity promoted a greater increase in mast cells on the animals in the group, also an increase of eosinophils and tissue remodeling accompanied by higher TSLP mRNA expression, Foxp3 lower expression and IL-10 mRNA, after the OVA challenge, when compared to the lean allergic group. Esophageal tissue cell accumulation was associated with a larger number of Th2 lymphocytes, CD11c+MHChiCD80+, in both peripheral lymphoid organs. In contrast, there was a reduction in the number of DCs CD11c+MHChi+PDL1+ and B CD19+CD40+ lymphocytes in the spleen. Antigen-specific IgE levels were reduced in obese allergic animals compared to lean allergic individuals. Obese animals have presented an increase in mast cells and eosinophils independently of allergy induction. Treatment with CG has reduced the number of mast cells, eosinophils and tissue remodeling. It also had induced the increasing of CD3+CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in both lymphoid organs and increased the expression of IL-10 mRNA in the esophageal tissue. Thus, obesity has increased the risk of development and worsening of EoE, mediated by the imbalance between regulatory mechanisms and effectors. These data provide new insight into another risk factor for EoE, contributing to future treatment strategies in specific patient subgroups. It also reinforced the protective effect of sodium cromoglycate, which could be used as a more therapeutic approach in the prevention and treatment of EoE.

Keywords: Eosinophilic Esophagitis. Obesity. Allergy. Sodium cromoglycate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1 – Prevalência mundial de EoE a partir de estimativas em estudos populacionais.....	18
Figura 2 – Resposta inflamatória na EoE.....	20
Figura 3 – O papel das citocinas epiteliais na EoE.....	22
Figura 4 – Mecanismo proposto para identificar o papel da DRGE na patogênese da EoE.....	27
Figura 5 – Representação da estrutura química da cromoglicato de sódio.....	30
Figura 6 – Prevalência da obesidade no mundo.....	32
Figura 7 – Alterações celulares no tecido adiposo na obesidade.....	34
Tabela 1 – Grupo de animais utilizados no protocolo de acordo com os procedimentos adotados.....	41
Tabela 2 – Composição das dietas padrão e hiperlipídica.....	42
Figura 8 – Delineamento experimental do protocolo de indução do modelo de obesidade e esofagite eosinofílica experimental, induzida por OVA e do Protocolo de Tratamento com Cromoglicato de Sódio.....	44
Tabela 3 – Painel de fluorocromos utilizados na fenotipagem por Citometria de Fluxo.....	54
Tabela 4 – Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento.....	56
Figura 9 – Efeito de dieta hiperlipídica em camundongos BALB/c.....	60
Figura 10 – Efeito da dieta hiperlipídica sobre as taxas de glicemia de jejum, perfil lipídico e inflamatório.....	62
Figura 11 – Modificações no diâmetro do esôfago, após indução da obesidade.....	63
Figura 12 – Contagem de Mastócitos no esôfago.....	65
Figura 13 – Contagem de Mastócitos na traqueia.....	66
Figura 14 – Contagem de Mastócitos no intestino.....	67
Figura 15 – Avaliação dos níveis séricos de IgE específica anti-OVA.....	68
Figura 16 – Avaliação da ativação mastócitos, pela liberação de triptase, no tecido esofágico.....	70
Figura 17 – Contagem de eosinófilos no esôfago.....	72
Figura 18 – Contagem de eosinófilos na traqueia.....	73
Figura 19 – Contagem de eosinófilos no intestino.....	74

Figura 20 – Avaliação da área de remodelamento no tecido esofágico.....	76
Figura 21 – Efeito da obesidade na expressão de RNAm da IL33 e TSLP.....	78
Figura 22 – Efeito da obesidade na expressão de RNAm do GATA3 e IL-5.....	80
Figura 23 – Efeito da obesidade na expressão de RNAm do FOXP3 e IL10	82
Figura 24 – N° absoluto de células CD11c+MHCIIhiCD80+, determinadas por citometria de fluxo.....	84
Figura 25 – N° absoluto de células CD11c+MHCIIhiPDL1+, determinadas por citometria de fluxo.....	85
Figura 26 – Expressão de CD80+, pela mediana de intensidade (MFI), em células dendríticas CD11c+MHCIIhi derivadas da medula óssea, estimuladas com alérgeno (OVA) e não estimuladas (MEIO).....	86
Figura 27 – Número absoluto de eosinófilos na medula óssea.....	87
Figura 28 – N° absoluto de células CD3+CD4+GATA3+IL4, determinadas por citometria de fluxo.....	89
Figura 29 – N° absoluto de células CD19+CD40, determinadas por citometria de fluxo.....	91
Figura 30 – N° absoluto de células CD3+CD4+CD25+FoxP3+, determinadas por citometria de fluxo.....	93
Figura 31 – Avaliação da ativação dos linfócitos Tregs por intensidade de fluorescência.....	94
Figura 32 – Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar.....	96
Figura 33 – Contagem de mastócitos no tecido pulmonar.....	98
Figura 34 – Citocinas de perfil Th2 no pulmão.....	99
Figura 35 – Avaliação da atividade de EPO no pulmão.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs – Células apresentadoras de antígenos (do inglês “Antigen presenting cell”)
- CCL – Ligante de quimiocina (do inglês “C-C chemokine ligand”)
- CCR – Receptor de quimiocina (do inglês “C-C chemokine receptor”)
- CD – Cluster de diferenciação (Cluster of differentiation)
- CG – Cromoglicato de sódio
- CID – (Classificação Internacional de Doenças)
- CLS – Estruturas em forma de coroa de células (do inglês “Crown like structures”)
- cm – Centímetros
- CN – Controle
- Ct – Limiar de detecção (do inglês “threshold cycle”)
- Col – Colesterol Total
- DCs – Células dendríticas
- DRGE – Doença do refluxo gastroesofágico
- DH – Dieta Hiperlipídica
- DM2 – Diabetes tipo 2
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “deoxyribonucleic acid”)
- D.O. – Densidade Ótica
- DP – Dieta Padrão
- EDTA – Etileno Diamina Tetra Acetato dissódico
- ELISA – Ensaio de Imunoadsorção associado à enzima (do inglês “Enzyme linked Immunosorbent Assay”)
- EoE – Esofagite Eosinofílica
- EPM – Erro Padrão da Média
- EPO – Peroxidase eosinofílica (do inglês “Eosinophilic Peroxidase”)
- FcεRI – Receptor I para porção Fc da Imunoglobulina-E
- g - Força da Gravidade (do inglês “g-force”)
- GM-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (do inglês “Granulocyte-macrophagecolony-stimulating factor”)
- HDL – lipoproteína de alta densidade
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- Hpf – Campo de maior aumento (do inglês “high power field”)

HTAB – hexadeciltrimetil brometo de amônio

IFN- γ – Interferon-gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

iNKT – células T "Natural Killer" invariantes

IBP – Inibidor de bomba de prótons

IBP-REE – Inibidor de bomba de prótons responsivo a Esofagite Eosinofílica

IMC – índice de massa corporal

Kg – Quilogramas

LBA – lavado broncoalveolar

LDL – lipoproteína de baixa densidade

m – Metros

μ L – Microlitros

mL – Mililitros

MHCII - Molécula de Histocompatibilidade de classe II (do inglês “Major Histocompatibility Complex II”)

MPO – Mieloperoxidase (do inglês “Myeloperoxidase”)

NK – Natural Killer (do inglês “Natural Killer Cell”)

OB – Obesidade

OB/EoE – Obesidade/Esofagite Eosinofílica

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – Ortofenilenodiamina (do inglês “O-phenylenediamine dihydrochloride”)

OVA – Ovalbumina

PBS – Tampão fosfato de salina (do inglês Phosphate Buffer Saline”)

PDL1 – Ligante de Morte Programada (do inglês “Programmed death -1”)

pH – Potencial de Hidrogênio

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (do inglês: “Quantitative Polymerase Chain Reaction “)

RNA_m - Ácido Ribonucleico mensageiro

SAL – Salina

SFED – Dieta padrão de eliminação de 6 alimentos (do inglês “Standard six Food Elimination Diet”)

SFB – Soro Fetal Bovino

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês “single nucleotide polymorphism”)

STAT5 – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 5

STAT6 – Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento-beta (do inglês “Transforming Growth Factor beta”)

TG – Triglicerídeos

Th – T auxiliares (do inglês “T helper”)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral (do inglês “Tumoral Necrose Factor”)

TRegs – T regulatórias

TSLP – Linfopoetina Estromal Tímica (do inglês “thimic stromal lymphopoieti”)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	CARACTERIZAÇÃO DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA.....	18
1.2	ESOFAGITE EOSINOFÍLICA: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	27
1.2.1	Tratamento com Cromoglicato de Sódio.....	30
2	OBESIDADE E ALERGIA	32
3	MODELO DE OBESIDADE E ESOFAGITE EOSINOFÍLICA	36
4	OBJETIVOS.....	39
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4.2.1	Validar o modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem BALB/c, através dos seguintes parâmetros:	39
4.2.2	Avaliar a influência da obesidade e os efeitos do tratamento com o cromoglicato de sódio, nos animais submetidos ao modelo de esofagite eosinofílica experimental induzida pela ovalbumina, através dos seguintes parâmetros:	39
4.2.3	Avaliar a influência da obesidade no tecido pulmonar, nos animais submetidos ao modelo de esofagite eosinofílica experimental, através dos seguintes parâmetros:	40
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.1	ANIMAIS	41
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
5.3	COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	42
5.4	INDUÇÃO DO MODELO DE OBESIDADE	43
5.5	AVALIAÇÃO DO CONSUMO DA RAÇÃO E DA MASSA CORPORAL.....	44
5.6	INDUÇÃO DO MODELO DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA EXPERIMENTAL	44
5.7	PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM CROMOGLICATO DE SÓDIO (CG)	44
5.8	OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	45
5.9	COLETA DO SORO	46
5.10	COLETA E PROCESSAMENTO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	46
5.11	COLETA DA MEDULA ÓSSEA	46
5.12	COLETA E PROCESSAMENTO DO PULMÃO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS, QUIMIOCINA CCL11 E ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO) E MIELOPEROXIDASE (MPO).	46
5.13	COLETA DO TECIDO ADIPOSEO	47

5.14	COLETA DO CECO.....	47
5.15	COLETA DO ESÔFAGO E TRAQUEIA.....	47
5.16	DOSAGEM SÉRICA DE IgE ANTI-OVA.....	48
5.17	DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA E TNF- α	48
5.18	DOSAGEM DE GLICEMIA DE JEJUM, TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES.....	49
5.19	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	49
5.20	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE GRANULÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA	50
5.21	CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO ESÔFAGO, TRAQUEIA, PULMÃO E CECO	50
5.22	CONTAGEM DE MASTÓCITOS NO ESÔFAGO, TRAQUEIA, PULMÃO E CECO	51
5.23	DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINA CCL11 NO HOMOGENATO DO TECIDO PULMONAR.....	51
5.24	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO) NO TECIDO PULMONAR.....	52
5.25	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	52
5.26	ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS NO TECIDO ESOFÁGICO ...	53
5.27	CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA	53
5.28	CITOMETRIA DE FLUXO.....	54
5.29	RT-PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DE PCR QUANTITATIVA PARA IL- 5, IL-4, IL-9, IL-13, IL-33, TSLP, CCL11, IL-10, FOXP3 E GATA3.....	55
5.30	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
6	RESULTADOS.....	58
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS BALB/c APÓS DEZ SEMANAS DE DIETA.....	58
6.1.1	Consumo das dietas padrão e hiperlipídica, ganho de peso e acúmulo de gordura perigonadal.....	58
6.1.2	A obesidade induz um estado inflamatório sistêmico nos animais estudados ...	61
6.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA, SOBRE A RESPOSTA IMUNE EM MODELO DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA.....	63
6.2.1	Obesidade causa modificações na medida do diâmetro do esôfago.....	63
6.2.2	Consumo de dieta hiperlipídica, contendo 60% de Kcal derivada de gordura, aumenta o influxo de mastócitos nos animais obesos/alérgicos.....	63

6.2.3	A obesidade e o tratamento com cromoglicato de sódio, reduziram os níveis séricos de IgE específica anti-OVA nos animais alérgicos	68
6.2.4	A obesidade aumentou a ativação de mastócitos, com intensa degranulação e liberação de mediadores químicos, o tratamento com cromoglicato de sódio reduziu esta ativação 69	
6.2.5	Avaliação do efeito obesidade e do cromoglicato de sódio sobre o infiltrado eosinofílico nos animais alérgicos	71
6.2.6	A obesidade induziu uma maior área de depósito de colágeno subepitelial no esôfago dos animais obesos/alérgicos	75
6.2.7	Efeito da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio sobre o perfil das citocinas epiteliais, IL-33 e TSLP, no esôfago dos animais alérgicos	77
6.2.8	Efeito da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio, sobre o perfil da resposta Th2 no esôfago, dos animais alérgicos	79
6.2.9	Obesidade induz perfil regulatório, após tratamento com cromoglicato de sódio, no esôfago dos animais alérgicos	81
6.2.10	Efeito da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio, sobre o perfil de ativação de células dendríticas nos linfonodos mediastinais e baço.....	83
6.2.11	Influência da obesidade no perfil de ativação das células dendríticas, derivadas da medula óssea	86
6.2.12	Avaliação do efeito da obesidade e do cromoglicato de sódio, sobre o número absoluto de eosinófilos na medula óssea	87
6.2.13	Influência da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio, na frequência de linfócitos Th2 produtores de IL-4, nos linfonodos mediastinais e baço	88
6.2.14	Avaliação do efeito da obesidade e do cromoglicato de sódio, sobre a frequência de linfócitos B, nos linfonodos mediastinais e baço.....	90
6.2.15	Efeito da obesidade e do cromoglicato de sódio, sobre a frequência de linfócitos T regulatórios, nos linfonodos mediastinais e baço.....	92
6.3	AVALIAÇÃO DO TECIDO PULMONAR	95
6.3.1	Influência da obesidade e do cromoglicato de sódio, na contagem de eosinófilos, no tecido pulmonar dos animais alérgicos.....	95
6.3.2	Efeito da obesidade, induzida por dieta hiperlipídica, e do tratamento com cromoglicato de sódio, na contagem de mastócitos, no tecido pulmonar, dos animais alérgicos.....	97
6.3.3	Avaliação dos níveis das citocinas de perfil Th2 no tecido pulmonar	99
6.3.4	Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido pulmonar.....	100
7	DISCUSSÃO	101
8	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DA ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

A Esofagite Eosinofílica (EoE) é uma doença inflamatória crônica no esôfago, caracterizada pela infiltração significativa de eosinófilos na mucosa esofágica, associada a sintomatologia clínica de disfunção do esôfago que atinge crianças e adultos, sobretudo do sexo masculino (FURUTA et al., 2007; LUCENDO et al., 2017). Foi descrita pela primeira vez há menos de quatro décadas por Landres e colaboradores (LANDRES et al., 1978), desde então, tem havido um imenso interesse nesta patologia, tanto na pesquisa quanto no cenário clínico. Ela requer monitoramento e tratamento intensivo para evitar complicações, como: déficit no crescimento e deficiência nutricional em crianças, além de impactação alimentar e estenose, que é o comprometimento estrutural anatômico com consequente espessamento de camadas, resultando no estreitamento esofágico e perfuração espontânea do esôfago (LIACOURAS et al., 2011).

A EoE é uma doença cada vez mais reconhecida, que se tornou uma das principais causas de sintomas esofágicos em crianças e adultos. Sua incidência e a prevalência aumentaram drasticamente nos últimos 20 anos (ATTWOOD et al., 1993; NOEL et al., 2004; PRASAD et al., 2009; RAJAVELU et al., 2012; MOAWAD, 2017). Na década de 90, o número de casos novos foi estimado em apenas 0,4 casos/100.000 habitantes/ano. No entanto, esta avaliação poderia estar subestimada, pois o código para a identificação da doença na Classificação Internacional de Doenças (CID) só foi estabelecido em 2009 (DELLON, 2014). As estimativas atuais de incidência variam entre 2,1 a 12,8 casos/100.000 habitantes/ano, com uma prevalência de 2,3 a 90,7 casos/100.000 habitantes (PRASAD et al., 2009; SPERGEL et al., 2011; LIACOURAS et al., 2011; RHIJN et al., 2013; DELLON, 2014; ARIAS et al., 2016; MOAWAD, 2017; DELLON; HIRANO, 2018) (Figura 1). A doença também apresenta uma forte predileção por sexo, confirmada em estudos clínicos e epidemiológicos, demonstrando que entre 70% e 80% de todos os casos diagnosticados são do sexo masculino, com uma relação homem para mulher de 3:1 (FURUTA et al., 2007; LIACOURAS et al., 2011).

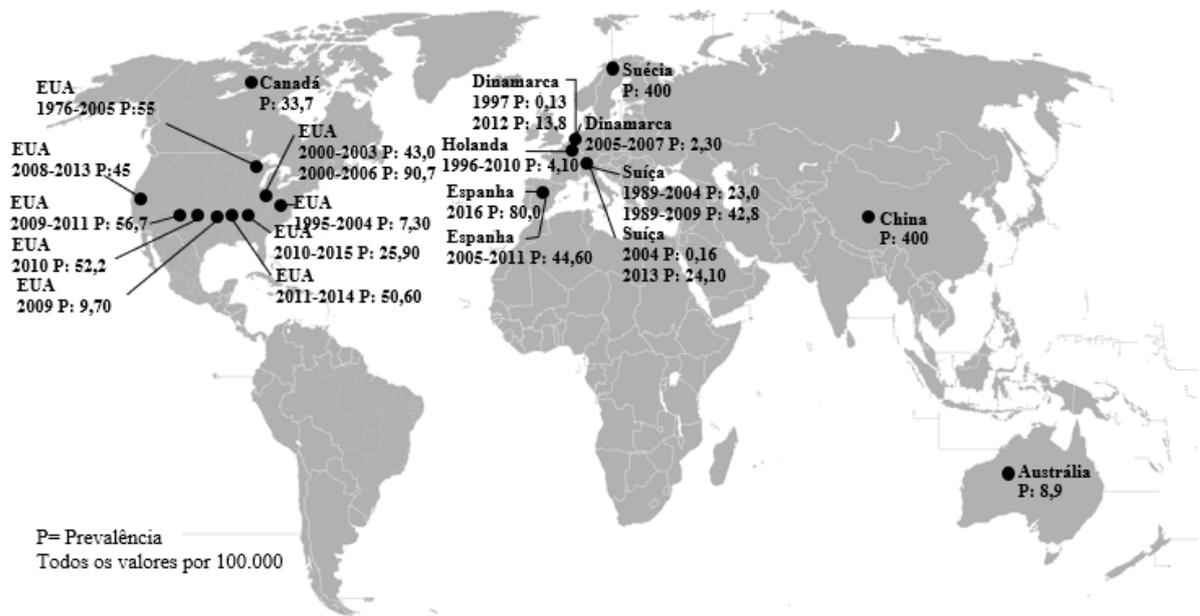


Figura 1. Prevalência mundial de EoE a partir de estimativas em estudos populacionais (Adaptado de DELLON e HIRANO, 2018).

No Brasil, devido à falta de informações, esses dados ainda não são bem conhecidos, os estudos publicados até o momento focaram apenas em casos isolados ou em determinadas regiões do país (FERREIRA et al., 2008; REZENDE et al., 2014; GONÇALVES et al., 2018). Entretanto, a EoE apresenta incidência crescente e taxas de maior prevalência, nos últimos anos, principalmente na América do Norte e Europa (STRAUMANN; SIMON, 2005; PRASAD et al., 2009; HRUZ et al., 2011; DELLON et al., 2014; ARIAS et al., 2016; DELLON; HIRANO, 2018).

Dada a esta alta proporção de pacientes com EoE, vários estudos já evidenciaram que seu ônus econômico é substancial, em vários países os custos anuais estimados de assistência médica associados à EoE são em torno de bilhões de dólares (DELLON et al., 2014; JENSEN et al., 2015). Atualmente, ela é a principal causa de endoscopia de emergência por impactação alimentar em adultos (BORTHWICK et al., 2014; HEERASING et al., 2015; SAWADA et al., 2019). Além disso, estima-se que a EoE ocorra em 15% dos adultos submetidos à endoscopia para disfagia (PRASAD et al., 2007; MACKENZIE et al., 2008). Essa progressão de complicações pode ser atribuída à remodelação fibrosa associada à história natural da EoE não tratada (ACEVES; ACKERMAN, 2009). De fato, o diagnóstico tardio está associado a um risco aumentado na formação de estenoses, e ocorre de maneira dependente do tempo (SCHOEPFER et al., 2013). Essas complicações de natureza crônica, influenciam na qualidade de vida dos pacientes e nas suas atividades sociais, sendo importante considerá-las

para projetar políticas sustentáveis em relação à doença e o seu impacto nos sistemas de saúde em geral (FRANCIOSI et al., 2012; HARRIS et al., 2013; KLINNER et al., 2014; LUCENDO et al., 2014).

O esôfago é um tubo muscular fino com cerca de 23 a 25 centímetros (cm), que atravessa parte do pescoço, tórax e abdômen, em seu trajeto da faringe até o estômago e, está intimamente relacionado com a traqueia. De dentro para fora é constituído de mucosa, submucosa, camada muscular circular, camada muscular longitudinal e adventícia (FRANCIOSI et al., 2012). Possui um epitélio escamoso estratificado com a camada basal proliferativa de queratinócitos que funciona como uma barreira física. A esofagite eosinofílica e várias outras patologias esofágicas, podem causar perturbações no gradiente de diferenciação e proliferação desse epitélio, comprometendo a sua função (WHELAN et al., 2018).

O papel do esôfago no processo de sensibilização permanece, todavia, uma incógnita, desconhecendo-se se é o local primário de infiltração eosinofílica ou alvo do recrutamento maciço de eosinófilos após prévia sensibilização de outro segmento do trato digestivo ou respiratório (NIELSEN; HUSBY, 2007). Tem sido sugerido que pacientes com EoE apresentam a função da barreira epitelial alterada, uma vez que estudos de caracterização da expressão gênica (BLANCHARD, 2006) e de imunolocalização (ROCHA et al., 2011) já demonstraram uma regulação negativa na expressão da proteína de adesão celular, a Desmogleína-1 (DSG-1), no epitélio esofágico, durante a inflamação ativa da EoE. Isto também foi demonstrado por Sherrill e colaboradores (2014) que ao utilizarem modelos *in vitro*, descobriram que na ausência da DSG-1, o epitélio escamoso estratificado esofágico tem sua função de barreira epitelial prejudicada, levando a maior permeabilidade do epitélio a alérgenos ambientais e alimentares, com consequente aumento do acesso a antígenos pelas APCs (YEN et al., 2010).

Embora o perfil de resposta imune seja conhecido, sua patogênese ainda não está totalmente esclarecida. Sugere-se que esta patologia resulte de uma interação de fatores genéticos e ambientais, que podem promover dano e fibrose na mucosa esofágica (MERVES et al., 2014; D'ALESSANDRO et al., 2015; SPERGEL; ACEVES, 2018) (Figura 2).

Acredita-se que a EoE seja uma doença alérgica, causada por múltiplos alérgenos alimentares, tais como, laticínios, ovos, trigo, soja, amendoim e peixe/marisco e também por aeroalérgenos (KAGALWALLA et al., 2006; FURUTA et al., 2007; LIACOURAS et al., 2011).

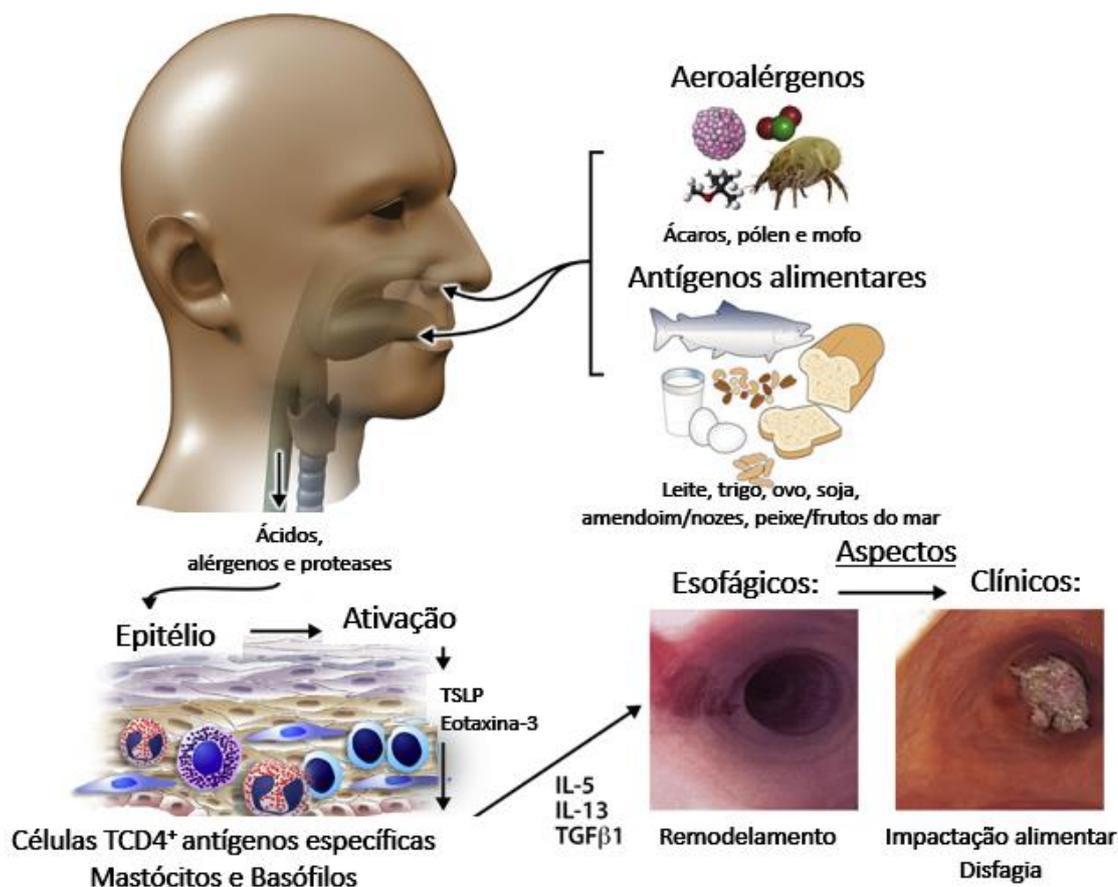


Figura 2. Resposta inflamatória na EoE. Antígenos alimentares e aeroalérgenos em pacientes com EoE. Antígenos ingeridos e inalados, em conjunto com ácido e proteases, ativam o epitélio para produzir fatores quimiotáticos e células imunes inatas (mastócitos, basófilos) e adaptativas (células T). As células infiltrantes podem produzir citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL13, bem como fatores pro-fibróticos. A inflamação crônica inicia o remodelamento tecidual, com consequente disfagia, impactação de alimentos e constrição esofágica (Adaptado de SPERGEL; ACEVES, 2018).

Constitui uma condição única, na qual os pacientes com esta patologia, apresentam uma maior predisposição a atopia e elevada sensibilização aos alérgenos, em relação à população em geral (ROTHENBERG et al., 2001; SPERGEL et al., 2002; NOEL et al., 2004). O termo atopia, foi proposto em 1906, para mostrar a tendência que alguns indivíduos possuem em desenvolver reações de hipersensibilidade quando expostos à determinadas substâncias (SILVERSTEIN, 2000). Essas reações podem ser classificadas como reações de hipersensibilidade alimentar em imediatas, mediadas por imunoglobulina de classe E (IgE) e tardias, mediadas por células (não mediadas por IgE). As reações mediadas por IgE são iniciadas pela ligação cruzada de dois ou mais anticorpos IgE alérgenos específicos aos antígenos alimentares e ao seu receptor de alta afinidade para a porção Fc da IgE (FcεRI), que são expressos em mastócitos e basófilos. Essa interligação promove a degranulação dessas células, com a liberação de mediadores inflamatórios e lipídicos presentes em seus grânulos,

como histamina, leucotrienos e proteases, além da liberação de citocinas e quimiocinas. Em conjunto esses fatores causam vasodilatação, angioedema, constrição do músculo liso e aumento da produção de muco. Já nas reações alérgicas a alimentos, não mediadas por IgE, múltiplas células inflamatórias e seus mediadores estão envolvidos, como ativação de linfócitos T, o recrutamento de eosinófilos e mastócitos, sendo estas as características principais de muitas das doenças que envolvem essas reações alérgicas (LEUNG, 2000; CHEHADE; ACEVES, 2010).

As reações mediadas por IgE são tipicamente de início rápido, e podem levar à anafilaxia, uma reação alérgica grave e possivelmente fatal. Em contraste, as reações não mediadas por IgE tornam-se evidentes apenas após algumas horas, ou até dias, após a ingestão do alérgeno, e frequentemente se manifesta no trato gastrointestinal, causando inflamação crônica e eosinofilia. Acredita-se que uma mistura destas reações imunológicas desempenhe um papel na imunopatogênese da EoE (CHEHADE; ACEVES, 2010). Atualmente, admite-se que os mecanismos não mediados por IgE predominam na EoE, justamente pela caracterização dos sintomas potencialmente mais crônicos (SIMON et al., 2016).

As vias da cascata de ativação que levam à produção de IgE, envolvem a participação das células dendríticas (DCs), as quais são essenciais para a indução da resposta imune, agindo como mensageiras entre os sistemas imune inato e adaptativo (BERIN; SHREFFLER, 2008). Essas células possuem uma morfologia que resulta em uma maior superfície de contato em relação ao ambiente, o que facilita sua função de células apresentadoras de antígenos (APCs) no sistema imunológico. Elas apresentam o antígeno às células T CD4⁺ e induzem a diferenciação dessas células T em seus vários subtipos, incluindo as células T *helper* (Th)-2 alérgeno-específicas (STEINMAN; COHN, 2007; WILLS-KARP; FINKELMAN, 2008). Estas células expressam o fator de transcrição GATA-3, que induz a produção das interleucinas (IL)-4, IL-5 e IL-13. A expressão desse fator também inibe a polarização para o perfil Th1e a produção de interferon-gama (IFN- γ) (RENGARAJAN et al., 2000). As citocinas IL-4 e IL-13 provêm o primeiro sinal durante a interação entre linfócitos T e B, para estimular a produção e a mudança de classe de isótipo de imunoglobulina IgM para IgE nos linfócitos B. Sendo que a IgE produzida e liberada se liga a receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgE (Fc ϵ RI) presentes na superfície de mastócitos e basófilos) (WU; ZARRIN, 2014).

A IL-5 promove a expansão seletiva dos eosinófilos na medula óssea e sua liberação na circulação, enquanto a IL-13 estimula o epitélio esofágico a produzir eotaxina 3, uma quimiocina potente que recruta os eosinófilos para o esôfago (STRAUMANN et al., 2001;

BLASER et al., 2002). Os eosinófilos ativados liberam múltiplos fatores que promovem inflamação local e lesão tecidual, incluindo proteases, presente em seus grânulos citoplasmáticos (ROTHENBERG, 2015; SIMON et al., 2016; SPERGEL; ACEVES, 2018).

Várias citocinas e quimiocinas demonstraram ser importantes para a iniciação e manutenção da inflamação eosinofílica no esôfago (SHUKLA et al., 2016; KOTTYAN; ROTHENBERG, 2017) (Figura 3). A IL-33 é um membro da família da IL-1 que impulsiona potentemente a produção de citocinas associadas a resposta do tipo Th2 (LIEW et al., 2016). É expressa por uma grande variedade de tipos de células, incluindo fibroblastos, mastócitos, células dendríticas, macrófagos, osteoblastos, células endoteliais e células epiteliais (MARTIN; MARTIN, 2016). Ela é um ativador muito eficiente de T auxiliares, mastócitos, eosinófilos e basófilos, todos infiltrados no esôfago em pacientes com EoE (ABONIA et al., 2010; NOTI et al., 2013; BOUFFI et al., 2013; RIVELLESE et al., 2014; DAVIS; ROTHENBERG, 2016). Sendo assim, a IL-33 participa das respostas esofágicas que mimetizam a EoE, incluindo infiltração de eosinófilos, aumento da proliferação de células epiteliais esofágicas e produção de citocinas associadas a resposta de linfócitos Th2, levando ao aumento da lesão tecidual (JUDD et al., 2016).

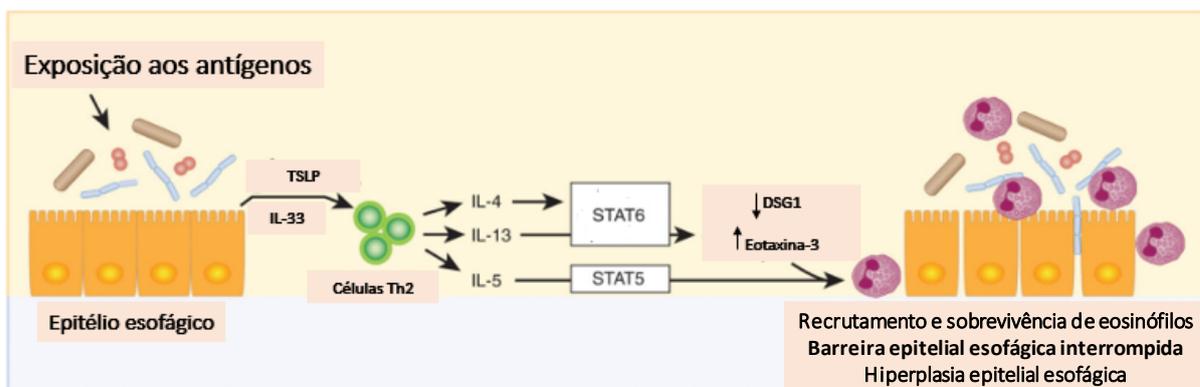


Figura 3. O papel das citocinas epiteliais na EoE. As células epiteliais do esôfago secretam a TSLP e a IL-33 em resposta a estímulos de vários antígenos. Essas citocinas atuam nas células T auxiliares, levando à sua secreção de citocinas alérgicas, incluindo IL-13, IL-4 e IL-5. A IL-5 sinaliza principalmente através do transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (STAT5) em eosinófilos para promover o recrutamento e a sobrevivência do tecido. A IL-13 sinaliza principalmente através do transdutor de sinal e ativador da transcrição 6 (STAT6) e promove a transcrição da eotaxina-3. A sinalização de IL-13 dependente de STAT6 também leva à diminuição da expressão da proteína DSG1. Em conjunto, estas vias de sinalização levam ao recrutamento e sobrevivência de eosinófilos, uma barreira epitelial esofágica interrompida e um epitélio esofágico desorganizado (Adaptado de KOTTYAN; ROTHENBERG, 2017).

Vale ressaltar o papel da citocina epitelial linfopoiética estromal tímica (TSLP), é um membro da família da citocina IL-2 (LEONARD, 2002) que funciona na interface de

respostas de células dendríticas e células T e, pode ser de fundamental importância nesse processo (SIRACUSA et al., 2011; NOTI et al., 2013). Durante a inflamação alérgica, os produtores primários de TSLP são as células epiteliais, queratinócitos e células do estroma, além das próprias DCs e dos mastócitos (SOUMELIS et al., 2002; WATANABE et al., 2004; YING et al., 2005; KASHYAP et al., 2011; MOON et al., 2011). Na EoE, sua expressão pode ser induzida por lesão tecidual ou estimulação do epitélio esofágico, iniciando a cascata de diferenciação para o perfil Th2. A TSLP promove a maturação e ativação de DCs, que secretam fatores envolvidos na migração e diferenciação de células T CD4 virgens em células Th2 (SOUMELIS et al., 2002). A TSLP também induz uma população única de basófilos, que são granulócitos menos comuns, constituindo menos de 1% da população de leucócitos. Estas células também secretam citocinas pró-Th2, como IL-4, IL-6, CCL-3 (C-C motivo ligante 3), CCL-4 e CCL-12, levando ao aumento da inflamação na EoE (SIRACUSA et al., 2011).

Recentemente foi descoberta uma associação entre um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene que codifica a TSLP. Foi identificado o SNP rs3806932, que envolve os nucleotídeos adenina (A)/guanina (G) que está presente na região promotora do gene da TSLP (ROTHENBERG et al., 2010). Nesse estudo, o alelo (G) está presente em uma porcentagem maior nos pacientes controles (45,8%) em comparação com os pacientes com EoE (31,2%). Considerando que indivíduos homozigotos para o alelo de risco de TSLP (AA) aumentaram a expressão de TSLP e o infiltrado de basófilos no epitélio esofágico em comparação àqueles portadores do alelo de risco heterozigótico (AG) e alelos homozigotos (GG) (ROTHENBERG et al., 2010; NOTI; WOJNO, ELIA D TAIT; et al., 2013a). Sherrill e colaboradores (2010), também identificaram uma associação significativa entre um SNP no receptor de TSLP de pacientes masculinos com EoE. O receptor da TSLP está no cromossomo Yp11.3, o que poderia explicar um pouco da predominância do sexo masculino na EoE (SHERRILL et al., 2010).

Outro fator de risco identificado associado à EoE é o polimorfismo no gene da eotaxina-3 (CCL-26), sendo considerado o gene mais desregulado em pacientes com EoE e está elevado no epitélio esofágico e no sangue periférico durante a inflamação ativa (BLANCHARD, 2006). Esta quimiocina juntamente com a eotaxina-1 (CCL-11) e a eotaxina-2 (CCL-24), são potentes fatores quimiotáticos para eosinófilo. A especificidade das eotaxinas para os eosinófilos é resultado da sinalização exclusiva através de seu receptor, CCR3 (Receptores de quimiocinas CC3) (GERARD; ROLLINS, 2001; KOMIYA et al., 2003; ROTHENBERG et al., 2010), que é expresso predominantemente em eosinófilos humanos e de camundongos (ROTHENBERG et al., 1995). Porém o papel dessas quimiocinas ainda permanece incerto, uma vez que já foi demonstrado que camundongos deficientes em CCL-11,

apresentaram uma atenuação muito pequena nos sintomas da EoE experimental (MISHRA et al., 2001; MISHRA; ROTHENBERG, 2003).

Os eosinófilos intraepiteliais são a marca histológica da EoE e são usados como um marcador padrão para o diagnóstico e atividade da doença. A IL-5, secretada por vários tipos de células, incluindo células T, basófilos e mastócitos, é essencial para a diferenciação, proliferação e sobrevivência dos eosinófilos (MASTERSON et al., 2012). A ativação de eosinófilos teciduais resulta em degranulação ou liberação de proteínas granulares e secreção de citocinas inflamatórias, incluindo TGF- β , uma citocina pró-inflamatória que promove a contratilidade do músculo liso na EoE, além do fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF), IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN). Essas proteínas granulares causam danos teciduais, levando ao aumento da disfunção epitelial (STRAUMANN; SIMON, 2004).

Os mastócitos também estão amplamente associados a respostas alérgicas mediadas por IgE e não mediadas por IgE, e sua contribuição para a EoE foi recentemente reconhecida. A presença dessas células ativadas e seus produtos é evidenciada no epitélio esofágico das amostras de biópsia de pacientes com EoE ativa (ACEVES et al., 2010; DELLON et al., 2011). Foi observado, em estudos anteriores, que tratamentos com corticosteroides diminuem os mastócitos epiteliais esofágicos, correlacionado com a redução da eosinofilia tecidual. Por outro lado, mastócitos ativados também secretam TGF- β . (ACEVES et al., 2010). Além disso, a triptase, uma serina-protease armazenada de modo abundante em grânulos secretórios de mastócitos, pode promover a proliferação e a secreção de colágeno por fibroblastos, o que pode ter implicações na formação da fibrose e no processo patológico presente na EoE (KONDO et al., 2001; DAVIS; ROTHENBERG, 2016). A reparação ou remodelamento tecidual consequente do infiltrado celular inflamatório na EoE, também pode ser responsável por esta fibrose, que é definida como deposição excessiva de componentes da matriz extracelular que levam à disfunção orgânica (BORTHWICK et al., 2014). Participam desse processo, como mencionado acima, os fibroblastos, que são células mesenquimais localizadas no estroma dos tecidos, que estão envolvidos na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (METZ, 2003; HU; PHAN, 2014). Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo debridamento e remodelamento tecidual (QUAN et al., 2004; HILDEBRAND et al., 2005).

A fibrose esofágica seria responsável por alguns dos aspectos clínicos da doença, tais como, dor abdominal, vômitos, disfagia (dificuldade de deglutir) com alimentos sólidos e azia (retorno para o esôfago do conteúdo gástrico) (SAMPSON; ANDERSON, 2000), além de impactação alimentar e estenose. Essa variação de sintomas ressalta a importância de se fazer um diagnóstico correto, diferenciando as diversas patologias que apresentam sintomas semelhantes a EoE, como a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) (MERVES et al., 2014).

Outro tipo celular que tem se destacado na patogenia da EoE, são as células T "Natural Killer" invariáveis (iNKT), especializadas em reconhecer lipídeos próprios e estranhos (EIWEGGER; AKDIS, 2011; KASHYAP et al., 2011; JYONOUCHI et al., 2014; DAVIS; ROTHENBERG, 2016). Um estudo clínico demonstrou uma ligação funcional entre a alergia ao leite de vaca com a EoE e a ativação dessas células. Nesse trabalho, foi demonstrado que crianças com a doença ativa apresentaram maior número de células iNKT no esôfago em comparação com crianças com a doença inativa e controles saudáveis. Essas células nestes pacientes, produziram níveis mais altos de IL-13 em resposta à estimulação do lipídeo do leite quando comparados com controles não EoE (JYONOUCHI et al., 2014).

Em contrapartida a essa resposta pró-inflamatória presente na EoE, um subtipo adicional de linfócitos pode ser ativado, os linfócitos T reguladores (Tregs), que exercem função imunossupressora (CHEN et al., 1994; AKDIS et al., 1998). Essas células expressam a cadeia alfa do receptor da IL-2 (CD25), o fator de transcrição Foxp3 e, são produtoras da citocina anti-inflamatória IL-10 (KARAGIANNIDIS et al., 2004; PEEK et al., 2005). As Tregs são importantes na imunorregulação, suprimindo a ativação, a proliferação e/ou a função efetora das células T. Qualquer alteração na função e/ou no número de Tregs pode levar a doenças inflamatórias e ao aumento na susceptibilidade a doenças alérgicas. Essas células se dividem em dois subtipos, as Tregs naturais, que se desenvolvem no timo antes da exposição ao antígeno e as Tregs induzíveis, que são geradas nos tecidos linfoides periféricos após exposição ao antígeno (OOSTERHOUT; BLOKSMA, 2005; BACCHETTA et al., 2007; HARRIS et al., 2008). As Tregs direta ou indiretamente, podem suprimir as células efetoras na inflamação alérgica, como mastócitos, basófilos e os eosinófilos (AKDIS et al., 2005; HARRIS et al., 2008). Com isso, alguns estudos já observaram um aumento no número das células Tregs, através avaliação da expressão do fator de transcrição Foxp3, indicando que o número de Tregs na mucosa esofágica era significativamente maior em pacientes com EoE (KARLSSON et al., 2004; HARTL et al., 2007; TANTIBHAEDHYANGKUL et al., 2009). Esses dados sugerem, que isto pode ser um mecanismo de feedback negativo para regular a resposta inflamatória a estímulos externos ou exposições alérgicas (TANTIBHAEDHYANGKUL et al., 2009). Assim,

a identificação dessas células, como principais reguladores de processos imunológicos na tolerância periférica a alérgenos poderia ser uma importante ferramenta na prevenção e tratamento de doenças alérgicas (AKDIS et al., 2005).

1.2 ESOFAGITE EOSINOFÍLICA: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

As definições da EoE foram confundidas, ao longo do tempo, pela heterogeneidade das apresentações de seus sintomas e por dificuldade na quantificação de eosinófilos na mucosa esofágica. Em nenhuma outra patologia essa controvérsia foi mais evidente do que na distinção entre EoE e a DRGE. Clínicos e pesquisadores tentam entrar em um acordo sobre esta questão, para então definir a resposta terapêutica mais adequada na EoE (DELLON et al., 2013).

A presença de eosinófilos esofágicos intraepiteliais foi inicialmente vista como um importante biomarcador para o diagnóstico de DRGE (WINTER et al., 1982; BROWN et al., 1984), porém biópsias esofágicas em ambos os distúrbios mostram influxo de eosinófilos no epitélio, dificultando a distinção dessas duas patologias (EDAIRE CHENG et al., 2014). A prevalência de DRGE na população geral é de aproximadamente 20%, alta o suficiente para a possível coexistência dessas doenças, deste modo, a compreensão dessa interação pode contribuir para o monitoramento e tratamento correto da EoE (PEERY et al., 2012; DELLON et al., 2013).

A EoE foi caracterizada pela primeira vez como uma doença distinta da DRGE em 1993, por Attwood e colaboradores, que observaram um aumento de eosinófilos esofágicos intraepiteliais, maior que 20 eosinófilos por campo de maior aumento (> 20 eosinófilos/high power field - hpf) e hiperplasia epitelial escamosa com disfagia na ausência de DRGE (ATTWOOD et al., 1993). Esta diferenciação passou então a ser feita, com base na magnitude da eosinofilia presente na mucosa do esôfago e na falta de resposta à supressão ácida esofágica (RUCHELLI et al., 1999; FOX et al., 2002; VASILOPOULOS et al., 2002; STRAUMANN et al., 2003).

No entanto, vários estudiosos no assunto contestaram, argumentando que as interações entre a EoE e a DRGE poderiam ser complexas e que estabelecer uma distinção clara entre elas não era tão simples. Eles sugeriram que existem algumas situações que estabelecem estas relações: (a) DRGE causa lesão esofágica que resulta em infiltração eosinofílica leve, (b) coexistência de DRGE e esofagite eosinofílica ou (c) a DRGE contribui ou causa esofagite eosinofílica, por aumento da permeabilidade, expondo as camadas profundas do epitélio

escamoso do esôfago a antígenos alimentares, assim, o induzem a secretar citocinas pró-inflamatórias, que recrutam células imunológicas e, estas possivelmente, podem contribuir para a resposta alérgica no esôfago (SPECHLER et al., 2007; SOUZA et al., 2009; KIA; HIRANO, 2015; DUNBAR et al., 2016) (Figura 4).

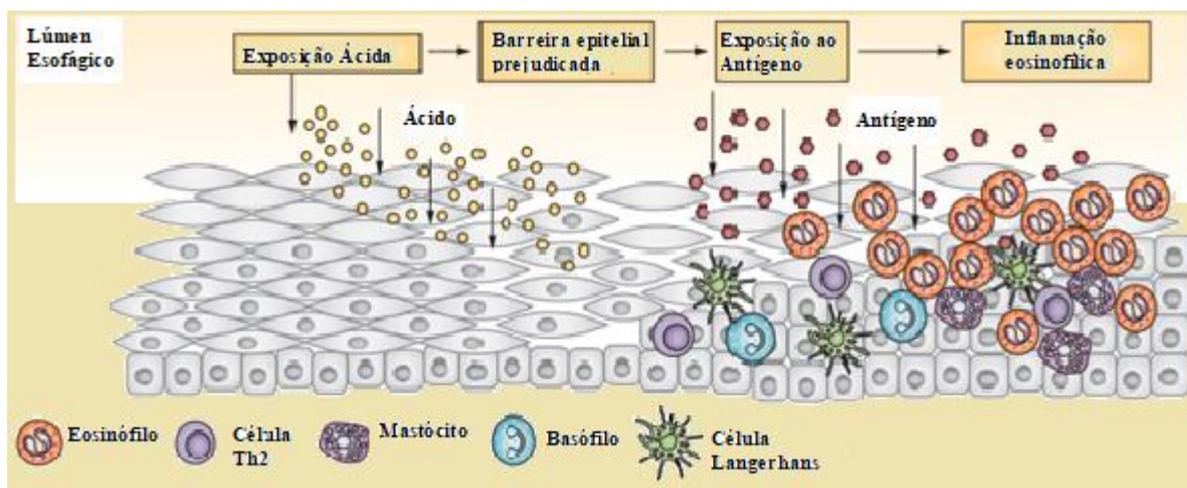


Figura 4. Mecanismo proposto para identificar o papel da DRGE na patogênese da EoE. A exposição ao ácido esofágico resulta em lesão da barreira epitelial com alargamento das lacunas entre as células epiteliais escamosas. A integridade da mucosa prejudicada permite a exposição do antígeno às células dendríticas na mucosa do esôfago, resultando em sensibilização com a expansão das células Th2 e o recrutamento de eosinófilos. A ativação de mastócitos leva à liberação de mediadores envolvidos no remodelamento esofágico (Adaptado de KIA; HIRANO, 2015).

A DRGE é diagnosticada em pacientes de meia idade de ambos os sexos, com sintomatologia predominante de azia em função do refluxo ácido. A grande maioria desses pacientes possuem endoscopia normal, porém alguns apresentam achados relevantes, como erosões, úlceras e esôfago de Barrett. Apresentam teste de pH positivo, uma vez que a monitorização do pH esofágico é um procedimento utilizado para medir a quantidade de ácido refluído do estômago para o esôfago. A análise histológica apresenta menos que 7 eosinófilos/hpf e resposta ao tratamento primário com antiácidos e inibidores da bomba de prótons (IBPs), estes são medicamentos que inibem a enzima H^+ , K^+ - Adenosina Tri-Fosfatase (H^+ , K^+ -ATPase ou bomba de prótons) realizando a supressão ácida gástrica (FASS; GASIOROWSKA, 2008; HIRANO et al., 2013; KIA; HIRANO, 2015).

Em contrapartida, os pacientes com EoE tendem a ser crianças e adultos jovens (idade mediana de 30 a 40 anos) do sexo masculino com disfagia e impação alimentar. Apresentam achados endoscópicos como anéis esofágicos (traquealização), sulcos longitudinais, exsudados (placas), estenoses e ruptura da mucosa e, menos de 10% dos pacientes possuem endoscopia normal. Com teste de pHmetria esofágica normal ou sem resposta à terapia

com altas doses com IBPs (FURUTA et al., 2007; HIRANO, 2011; LIACOURAS et al., 2011; KIM et al., 2012; SCHOEPFER et al., 2013; PARK, 2014). Atualmente é recomendado para o diagnóstico de EoE um limiar mínimo de 15 eosinófilos/hpf em pelo menos uma amostra de biópsia, das porções proximal e distal esofágica (ARIAS et al., 2016; DELLON; HIRANO, 2018). Além da eosinofilia esofágica, achados microscópicos, como formação de micro abscessos, podem ser observados (LIACOURAS et al., 2011). Grânulos eosinofílicos extracelulares, espaços intercelulares dilatados e fibrose da lâmina própria também podem ser encontrados (SHAH et al., 2009).

Na DRGE, os eosinófilos esofágicos são considerados parte da resposta inflamatória crônica ao refluxo ácido, enquanto que a eosinofilia encontrada na EoE é vista como uma característica central da resposta imune à exposição ao antígeno alimentar e/ou ambiental, isto poderia exibir benefícios na terapia com IBPs na EoE, os chamados inibidores da bomba de prótons responsivos a esofagite eosinofílica (IBP-REE), por apresentar melhora na integridade da mucosa ou por efeito anti-inflamatório direto. No entanto, ainda permanece desconhecido se a resposta imune esofágica é eficaz (LIACOURAS et al., 2011; KIA; HIRANO, 2015; LUCENDO et al., 2017).

Uma vez confirmado o diagnóstico, é importante tratar a inflamação eosinofílica não apenas para controlar os sintomas apresentados, mas também para preservar a integridade morfológica e funcional do esôfago (LIACOURAS et al., 2011; STRAUMANN et al., 2012; DELLON; KIM; et al., 2014; LEE et al., 2015). Existem duas estratégias principais de tratamento clínico atualmente aceitas para EoE: eliminação da dieta e o tratamento com corticosteroides (MERVES et al., 2014). A terapia de eliminação da dieta deve ser considerada em todas as crianças e adultos diagnosticados. Abordagens de eliminação da dieta incluem: (a) uma dieta estritamente elementar, na qual todas as proteínas são eliminadas e a fonte de nitrogênio é fornecida exclusivamente por aminoácidos isolados, desprovidos de capacidade antigênica; (b) prevenção específica de antígeno baseada em testes de alergia e, (c) eliminação empírica de alimentos, baseada nos antígenos alimentares mais comuns, são eles: proteína do leite de vaca, trigo, ovo, soja, amendoim/nozes, peixe/frutos do mar, essa dieta foi denominada dieta padrão de eliminação de 6 alimentos (Standard six Food Elimination Diet - SFED) que consisti em eliminar por seis semanas estes seis grupos de alimentos mais comumente associados à alergia alimentar. Todos os três métodos têm se mostrado eficazes com melhora dos sintomas clínicos e dos achados patológicos (KAGALWALLA et al., 2006; LIACOURAS et al., 2011; WOLF et al., 2014; ARIAS et al., 2016).

O tratamento com os corticosteroides orais, como a fluticasona e budesonida, são eficazes e podem ser considerados terapias de primeira linha para o gerenciamento inicial e de manutenção da EoE (DOHIL et al., 2010; STRAUMANN et al., 2010). De modo geral, estes corticosteroides parecem ser seguros quando usados em curto prazo (SCHAEFER et al., 2008; DOHIL et al., 2010). Os corticosteroides sistêmicos também são eficazes, no entanto, eles são geralmente reservados para casos graves que não respondem a outras terapias, devido aos seus efeitos adversos (LIACOURAS et al., 2005; SCHAEFER et al., 2008; DELLON et al., 2013). Embora sejam eficazes para o tratamento, os aspectos clínicos e histológicos retornam, se o uso desses medicamentos forem descontinuado (LIACOURAS et al., 2011), e também não está claro se tratam a fibrose observada na doença (LUCENDO et al., 2011).

1.2.1 Tratamento com Cromoglicato de Sódio

Outras terapias medicamentosas vêm sendo testadas na EoE, como o cromoglicato de Sódio (CG), um agente estabilizador da membrana dos mastócitos, com atividade anti-inflamatória, utilizado no tratamento e profilaxia da rinite alérgica e asma, tem mostrado resultados promissores na EoE, mas ainda requer dados mais favoráveis à sua utilização. (ELLIOTT et al., 2010; LIACOURAS et al., 2011; MOMBEINI et al., 2012; PAPADOPOULOU et al., 2014). O CG é um fármaco, que possui uma ação estabilizadora, interferindo no transporte de cálcio, através da membrana do mastócito, impedindo assim a liberação de histamina, leucotrienos e outros mediadores químicos. Ele atua inibindo a degranulação dos mastócitos sensibilizados, que ocorre após exposição a antígenos específicos (SHAPIRO; KÖNIG, 1985; LEZA et al., 1992; FRANZIUS et al., 1994; RATNER et al., 2002) (Figura 5).

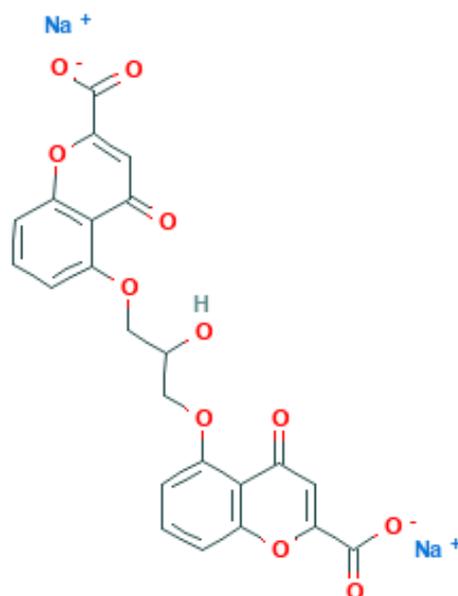


Figura 5. Representação da estrutura química da cromoglicato de sódio (PUBCHEM DATABASE).

O CG é derivado da quelina, um medicamento natural extraído da *Ammi visnaga*, uma erva do Mediterrâneo Oriental. Desde que as cromonas foram extraídas como constituintes ativos da quelina, vários análogos contendo essas substâncias foram preparados e estudados. O primeiro estudo clínico de fase 1, desses derivados do cromoglicato de sódio, foi conduzido pelo Doutor Roger Altounyan em 1967. Ele sofria de asma e conseguiu demonstrar que a inalação prévia dessa droga atenuava seus próprios sintomas asmáticos, induzidos por desafios com alérgenos no laboratório (ALTOUNYAN, 1967). A farmacocinética convencional dessa droga foi difícil para avaliar, porque é eliminado rapidamente do soro. As fases de distribuição e eliminação são quase idênticas e sua absorção oral é mínima (COX et al., 1970). Após a deposição nas vias aéreas, estima-se que apenas cerca de 8 a 10 % da droga seja absorvida, com uma duração da ação de geralmente 4 a 6 horas. Deve-se enfatizar que o CG exerce seus efeitos experimentais e clínicos de acordo com a cinética farmacológica clássica: dose-resposta (ALTOUNYAN, 1980). Nos últimos 20 anos, seu efeito anti-inflamatório e antialérgico mostrou funcionar através da inibição da liberação de mediadores dos mastócitos estimulados por IgE, de forma dose-dependente (NETZER et al., 2012).

Um estudo já demonstrou que o CG pode prevenir os sintomas de alergia alimentar, inibindo a ativação de mastócitos e a absorção de alérgenos ingeridos (YOKOOJI; MATSUO, 2015). Em contraste, também já foi relatado que o CG não confere nenhum benefício no tratamento da hipersensibilidade alimentar (BURKS; SAMPSON, 1988). No entanto, um

estudo recente, utilizando o CG por via oral na EoE, demonstrou que embora este medicamento não tenha reduzido a eosinofilia esofágica em maior grau do que o placebo, ele, curiosamente, reduziu os sintomas em 54% dos pacientes e ainda foi possível observar que, um paciente teve resolução completa da eosinofilia e dos sintomas da EoE. Diante disso, e com o excelente perfil dos efeitos colaterais desse medicamento, é razoável continuar as investigações acerca de seus benefícios, como um agente poupador de esteroides (LIEBERMAN et al., 2018). Assim, a eficácia e as doses ótimas de CG necessárias para evitar a anafilaxia mediada por IgE devido à alergia alimentar permanecem controversas (YOKOOJI; MATSUO, 2015).

Contudo, os efeitos desse medicamento, ainda não foram bem estabelecidos na EoE. O monitoramento dessa doença, até agora, parece ser o grande desafio. Não há até então, uma terapia farmacológica comprovada para o seu tratamento, e como mencionado anteriormente, as intervenções atuais exigem estratégias de eliminação da dieta, esteroides orais ou dietas com fórmula padrão (STRAUMANN, 2012). Permanecendo até o momento sem uma causa específica definida, a EoE vem recebendo mais atenção devido aos seus sintomas, que podem estar relacionados com mudanças no estilo de vida, como consequência das alterações no padrão alimentar (ALMANSA et al., 2009; DELLON, 2014) e, aumento de patologias alérgicas, como asma, rinite alérgica, alergia alimentar e dermatite atópica (JYONOUCHI et al., 2009).

2 OBESIDADE E ALERGIA

Paralelamente a esse aumento da incidência e prevalência da esofagite eosinofílica, outras doenças também aumentaram nas últimas décadas, tal como o número de crianças e adolescentes obesas, que aumentou dez vezes nas últimas quatro décadas, segundo a Organização Mundial da Saúde em 2018. Considerada uma epidemia mundial relacionada com o perfil alimentar e atividade física, a obesidade tornou-se um problema de saúde pública, principalmente pela sua associação com doenças crônicas não-transmissíveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Do mesmo modo que a esofagite eosinofílica, a asma também é uma doença mediada por resposta imune de perfil Th2 e sofre influência da obesidade, com estudos clínicos e epidemiológicos demonstrando que pacientes obesos possuem maior chance de desenvolver asma, com piora dos sintomas clínicos (FARAH; SALOME, 2012). Com esses dados, levanta-se o questionamento se a obesidade também teria ação na patogênese da EoE, uma vez que a

maioria desses pacientes tem evidência de doença atópica concomitante (CLAYTON et al., 2014; SIMON et al., 2016).

A obesidade é considerada uma doença inflamatória crônica desde 1985, afetando todas as idades, estratos econômicos, raça e continentes (VEIGAS et al., 2012). É cada vez mais comum e continua sendo um problema de saúde pública em todo o mundo (JAMES et al., 2001; ARROYO-JOHNSON; MINCEY, 2016) (Figura 6). É uma doença multifatorial e afeta hoje, mais de um terço da população mundial (STEVENS et al., 2012). Se as tendências seculares continuarem, em 2030, estima-se que 38% da população adulta do mundo tenha excesso de peso e outros 20% sejam obesos (KELLY et al., 2008). Esse aumento no peso corporal traz inúmeras consequências, incluindo a redução da qualidade de vida e o desenvolvimento ou agravamento de várias doenças (VISSCHER; SEIDELL, 2001; MALIK et al., 2013).

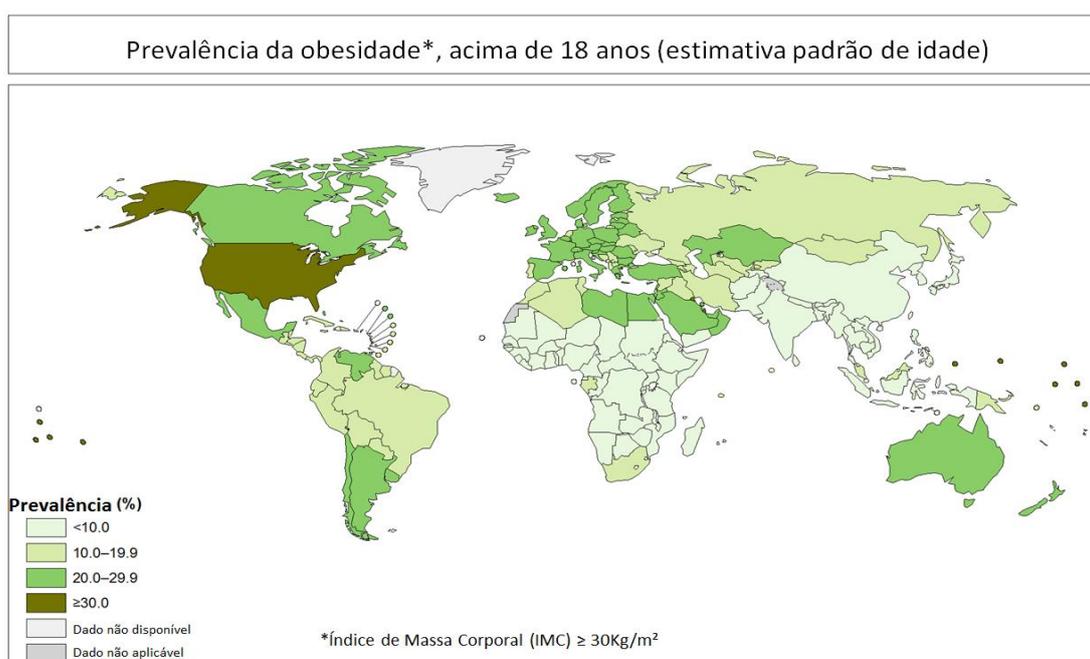


Figura 6. Prevalência da obesidade no mundo (Adaptado da Organização Mundial de Saúde, 2018).

A obesidade é definida por uma desproporcionalidade do peso corporal em relação à altura e um acúmulo excessivo de tecido adiposo que geralmente é acompanhado por inflamação sistêmica crônica leve (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). O atual critério mais utilizado para classificá-la é o índice de massa corporal (IMC - peso corporal em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado), que varia de baixo peso (<18,5 kg/m²) a grave ou obesidade mórbida (≥40 kg/m²) (HU, 2007). O desenvolvimento da obesidade está associado a múltiplas anormalidades metabólicas, incluindo resistência à insulina, hiperglicemia,

dislipidemia, doença hepática gordurosa não alcoólica e hipertensão, que são coletivamente definidas como síndrome metabólica. Além disso, a obesidade e a síndrome metabólica aumentam o risco de diabetes tipo 2 (DM2), acidente vascular cerebral, doença cardiovascular, certos tipos de câncer e doenças alérgicas (WEISS, 2005; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

Os sistemas, metabólico e imunológico, estão intimamente integrados e funcionalmente dependentes (JIN; FLAVELL, 2013). O tecido adiposo tem como função principal o armazenamento de gordura, ocorrendo a sua hidrólise e a sua liberação em jejuns prolongados. Porém este tecido, constituído por adipócitos, também funciona como um órgão endócrino expressando e secretando uma variedade de peptídeos bioativos, as adipocinas, como a leptina e adiponectina (KERSHAW; FLIER, 2004; GUILHERME et al., 2008). Sendo assim, o tecido adiposo está integralmente envolvido na coordenação de uma variedade de processos biológicos, incluindo o metabolismo energético, a função neuroendócrina e a função imunológica (KERSHAW; FLIER, 2004). Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém vários outros tipos celulares, que contribuem para o seu funcionamento, como linfócitos, macrófagos e fibroblastos (FRAYN et al., 2003).

A obesidade é definida pela expansão progressiva do tecido adiposo, porém, em 1993, Hotamisligil e colaboradores, descobriram a existência de um processo inflamatório, ligeiramente diferente, associado ao tecido adiposo, denominado de inflamação crônica de baixo grau (HOTAMISLIGIL et al., 1993). Esta inflamação caracteriza-se pela ausência de sinais cardinais de inflamação aguda e pela mudança de macrófagos de perfil M2, anti-inflamatórios, para macrófagos de perfil M1, pró-inflamatórios. Estas células são responsáveis pela liberação de citocinas na circulação, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da IL-6 (MRAZ; HALUZIK, 2014). O recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo é considerado um marco no desenvolvimento do processo inflamatório envolvido na obesidade (SELL; ECKEL, 2010; CLÀRIA, 2011).

A gênese da resposta inflamatória durante a obesidade ainda permanece desconhecida, no entanto, existem diversas hipóteses que contribuem para a sua iniciação. Dentre delas destacam-se a hipóxia e a morte dos adipócitos (LUMENG; SALTIEL, 2011). Os indivíduos obesos, devido à expansão dos adipócitos, apresentam um tecido adiposo com uma menor vascularização, o que pode induzir a hipóxia (DONATH; SHOELSON, 2011). Esse evento, induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, através da ativação de fatores de transcrição nos adipócitos e nos macrófagos residentes. Além de promover o recrutamento de mais macrófagos para o tecido adiposo, por estimular a produção de quimiocinas, que atraem estas células (YE; MCGUINNESS, 2013).

A morte dos adipócitos, por hipóxia, contribui para o aumento de ácidos graxos livres na corrente sanguínea (YE, 2011; SUN et al., 2012). Conseqüentemente, levando ao acúmulo de triglicérides e lipídeos no músculo esquelético e fígado, causando um desequilíbrio das funções normais dessas estruturas (KUSUNOKI et al., 2014). No tecido adiposo hipertrofiado, macrófagos M1 estão dispostos ao redor dos adipócitos mortos, levando a formação de estruturas em forma de uma coroa de células ou CLS (do inglês “crown like structure”) (DALMAS et al., 2011) (Figura 7).

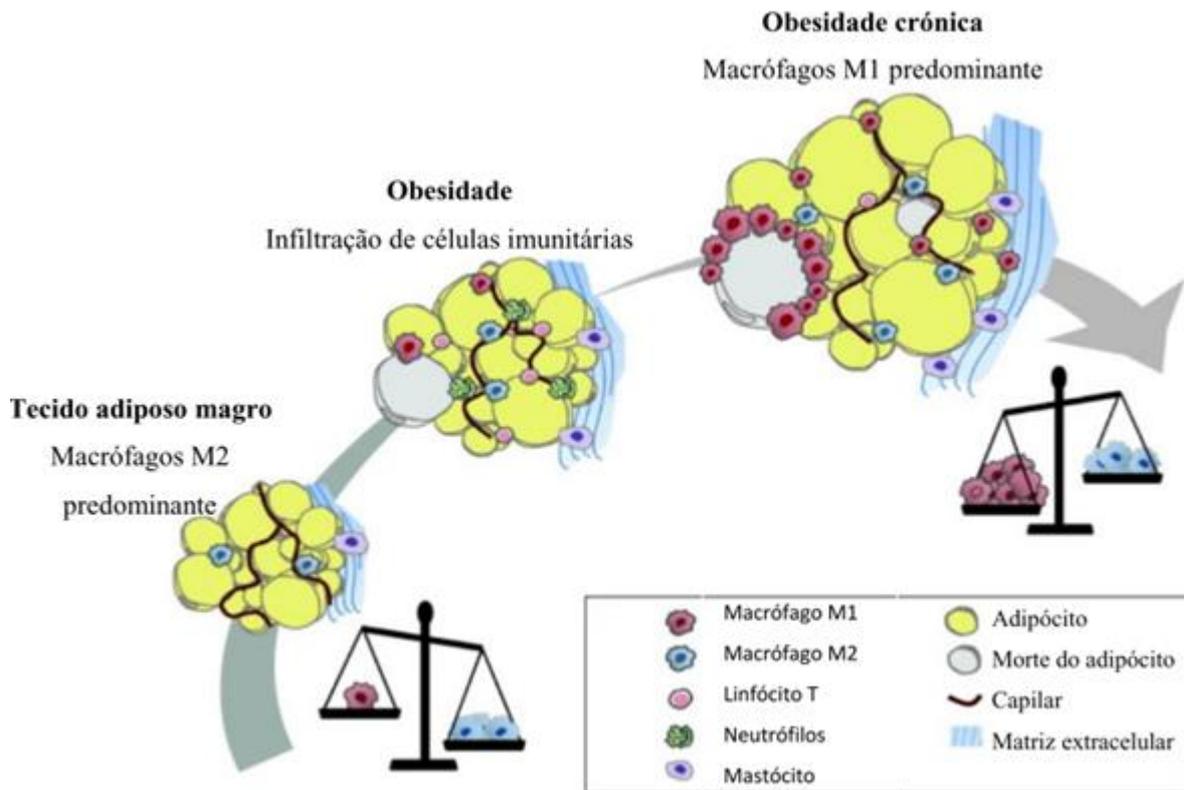


Figura 7. Alterações celulares no tecido adiposo na obesidade (Adaptado DALMAS et al., 2011).

Em relação as adipocinas, a leptina, produzida pelas células do tecido adiposo, atua no hipotálamo para sinalizar a saciedade, aumentando a taxa metabólica basal. Ela tem atividade pró-inflamatória e é estruturalmente homóloga a citocina IL-6, atua também aumentando a quimiotaxia e a fagocitose. Além disso, leva à proliferação das células T naïve (virgens) e a polarização de perfil de resposta imune Th1. Os níveis de leptina aumentam em proporção ao IMC, estando sua concentração sérica elevada na obesidade (HEEK et al., 1997; LORD et al., 1998; TORDAY et al., 2002; SOOD; SHORE, 2013; COFFEY et al., 2015). Por outro lado, a adiponectina é de natureza anti-inflamatória, pois inibe a produção das citocinas IL-6 e TNF- α , e aumenta a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e o

antagonista do receptor de IL-1 (SOOD; SHORE, 2013; COFFEY et al., 2015; UMETSU, 2017).

O estado pró-inflamatório crônico de baixo grau característico da obesidade, é considerado um fator para o desenvolvimento e agravamento das doenças alérgicas. A inflamação sistêmica mediada pela obesidade, demonstra ter efeitos nas funções pulmonares associadas com a asma (VISSER et al., 2001; HU, 2007; UMETSU, 2017), e um fenótipo específico para a asma tem sido descrito em indivíduos obesos, com mudanças nas respostas imunológicas (KELLY et al., 2008; STEVENS et al., 2012).

Os estudos iniciais focaram principalmente nas associações entre obesidade, TNF- α , IL-6, IL-1 β e proteína C reativa (PCR). A IL-6 e o TNF- α são constitutivamente expressos pelos adipócitos e correlacionam-se com a massa gorda total. O TNF- α aumenta na asma e aumenta ainda mais com a exposição ao alérgeno. O TNF- α também aumenta a produção de citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-5, por células epiteliais brônquicas bem como outras citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e IL-1 β . Assim, a via inflamatória do TNF- α é comum à obesidade e à asma e é possível que seja regulada pela presença de ambas as condições (BUNOUT et al., 1996; TANG et al., 1999; WEISS, 2005).

A interrelação entre obesidade e a asma, com seus inumeráveis fatores de risco, mostram a necessidade de maior compreensão dessa interação, inclusive, em outras doenças atópicas (WEISS, 2005; HUANG et al., 2009; CORNELIS; HU, 2013). Assim, diante do exposto, fica clara a importância e a relevância desse trabalho, na intenção de buscar entender, se a obesidade também influencia no desenvolvimento e/ou agravamento de outras doenças alérgicas, como a esofagite eosinofílica. Com este entendimento, poderia ser possível a redução dos custos de assistência à saúde, com a prevenção dessa doença, que apresenta taxas de incidência e prevalência cada vez maiores em todo mundo e assim, contribuir para o estabelecimento de estratégias eficazes de saúde pública.

3 MODELO DE OBESIDADE E ESOFAGITE EOSINOFÍLICA

As doenças alérgicas atingiram proporções epidêmicas no mundo, afetando quase 30% da população (PAWANKAR, 2014). Curiosamente, o aumento dessa prevalência é acompanhado pela maior gravidade e ampliação do espectro de distúrbios envolvendo respostas de hipersensibilidade em vários tecidos, como no trato gastrointestinal. Ainda que progressos substanciais tenham sido feitos na elucidação dos mecanismos inflamatórios envolvidos nas

respostas alérgicas no pulmão, a compreensão da patogênese dos distúrbios alérgicos no trato gastrointestinal tem evoluído lentamente. O desenvolvimento de modelos experimentais de alergia forneceu importantes percepções sobre os mecanismos imunológicos que regulam doenças alérgicas sistêmicas (por exemplo, anafilaxia) e pulmonares (por exemplo, asma). (DRAZEN et al., 1996).

Considera-se que a linhagem de camundongos BALB/c seja a que melhor apresenta similaridades com o modelo de inflamação alérgica desenvolvida em humanos, uma vez que estes animais são geneticamente predispostos a desenvolver uma resposta imune de perfil Th2 (WHITEHEAD et al., 2003; SAHU et al., 2010). A eosinofilia, definida como um acúmulo de eosinófilos no sangue e/ou tecidos, também é encontrada em uma variedade de distúrbios gastrointestinais (HOGAN et al., 2000; HOGAN, 2009). Assim, Mishra e colaboradores, em 2001, desenvolveram um modelo de esofagite eosinofílica experimental induzida pelo aeroalérgeno *Aspergillus fumigatus*, um fungo da família Trichocomaceae, agente etiológico da aspergilose e presente no ar atmosférico. Os camundongos, da linhagem BALB/c foram desafiados com este alérgeno, desenvolvendo níveis marcantes de eosinófilos esofágicos, grânulos eosinofílicos livres e hiperplasia de células epiteliais, características que mimetizam os distúrbios da esofagite eosinofílica em humanos (MISHRA et al., 2001).

Outros modelos para o estudo da EoE utilizam alérgenos alimentares, como a Ovalbumina (OVA), a principal proteína encontrada na clara de ovo, representando aproximadamente 55% da proteína total. Nesses modelos ocorrem sensibilizações e desafios por diferentes vias (intraperitoneal, subcutânea, intragástrica e intranasal). Um aumento no número de eosinófilos esofágicos e das características do remodelamento tecidual, como angiogênese, deposição de fibronectina, hiperplasia da zona basal e fibrose, foram observados nesses modelos (RUBINSTEIN et al., 2011). Esses modelos indicam uma conexão fisiopatológica nas respostas de hipersensibilidade alérgica no esôfago, demonstrando o papel etiológico dos alérgenos alimentares e aeroalérgenos na inflamação eosinofílica esofágica (WINTER et al., 1982; FURUTA, 1998).

Em relação a obesidade, alguns modelos experimentais, que compartilham características dessa doença em humanos e suas comorbidades, tem sido desenvolvido na busca de sua melhor compreensão. Os modelos de obesidade induzida por dieta são o que simulam melhor a progressão dessa patologia. Nestes modelos, diversas linhagens de camundongos, com graus variáveis de susceptibilidade ao desenvolvimento da obesidade podem ser utilizadas, bem como dietas distintas com alto teor lipídico ou as chamadas “dietas de cafeteria” que simulariam os hábitos alimentares ocidentais (BUETTNER et al., 2007; LUTZ; WOODS,

2012). Dentre as linhagens de camundongos utilizadas, a C57BL/6 apresenta maior ganho de peso e desenvolvimento de distúrbios metabólicos (COLLINS et al., 2004; MORI et al., 2010).

Embora, camundongos da linhagem BALB/c sejam geneticamente mais resistentes ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, alguns estudos demonstram que estes animais quando alimentados com dieta de alto teor de gordura, apresentam acúmulo de gordura, ganho de massa corporal e um estágio pró-inflamatório (PARK et al., 2011; KIM et al., 2011; SILVA et al., 2017), validando assim a utilização dessa linhagem em modelos de indução da obesidade e alergias. Gerando conhecimento sobre os mecanismos imunopatológicos e possíveis propostas de prevenção e/ou tratamentos (LUTZ; WOODS, 2012).

Baseado nos dados acima, a proposta do presente estudo foi avaliar a influência da obesidade e os efeitos do cromoglicato de sódio, sobre a resposta imune desenvolvida no modelo de esofagite eosinofílica experimental. Sendo a cronicidade, é uma característica predominante da doença, uma vez que estudos observacionais e experiências clínicas já demonstraram que tanto os sintomas quanto a inflamação eosinofílica persistem ao longo do tempo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da obesidade, induzida por dieta hiperlipídica, e o efeito do tratamento com o cromoglicato de sódio, sobre a resposta imune em modelo experimental de esofagite eosinofílica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Validar o modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos da linhagem BALB/c, através dos seguintes parâmetros:

- Acompanhar o consumo diário da dieta e do ganho de massa corporal semanalmente;
- Avaliar o acúmulo de tecido adiposo e alterações histopatológicas na região perigonadal ao final do protocolo;
- Analisar, em jejum, os níveis séricos de colesterol total e frações (HDL-C, LDL-C), triglicérides e glicose;
- Analisar os níveis séricos de leptina e TNF- α .

4.2.2 Avaliar a influência da obesidade e os efeitos do tratamento com o cromoglicato de sódio, nos animais submetidos ao modelo de esofagite eosinofílica experimental induzida pela ovalbumina, através dos seguintes parâmetros:

- Analisar a medida diâmetro do esôfago;
- Contar de eosinófilos e mastócitos no esôfago, traqueia, intestino e tecido pulmonar;
- Analisar a ativação de mastócitos, através da enzima triptase, no tecido esofágico por imuno-histoquímica;
- Avaliar a formação de fibrose, no tecido esofágico, nos cortes histológicos corados com Tricrômio de Masson;
- Avaliar os níveis séricos de IgE específica anti-OVA;

- Avaliar o perfil de citocinas Th2, regulatórias e epiteliais pela expressão relativa de RNAm no esôfago;
- Avaliar o efeito, no esôfago, traqueia, intestino e pulmões, da concomitância da obesidade e da esofagite eosinofílica, com e sem o tratamento com o cromoglicato de sódio;
- Imunofenotipagem de Células Dendríticas, Linfócitos T e Linfócitos B, nos linfonodos mediastinais e no baço;
- Contar o número de leucócitos totais e específicos na medula óssea.

4.2.3 Avaliar a influência da obesidade no tecido pulmonar, nos animais submetidos ao modelo de esofagite eosinofílica experimental, através dos seguintes parâmetros:

- Contar o número de leucócitos totais e específicos no lavado broncoalveolar;
- Avaliar os níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar;
- Determinar a atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) no homogenato de tecido pulmonar.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Estes animais foram mantidos no setor de manutenção e experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF, onde ficaram em gaiolas-padrão, em estante climatizada. O protocolo experimental realizado neste trabalho está de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFJF) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o número 07/2016.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em grupos experimentais, de acordo com as variações dos procedimentos adotados. Grupo controle (CN), alimentados com a dieta padrão. Grupo obesidade (OB), alimentados com a dieta hiperlipídica. Grupo esofagite eosinofílica (EoE), alimentados com dieta padrão, sensibilizados e desafiados com a ovalbumina. Grupo obesidade e esofagite eosinofílica (OB/EoE), alimentados com a dieta hiperlipídica, sensibilizados e desafiados com a ovalbumina, além dos grupos (EoE) e (OB/EoE) tratados com o CG. Conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos de animais utilizados no protocolo, de acordo com os procedimentos adotados.

Grupos	Indução do modelo de Obesidade	Indução do modelo de Esofagite Eosinofílica Experimental	Tratamento com Cromoglicato de Sódio
CN SAL	-	-	-
OB SAL	+	-	-
EOE SAL	-	+	-
OB/EOE SAL	+	+	-
EOE CG	-	+	+
OB/EOE CG	+	+	+

5.3 COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

Foram utilizadas durante todo o protocolo dois tipos de dietas: a dieta padrão comercial para roedores AIN 93G da marca Nuvilab®, 10% de Kcal derivada de gordura; e a dieta hiperlipídica (Prag Soluções Biociências Ltda), confeccionada de acordo com as especificações da tabela abaixo, que continha aproximadamente 60% de Kcal derivada de gordura. Na tabela 2 foram discriminados os constituintes das dietas padrão e hiperlipídica.

Tabela 2 – Composição das dietas padrão e hiperlipídica

Composição	Dieta Padrão (DP)	Dieta Hiperlipídica (DH)
Amido de milho	398,0	0,00000
Caseína	200,0	258,500
Amido dextrinizado	132,0	161,500
Sacarose	100,0	89,000
Óleo de soja	70,0	32,300
Fibra	50,0	64,600
L-cistina	3,0	3,900
Colina	2,5	2,600
BHT	0,0	0,280
Mix mineral PSB 10026	35,0	12,900
Mix vitamínico	10,0	12,900
Banha	0,0	316,600
Fosfato Ca dibase	0,0	16,800
Citrato Potássio	0,0	21,300
Carbonato de Cálcio	0,0	7,100
TOTAL	1000,0	987,100

Dieta padrão (DP): 73,9% de carboidratos, 14,8% de proteínas e 9,8% de lipídios. Dieta hiperlipídica (DH): 26,13% de carboidratos, 14,4% de proteínas e 57,6% de lipídios (REEVES et al., 1993).

5.4 INDUÇÃO DO MODELO DE OBESIDADE

Para indução do modelo de obesidade, a princípio, todos os animais receberam dieta padrão, por um período de adaptação após sua chegada no biotério do Centro de Tecnologia Celular e Imunologia Aplicada – IMUNOCET. Este período teve duração de uma semana. A partir desse tempo, os animais dos grupos obesos (OB e OB/EoE) foram alimentados com dieta hiperlipídica, contendo 60% de calorias derivadas de gordura, por 10 semanas, tempo de duração do protocolo de obesidade (SILVA et al., 2017). Em paralelo, os animais pertencentes

aos grupos controles (CN e EoE), foram alimentados com a dieta padrão, contendo 10% de gordura durante todo o protocolo de obesidade (Figura 8).

5.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DA RAÇÃO E DA MASSA CORPORAL

Para análise do consumo da dieta, a ingestão alimentar foi monitorada durante todo o protocolo, duas vezes por semana, onde o consumo da ração foi mensurado em balança semi-analítica (Micronal B6000®, Brasil). Para avaliação da curva do consumo da dieta, foi avaliada a média do consumo diário por semana, da 6^a a 16^a semana de idade (1^a a 10^a semana de dieta). O peso foi avaliado semanalmente no mesmo dia e horário, durante todo o protocolo de obesidade.

5.6 INDUÇÃO DO MODELO DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA EXPERIMENTAL

A indução do modelo de esofagite eosinofílica experimental, aconteceu a partir dos últimos 18 dias do protocolo de obesidade (SOKULSKY et al., 2016). Para isto, foi realizada nos animais do grupo EoE e OB/EoE, cinco sensibilizações, que ocorreram nos dias 0, 3, 6, 9 e 12 do protocolo de indução da EoE. Os animais foram imunizados com uma injeção subcutânea (s.c.) contendo 100 microgramas (μg) de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) em 50 microlitros (μL) de solução salina estéril. Posteriormente, nos dias 14 e 17 do protocolo de indução da esofagite eosinofílica, os animais foram desafiados de duas maneiras: **1)** através da administração oral de 50 miligramas (mg) de OVA em 100 μL de solução salina estéril, acrescida de sucralose, o suficiente para engrossar e adoçar a solução, de tal forma que o animal conseguisse beber voluntariamente e **2)** pelo período de uma hora, a água do bebedouro do animal foi retida e neste tempo houve a substituição pela solução de 1,5 gramas (g) de OVA em 1 litro (L) de água filtrada. Todos os animais foram eutanasiados 24 horas após o último desafio com a OVA (Figura 8).

5.7 PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM CROMOGLICATO DE SÓDIO (CG)

Para o protocolo de tratamento com cromoglicato de sódio (CG), na indução dos modelos de obesidade e esofagite eosinofílica experimental, os animais foram divididos em

dois grupos, grupo não tratado (SAL): CN, OB, EoE, OB/EoE e grupo tratado com cromoglicato de sódio (CG): EoE e OB/EoE (Tabela 2). Os animais do grupo CG receberam, 24 horas antes do primeiro desafio oral, e por cinco dias consecutivos, uma dose intraperitoneal de 100mg/kg de CG (Sigma-Aldrich) diluída em salina estéril, equivalendo aos dias 13, 14, 15, 16 e 17 do protocolo de indução da esofagite eosinofílica experimental. Nos dias em que foram realizados os desafios orais, o fármaco foi administrado 30 minutos antes do desafio oral. Os animais do grupo SAL, receberam salina nos mesmos dias e horários que os animais do grupo CG. Os animais dos grupos CN e OB tratados com CG, não apresentaram diferenças estatísticas significativas, por esse motivo seus dados não foram mostrados (Figura 8).

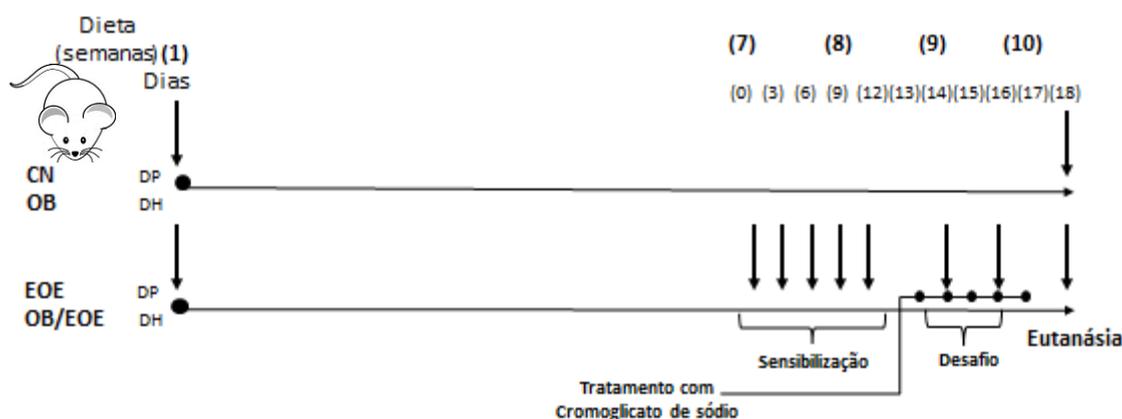


Figura 8 - Delineamento experimental do protocolo de indução do modelo de obesidade e esofagite eosinofílica experimental, induzida por OVA e do Protocolo de Tratamento com Cromoglicato de Sódio. Dieta padrão (DP) com 10% de calorias provenientes de gordura – Grupos CN e EoE; Dieta hiperlipídica (DH) com 60% de calorias proveniente de gordura – Grupos OB e OB/EoE, por 10 semanas. Sensibilizações por via s.c. com 100µg de OVA/50µL de solução salina estéril e desafios orais com 50mg de OVA/100µL de solução estéril de salina e solução 1,5g de OVA/1L de água filtrada – Grupos EoE e OB/EoE. Tratamento com cromoglicato de sódio – Grupos EoE e OB/EoE. Eutanásia no 18º dia do protocolo de esofagite eosinofílica experimental, que correspondeu a 24 horas após o último desafio com OVA.

5.8 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras biológicas foram obtidas após 10 semanas de dieta, 24 horas após o último desafio com a OVA. Os animais foram eutanasiados através de dose letal de solução de ketamina (90mg/Kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10mg/kg, Agener União, Brasil) por via intraperitoneal, seguida de exsanguinação por punção cardíaca e ruptura de diafragma. As amostras foram armazenadas individualmente, e mantidas, se necessário, sob refrigeração em biofreezer a -80°C até serem realizadas as análises.

5.9 COLETA DO SORO

Após a anestesia o sangue foi coletado a partir de punção cardíaca. As amostras foram centrifugadas a $7.500 \times g$, por 2 minutos à temperatura ambiente (TA) (Centrífuga 5410, Eppendorf, Alemanha) para obtenção do soro, que foi armazenado a -80°C .

5.10 COLETA E PROCESSAMENTO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por ruptura do diafragma e em seguida o lavado bronco alveolar (LBA) foi coletado através da inserção de sonda (CPL Medical's, São Paulo, SP, Brasil) na traqueia exposta. Os pulmões foram então lavados com 1 mililitro (mL) de solução tampão fosfato (PBS). O LBA coletado foi utilizado para a contagem total de células e, logo após, foi centrifugado a $440 \times g$, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA), para contagem diferencial de células.

5.11 COLETA DA MEDULA ÓSSEA

Para obtenção da medula óssea, o fêmur do membro (posterior/anterior) direito de cada animal foi retirado com o auxílio de material cirúrgico (pinças e tesouras). O canal medular foi lavado com 1 mL de PBS contido na placa, utilizando-se uma seringa de 5 ml e uma agulha (25x0,70 mm ou 22G1). A suspensão coletada foi utilizada para contagem total e diferencial de granulócitos na medula óssea.

5.12 COLETA E PROCESSAMENTO DO PULMÃO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS, QUIMIOCINA CCL11 E ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO) E MIELOPEROXIDASE (MPO).

Após a coleta do LBA, a caixa torácica do animal foi recortada longitudinalmente e o tecido pulmonar foi lavado através de perfusão com 10 mL de PBS gelado. Em seguida, o

lobo esquerdo pulmonar foi coletado e acondicionado a -80°C para posterior dosagem de citocinas e análise da atividade das enzimas EPO e MPO. O lobo direito do pulmão também foi coletado e fixado durante 24 horas em solução de formol tamponado 10% e após esse tempo foi acondicionado em álcool 70% até o processamento para análise histológica. Para a obtenção do homogenato, 100mg do lobo esquerdo do pulmão foi macerado em 1,0 mL de PBS contendo inibidores de proteases: 0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1mM cloreto de benzetonio, 10mM ácido etileno diamino tetracético (EDTA), 2 μL de aprotinina A e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C , até serem utilizados para dosagem de citocinas, quimiocinas e análise da atividade das enzimas através de ELISA direto.

5.13 COLETA DO TECIDO ADIPOSEO

Para coletar o tecido adiposo localizado na região perigonadal, foi realizada uma incisão na região abdominal. Em seguida, o tecido adiposo perigonadal foi pesado e acondicionado em formol tamponado 10% para posterior análise histológica.

5.14 COLETA DO CECO

O ceco do animal foi removido por corte na região distal. Posteriormente, o mesmo foi limpo para retirada da digesta, fixado durante 24 horas em solução de formol tamponado 10% e após esse tempo foi acondicionado em álcool 70% até o processamento para análise histológica.

5.15 COLETA DO ESÔFAGO E TRAQUEIA

O esôfago e a traqueia do animal foram retirados. O esôfago foi seccionado em quatro partes, na porção proximal (da boca) foi realizado um corte longitudinal para mensurar o diâmetro, com paquímetro digital e o resultado foi expresso em milímetros (mm). A porção mediana foi retirada e colocada em 200 μL de RNA later por 24 horas em refrigerador de 4°C , após este tempo foi colocado no freezer a -80°C para posterior avaliação da expressão gênica

por qRT-PCR. A porção distal do esôfago e a traqueia foram fixados durante 24 horas em solução de formol tamponado 10% e após esse tempo foram acondicionados em álcool 70% até o processamento para análise histológica. E a porção final do esôfago, próxima ao estomago, foi desprezada.

5.16 DOSAGEM SÉRICA DE IgE ANTI-OVA

A avaliação da produção IgE específica anti-OVA foi analisada através de ELISA. Após a sensibilização com 0,1mg/mL de OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) em tampão carbonato (100 µL/poço), a placa foi incubada a 4°C por 18 horas e lavadas a seguir com PBS Tween 20 0,05% (PBST). Após bloqueio com 5% de leite em pó desnatado (Molico) em PBST (200 µL/poço), a placa foi lavada e as amostras de soro foram adicionadas, seguido de incubação por 1 hora. A seguir, a placa foi novamente lavada e o anticorpo anti-IgE (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionado. A estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi adicionada após incubação (1 hora TA) e em seguida a placa foi lavada. A seguir, a reação foi revelada pela adição de substrato contendo ácido cítrico 0,1M, citrato de sódio 0,1M, água destilada, cromógeno ortofenilendiamina (OPD) e H₂O₂ 30%. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e os resultados plotados como densidade ótica. ortofenileno-diamina

5.17 DOSAGEM DOS NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA E TNF- α

As análises dos níveis séricos de Leptina e TNF- α foram realizadas com os Kits de Leptina (Pepro Tech, EUA) e TNF- α (BD OptEIA, BD Biosciences, EUA) pelo método de ELISA de acordo com as instruções dos fabricantes. As alíquotas de soro congelados a -80°C foram descongelados, as placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico e incubadas por 18 horas a 4°C. Em seguida, lavadas quatro vezes com PBS-Tween e bloqueadas com PBS + Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes e, em seguida, as amostras dos

animais utilizados e os padrões da Leptina e TNF- α foram adicionados. As placas foram então incubadas por 2 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes, o 2º anticorpo biotilado e o complexo enzimático acrescentado e a placa incubada por 2 horas a TA. Após a incubação as placas foram lavadas seis vezes e a reação revelada pela adição do substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) para o TNF- α e ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato (ABTS), para a Leptina, em seguida foram bloqueadas com ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450nm para TNF- α e 405nm para Leptina. As quantidades foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (TNF- α , BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, EUA; Leptina, Pepro Tech, EUA).

5.18 DOSAGEM DE GLICEMIA DE JEJUM, TRIGLICÉRIDES, COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES

A dosagem de glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total e frações foi realizada em outro grupo experimental, em somente animais do grupo controle, alimentados com a dieta padrão e animais do grupo obeso, alimentados com dieta hiperlipídica. Os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas. As determinações da glicemia de jejum, triglicérides (TG), colesterol total (Col), colesterol-HDL (lipoproteína de alta densidade - HDL-C) e colesterol-LDL (lipoproteína de baixa densidade - LDL-C) foram realizadas utilizando os reagentes da marca Labtest® e o analisador Cobas Mira plus (Roche®). Para a dosagem de triglicérides, glicose e colesterol foram utilizados método enzimático colorimétrico. Na dosagem do colesterol-HDL foi utilizado um método colorimétrico sem precipitação. Os níveis de colesterol-LDL foram calculados por aplicação da equação de Friedewald, $LDL-C = Col - (HDL-C + TG/5)$.

5.19 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR

A contagem total de células no LBA foi realizada utilizando corante de Turk (Sigma-Aldrich). As células foram contadas em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos como número específico de células x 10^4 /mL de LBA. O sedimento do LBA foi utilizado para a contagem diferencial de leucócitos, feita em *cytopsin*. Para isto, 200 μ L do sedimento do LBA, contendo aproximadamente 1×10^4 células, foram citocentrifugados a 440 x g por 6 minutos à T.A (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com Panótipo rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil), sendo contadas 300 células por lâmina, em microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

5.20 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE GRANULÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA

Após a coleta na medula óssea, a suspensão celular foi diluída na proporção de 1:10 e homogeneizada em tubo cônico de 15 mL. Esta suspensão celular foi utilizada para contagem total de células em câmara de Neubauer (com corante de Turk). Para isto, 100 μ L do sedimento do *flush* de medula óssea, contendo aproximadamente 1×10^6 células, foi citocentrifugado a 440 x g por 6 minutos à T.A (FANEM 248, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as lâminas foram coradas com Panótipo rápido (Laborclin Ltda, Pinhais, Brasil). De acordo com critérios morfológicos e com a coloração diferenciada apresentada pelos grânulos eosinofílicos, foram contadas 300 células no total entre neutrófilos e eosinófilos maduros, em microscópio ótico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumento de 400X.

5.21 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO ESÔFAGO, TRAQUEIA, PULMÃO E CECO

Para a contagem de eosinófilos no esôfago, traqueia, pulmão e ceco, após seções rotineiras de desparafinização e desidratação, os cortes foram corados com o corante Direct Red 80 - Sirius Red (Sigma Aldrich), por uma hora. Para o pulmão, foram analisados 20 campos, em uma área delimitada por retículo Olympus (10mm/10) na região peribroncovascular, em aumento de 1000X, a contagem foi expressa por número de eosinófilos por 100 μ m². Para o esôfago, traqueia e intestino, foram analisados o número de eosinófilos por corte maior aumento (1000X) e a contagem foi expressa em número de eosinófilos por campo de maior aumento (hpf).

5.22 CONTAGEM DE MASTÓCITOS NO ESÔFAGO, TRAQUEIA, PULMÃO E CECO

Para contagem de mastócitos, os cortes do esôfago, traqueia, pulmão e intestino, após seções rotineiras de desparafinização e desidratação, foram corados com Azul de Toluidina (Sigma Aldrich) por 2 a 3 min. O número de mastócitos foi obtido em toda extensão dos cortes, em aumento de 400X.

5.23 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINA CCL11 NO HOMOGENATO DO TECIDO PULMONAR

O sobrenadante do homogenato do tecido pulmonar foi utilizado no ensaio enzimático ELISA para as citocinas IL-4, IL-5 (BD OptEIA, BD Biosciences, EUA) e IL-9, IL-13, IL-25, IL-33, TSLP e CCL11 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as instruções dos fabricantes. Para isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas em PBST, seguindo-se um bloqueio dos sítios inespecíficos da placa por 1 hora. As amostras foram adicionadas em cada poço e paralelamente para obtenção das curvas-padrão, foram adicionadas as concentrações indicadas dos recombinantes específicos para cada citocina. Após o tempo pré-estabelecido foram realizadas a lavagem das placas. Em seguida para os kits BD OpTEIA, o complexo anticorpo de captura biotilado e streptavidina foram adicionados e incubados por 2 horas em TA. Para os kits R&D Systems, primeiramente foi adicionado e incubado o anticorpo de captura por 2 horas em TA. As placas foram lavadas e posteriormente foi adicionada streptavidina, seguida de incubação por 1 hora em TA. As placas foram lavadas e foi adicionado substrato TMB. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M e as leituras foram realizadas a 450 nanômetros (nm) em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA).

5.24 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO) NO TECIDO PULMONAR

Para a dosagem da atividade da enzima EPO, o sedimento do homogenato pulmonar foi processado, após lise das hemácias, as amostras foram novamente centrifugadas a 440 x g, por 15 minutos a 4° C (CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 1,9 mL de hexadeciltrimetil brometo de amônio (HTAB) 0,5% em PBS e homogeneizado. A seguir, as amostras foram congeladas três vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas conforme condições descritas acima. Para análise da atividade de EPO, 50 µL do sobrenadante do homogenato pulmonar foram colocados em uma placa de 96 poços, juntamente com 50 µL de substrato contendo 1,5 mM de OPD em tampão tris-ácido clorídrico (HCl)- 0,075mM (pH = 8,0), acrescido de H₂O₂ 6,6 mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos à TA, no escuro. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

5.25 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para avaliação histológica, a porção distal do esôfago, traqueia, lobo pulmonar esquerdo, região distal do ceco e tecido adiposo foram fixados durante 24 horas em solução de formol tamponado 10%. Após os procedimentos rotineiros de inclusão em parafina, foram realizados cortes semi-seriados de 5 micrometros (µm) de espessura, em micrótomo (Leica RM 2125RT, Biosystems, Alemanha). Os cortes foram corados com o corante Direct Red 80-Sirius Red (Sigma Aldrich), para contagem de eosinófilos; Azul de Toluidina (Sigma Aldrich), para contagem de mastócitos; Tricrômio de Masson (Easypath – Erviegas Ltda), para análise da área de remodelamento, determinada através da análise da imagem com o uso do software Image-Pro Plus® versão 6.0; Hematoxilina e Eosina (H&E) (Sigma Aldrich), para análise dos adipócitos e contra coloração com Hematoxilina para análise da ativação dos mastócitos, por Imuno-histoquímica com anticorpo anti-Triptase. As lâminas foram cegadas para contagem.

5.26 ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS NO TECIDO ESOFÁGICO

A imuno-histoquímica foi utilizada para avaliação da ativação dos mastócitos no tecido esofágico. Para isso foi utilizada a expressão da enzima triptase, uma das principais proteases secretada pelos mastócitos ativados. A metodologia utilizada foi da Biotina-estreptavidina peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Para isso, cortes histológicos de 5µm de espessura foram colocados em lâmina silanizadas. As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas e na sequência, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10V (3%). Foi então realizada a lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida em alta temperatura. Após este período as lâminas foram lavadas em PBS. Finalizada a etapa do bloqueio, a solução com os anticorpos primário triptase (Mast Cell Tryptase - AA1 sc-59587) (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Inc), foi aplicada nos cortes histológicos em seguida as lâminas foram incubadas overnight a 4°C. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS. Os cortes foram em seguida, incubados por 45 min com o anticorpo secundário (m-IgGκBP-B: sc-516142) a 1µg/mL (Santa Cruz Biotechnology, Inc), em seguida foi adicionada o complexo biotina-estreptavidina (ImmunoCruz® ABC Kit: sc-516216) por 30 min e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Santa Cruz Biothecnology, Inc). Os grânulos da enzima triptase, liberados pelos mastócitos ativados foram visualizados e quantificados através da análise da imagem com o uso do software Image-Pro Plus ® versão 6.0.

5.27 CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA

Para derivação de células dendríticas da medula óssea, foram retirados os dois fêmures, após a eutanásia dos animais, em capela de fluxo laminar, utilizando materiais cirúrgicos estéreis. Os ossos foram limpos, cortados em suas duas extremidades e lavados, inserindo uma seringa no canal medular com 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (do inglês “Roswell Park Memorial Institute”) (GIBCO), em cada fêmur. Em seguida as suspensões celulares foram centrifugadas a 440 x g, por 5 minutos, a 4°C e o “pellet” formado foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) e 1% dos antibióticos penicilina (100 U/mL, GIBCO) e estreptomicina (1 µg/mL, GIBCO). Uma alíquota foi retirada para contagem das células, diluídas em Azul de Tripán, 0,2%, em Câmara de Neubauer, afim de verificar a viabilidade celular.

As células foram então distribuídas em placas de 6 poços na concentração de 5×10^6 células/mL e suplementadas com os fatores de crescimento celular 20 ng/mL de GM-CSF (do inglês “Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulantig Factor”) (PETROTECH) e 10 ng/mL de IL-4 (PETROTECH). As placas foram incubadas, em seguida, em estufa com 5% de CO₂ a 37° C por 4 dias. No 4º dia, as amostras foram gentilmente homogeneizadas e tiveram o sobrenadante coletado, transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 440 x g, por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuscitado em meio de cultura RPMI suplementado com 10 ng/mL de GM-CSF e 5 ng/mL de IL-4. As células foram plaqueadas em placa de 6 poços e novamente colocadas na estufa com 5% de CO₂ a 37°C por mais três dias.

No 7º dia de cultura, as células não aderentes foram coletadas, adicionado mais 2 mL de meio de cultura RPMI suplementado, centrifugada a 440 x g, por 10 minutos, 10°C e o “pellet” foi ressuscitado em meio não suplementado com os recombinantes e uma alíquota foi novamente usada para contagem em Câmara de Neubauer, com posterior plaqueamento das células na concentração de 5×10^4 células/poço em placa de fundo U (Adaptado (MATHEU et al., 2008).

Posteriormente, foi adicionado às células, o estímulo OVA, na concentração de 100ng/mL. As células foram então incubadas com o estímulo por um período de 24 horas. No dia seguinte, a solução de DCs foi centrifugada a 440 x g, por 5 minutos a 4°C, para se retirar o estímulo. Em seguida, foram marcadas com os anticorpos anti-CD11c (PE), anti-MHCII (APC) e anti-CD80 (FITC) para caracterização das células dendríticas ativadas por citometria de fluxo (Tabela 3).

5.28 CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise de citometria de fluxo, baço e linfonodos mediastinais foram removidos e acondicionados em meio de cultura RPMI 1640 até o processamento. Os órgãos foram então macerados com tampão de extração (meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB e 0,075% de EDTA) em *cell strainer* (70 µm). Os macerados foram centrifugados a 440 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 1mL de tampão FACS (PBS com 2% de Soro Fetal Bovino e 0,1% de azida sódica) e 4 mL de tampão de lise. Após os 10 minutos, as amostras foram centrifugadas e ressuscitadas em 1 mL de tampão FACS. Uma alíquota das células foi contada em Azul de Tripán e foram plaqueadas

2×10^5 células por poço em uma placa de fundo U. O bloqueio de receptores Fc foi feito com uma solução de FcBlock na proporção de 1:150. Após centrifugação e remoção do bloqueio as células foram marcadas de acordo com a tabela 4, abaixo. As marcações intracelulares foram realizadas após permeabilização e fixação com reagente Cytotfix/Cytoperm.

Tabela 3. Painel de fluorocromos utilizados na fenotipagem por Citometria de Fluxo.

Painel	Marcador	Diluição	Fluorocromo	Clones
Linfócitos B	CD19	1:150	FITC	1D3
	CD40	1:150	APC	3/23
	PDL1	1:150	PE	MIH5
Linfócitos Th2	CD3	1:150	PercP	145-2011
	CD4	1:150	PE	L3T4
	GATA3	1:100	Alexa Fluor 647	L50823
	IL4	1:100	BV421	11B11
Linfócitos T Regulatórios	CD3	1:150	PercP	145-2011
	CD4	1:150	PE	L3T4
	CD25	1:150	APC	PC61
	FoxP3	1:50	Alexa Fluor 488	MF23
Células Dendríticas Perfil de Ativação	CD11c	1:150	PE	HL3
	MHCII	1:150	APC	AMS321
	CD80	1:150	FITC	16-10A1
Células Dendríticas Perfil Regulatório	CD11c	1:150	FITC	HL3
	MHCII	1:150	APC	AMS321
	PDL1	1:150	PE	MIH5

5.29 RT-PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DE PCR QUANTITATIVA PARA IL-5, IL-4, IL-9, IL-13, IL-33, TSLP, CCL11, IL-10, FOXP3 E GATA3

As amostras da porção mediana do esôfago foram coletadas após indução do modelo de EoE para avaliação da expressão gênica por qRT-PCR de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-33, TSLP, CCL11, IL-10, FOXP3 e GATA3. As porções medianas do esôfago foram coletadas e imediatamente imersas em RNA later (Ambion, Austin, TX), armazenadas a 4°C por 24 horas e em seguida a -80° C, até posterior caracterização. O RNA total foi extraído das amostras utilizando RNeasy mini kits (Qiagen, Valencia, CA), com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA) para

remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. Ao final desse processo, foi gerado um volume de 40 μ L de solução (RNA total + 40 μ L de água RNase-free). Pequena quantidade de RNA (0,5 μ g) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) para verificar a integridade do material pela presença das bandas de RNA ribossomais 28S e 18S. A concentração de RNA foi avaliada por espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, San Jose, CA). O RNA quantificado foi armazenado a -80° C até o momento de sua utilização na síntese de DNA complementar (cDNA). Posteriormente, 1 μ g de RNA foi utilizado para sintetizar cDNA usando Super Script III First Strand (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi então quantificado em espectrofotômetro e utilizado nas reações de PCR em tempo real. A seguir, 1 μ g de DNAc foi amplificado na presença de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e primers específicos para os genes em estudo (Sigma-Aldrich). As amostras foram submetidas a 40 ciclos nas seguintes condições de termociclagem: 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento por 20 segundos e 60°C por 30 segundos. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 segundos, iniciando-se em 95°C) para a geração de uma curva de *melting*. A análise dessa curva permitiu verificar a especificidade da reação, ou seja, se não havia a presença de bandas inespecíficas e/ou dímeros de primers. A análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do software Real-Time System RQ Study software V1.3.1 9 (Applied Biosystems). Por meio desse software determinou-se o ponto de corte, denominado de “threshold cycle” (Ct) ou limiar de detecção, de cada amostra testada. Quanto maior a concentração inicial, mais precoce o Ct. Assim, construiu-se uma curva-padrão na qual foram plotados os resultados das amostras em investigação, permitindo a sua quantificação. Para controlar as variações na quantidade de amostra, na quantidade e qualidade do RNA usado na reação de transcrição reversa e a eficácia dessa reação, em cada amostra foi determinado o nível de expressão (número de cópias) do gene constitutivo: β -actina. A expressão relativa, foi calculada com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, e foi apresentada como a expressão do gene alvo em uma amostra alvo, em relação a uma amostra de referência, normalizadas para um gene de referência (Tabela 4).

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento.

Gene analisado	Sequência de Oligonucleotídeos (5'- 3')	Temperatura de anelamento
IL-4	Forward: TTGAGAGAGATCATCGGCATTTTG Reverse: TCAAGCATGGAGTTTTCCCATGT	63
IL-5	Forward: TGTTGACAAGCAATGAGACGATGA Reverse: AATAGCATTTCCACAGTACCCCA	64
IL-9	Forward: CATCAGTGTCTCTCCGTCCCAACTGATG Reverse: GATTTCTGTGTGGCATTGGTCAG	63
IL-13	Forward: AGCTGAGCAACATCACACAAGACC Reverse: TGGGCTACTTCGATTTTGGTATCG	64
IL-33	Forward: TGAGACTCCGTTCTGGCCTC Reverse: CTCTTCATGCTTGGTACCCGAT	64
TSLP	Forward: AGGCTACCCTGAAACTGAG Reverse: GGAGATTGCATGAAGGAATACC	60
CCL11	Forward: CACGGTCACTTCCTTCACG Reverse: GGGGATCTTCTTACTGGTA	57
IL-10	Forward: CCAAGCCTTGTCGGAAATGA Reverse: GTTCACGTGCTCCTTGATGTCA	57
FOXP3	Forward: AGCAGTGTGGACCGTAGATGA Reverse: GGCAGGGATTGGAGCACTT	57
GATA3	Forward: CGGCTTCATCCTCTTCTGTG Reverse: ACACACTCCCTGCCTTCTGT	55
β -actin	Forward: GCTGTCCCTGTATGCCTCT Reverse: GTCACGCACGATTTCCCTC	57

5.30 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados por média \pm erro padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste paramétrico t' student, de acordo com a análise de variância dos dados e One-Way ANOVA, com o pós teste Bonferroni para comparações múltiplas, para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prism 6.0 (Graphpad Software, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS BALB/c APÓS DEZ SEMANAS DE DIETA

6.1.1 Consumo das dietas padrão e hiperlipídica, ganho de peso e acúmulo de gordura perigonadal

Inicialmente, para a confirmação da indução da obesidade foi analisado o consumo da dieta padrão pelos animais dos grupos controle (CN) e esofagite eosinofílica (EoE) e da dieta hiperlipídica pelos animais dos grupos obeso (OB) e obeso/esofagite eosinofílica (OB/EoE). A análise do consumo das dietas foi realizada a cada dois dias durante as 10 semanas do protocolo de indução da obesidade, possibilitando a obtenção da média de consumo semanal. Os resultados demonstraram que durante a primeira semana do protocolo, as médias de consumo entre os animais foram semelhantes em todos os grupos, no entanto, a partir da segunda semana, houve redução significativa no consumo pelos animais do grupo OB, quando comparados ao grupo CN, e esta diferença se manteve durante todo o protocolo de indução de obesidade (Figura 9A e 9B). Os grupos EoE e OB/EoE apresentaram comportamento semelhante aos animais obesos e controles. Sendo assim serão mostrados apenas os dados relacionados a estes animais, para os parâmetros pertinentes à indução da obesidade.

Adicionalmente, o ganho de massa corporal também foi acompanhado semanalmente, e foi observado que a partir da primeira semana do protocolo, a massa corporal dos animais do grupo OB foi superior aos animais do grupo CN, havendo diferença significativa entre os grupos durante todo o período de indução da obesidade (Figura 9C). Além disso, a porcentagem de ganho de massa ao final do protocolo foi significativamente maior nos animais do grupo OB quando comparado ao grupo CN (Figura 9D). Contribuindo para o ganho de massa, houve também acúmulo de tecido adiposo nos animais do grupo OB, representado pelo acúmulo de gordura perigonadal (Figura 9E).

Uma característica marcante da obesidade é a hipertrofia dos adipócitos, que altera a produção de citocinas, por estas células, para um perfil pró-inflamatório. Eventualmente, a hipertrofia pode levar à morte dos adipócitos e à liberação de conteúdo celular no espaço extracelular. Acredita-se que isso desencadeie uma resposta inflamatória, em particular de macrófagos com fenótipo classicamente ativados ou M1, que envolvem os adipócitos que exibem características de células mortas, para formar estruturas semelhantes a coroa de células (CLS), uma das características da obesidade crônica (CINTI et al., 2005; DALMAS et al., 2011). A observação histológica do tecido adiposo perigonadal, indicou que os adipócitos dos animais do grupo OB, apresentaram maior tamanho quando comparados aos adipócitos dos animais do grupo CN, sugerindo que a dieta hiperlipídica foi capaz de causar a hipertrofia dessas células quando comparada à dieta padrão (Figura 9F). Ainda foi possível observar a formação da estrutura em forma de uma coroa ou CLS nos animais do grupo OB (Área em destaque).

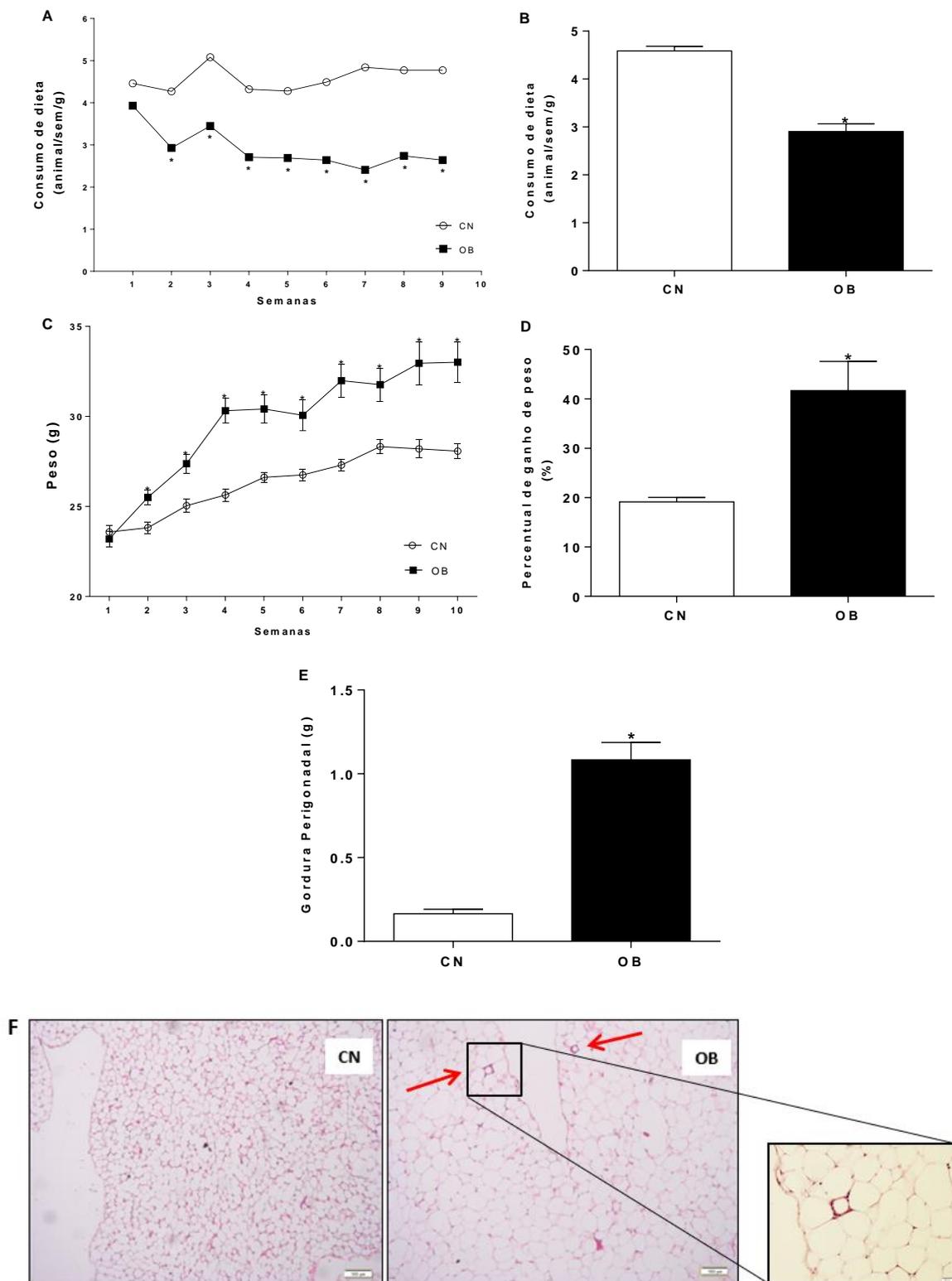


Figura 9. Efeito de dieta hiperlipídica em camundongos BALB/c. Consumo das dietas padrão (10% de calorias derivada de gordura) e hiperlipídica (60% de calorias derivada de gordura) (A); Média do consumo diário/animal/g durante o protocolo (B); Curva de ganho de massa (C); Porcentagem de ganho de massa (D); Acúmulo de gordura perigonadal (E). Imagem representativa da histologia do tecido adiposo perigonadal, aumento 100x, coloração H&E. Formação de estrutura em forma de uma coroa de células ou CLS nos animais do grupo OB, seta em vermelho (área em destaque, aumento 400x) (F). Animais CN e OB, após 10 semanas de protocolo. Cada barra representa a média \pm EPM. $*p < 0.05$ (n=8 animais por grupo).

6.1.2 A obesidade induz um estado inflamatório sistêmico nos animais estudados

O estado inflamatório decorrente do acúmulo de gordura, presente na obesidade, predispõe a comorbidades, que incluem a intolerância à glicose e dislipidemia (OUCHI et al., 2011). Para avaliar o efeito da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica, os níveis séricos de glicose e do perfil lipídico foram mensurados. Foi realizada a análise da glicemia de jejum no último dia do protocolo, a figura 10A mostra que os animais do grupo OB apresentaram glicemia em jejum maior quando comparada a glicemia dos animais do grupo CN. Além disso, foi observado que houve aumento das taxas de colesterol total (Figura 10B), colesterol-HDL (Figura 10C), colesterol-LDL (Figura 10D) e triglicérides (Figura 10E) no soro dos animais do grupo OB quando comparados aos animais do grupo CN.

Do mesmo modo, a obesidade gera um quadro de inflamação sistêmica, tanto em humanos quanto em modelo experimental (BUNOUT et al., 1996; MORI et al., 2010). Desta forma, com o objetivo de avaliar se o presente modelo de obesidade reproduz esse estado, os níveis séricos da citocina pró-inflamatória TNF- α e da adipocina leptina, também foram avaliados. A análise, demonstrou que houve um aumento significativo no soro de TNF- α e de leptina nos animais do grupo OB quando comparados com os animais do grupo CN (Figura 10F e 10G). As sensibilizações e os desafios com a OVA, não induziram um perfil diferente para os níveis de TNF- α e leptina, nos grupos EoE e OB/EoE, dados não mostrados.

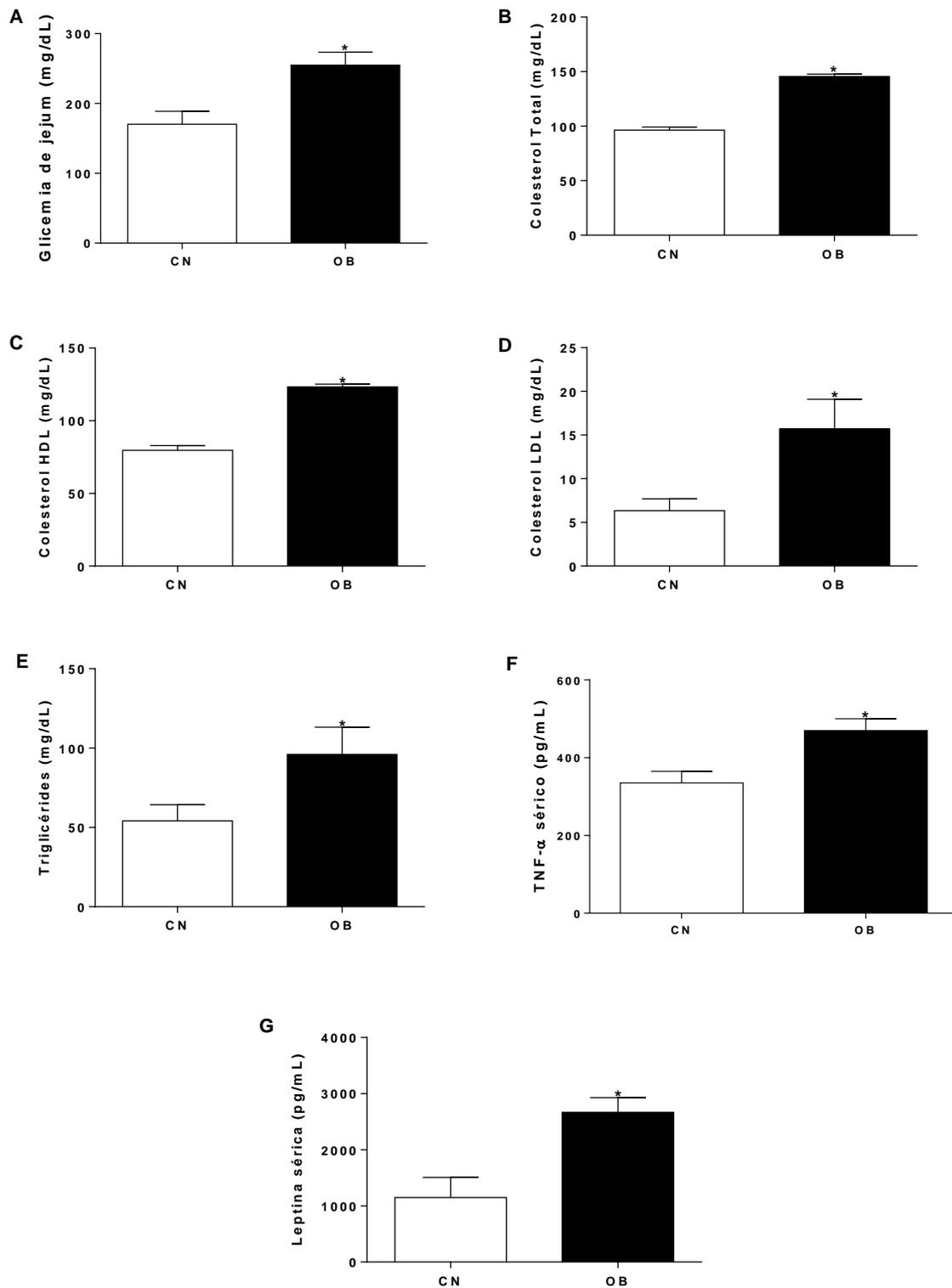


Figura 10. Efeito da dieta hiperlipídica sobre as taxas de glicemia de jejum, perfil lipídico e inflamatório. Glicemia de Jejum (A); Colesterol total (B); HDL-C (C); LDL-C (D) e Triglicérides (E) Níveis séricos de TNF- α (F) e Leptina (G). No soro dos animais CN e OB, após 10 semanas de protocolo. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$ (n=10 animais por grupo).

6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA, SOBRE A RESPOSTA IMUNE EM MODELO DE ESOFAGITE EOSINOFÍLICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA

6.2.1 Obesidade causa modificações na medida do diâmetro do esôfago

Vários estudos relatam que ocorrem modificações, com o tempo, no diâmetro do esôfago dos pacientes com esofagite eosinofílica (SCHOEPPFER et al., 2013; MOAWAD et al., 2016). Foi então realizada a determinação da medida do diâmetro do esôfago nos animais estudados e observou-se que os animais dos grupos OB e OB/EoE obtiveram maior medida em relação aos animais do grupo CN. Além disso, os animais do grupo OB/EoE apresentaram o esôfago com maior diâmetro quando comparado aos animais do grupo EoE (Figura 11).

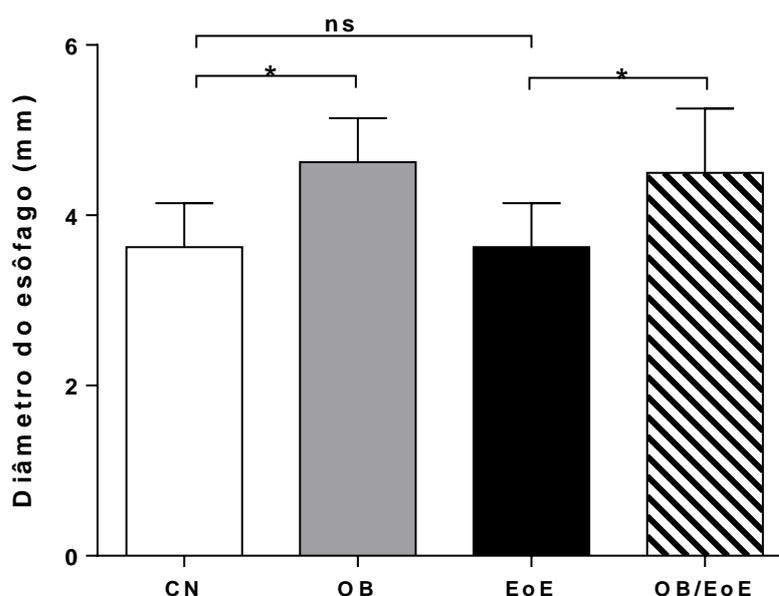


Figura 11. Modificações no diâmetro do esôfago, após indução da obesidade. Medida do diâmetro do esôfago (mm), nos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE, após 10 semanas de dieta. Eutanásia 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média +/- EPM. * $p < 0.05$; ns, não significativo (n=8 animais por grupo).

6.2.2 Consumo de dieta hiperlipídica, contendo 60% de Kcal derivada de gordura, aumenta o influxo de mastócitos nos animais obesos/alérgicos

Os mastócitos são células abundantes no infiltrado inflamatório na esofagite eosinofílica (ROTHENBERG, 2015; ARIAS, A.; LUCENDO; et al., 2016). Nos primeiros

experimentos, foi possível observar um aumento significativo do número de mastócitos no esôfago, traqueia e intestino dos animais do grupo OB/EoE em relação aos demais grupos, dados não mostrados. Estes resultados nos motivaram avaliar o papel dessas células no modelo concomitante de obesidade/esofagite eosinofílica experimental. Para isto utilizamos o fármaco cromoglicato de sódio (CG), um reconhecido estabilizador da ativação de mastócitos (SHAPIRO; KÖNIG, 1985; LUCENDO et al., 2017). O esquema de tratamento com o CG foi determinado com base na sua farmacocinética, que nos relata que este fármaco possui apenas 1% de biodisponibilidade, e é rapidamente absorvido para a circulação sistêmica. Sua concentração plasmática máxima ocorre após 15 minutos, com uma meia vida de eliminação de 80 a 90 minutos (GIRARD; BERTRAND, 1975).

Assim, foi realizada a análise histológica do esôfago, traqueia e intestino, para a contagem de mastócitos, através da coloração com Azul de Toluidina. Para melhor compreensão dos resultados, os grupos dos animais estudados receberam as seguintes conotações: CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL), para os animais não tratados (que receberam salina), e EoE e OB/EoE (CG), para os grupos dos animais tratados (com CG). Os grupos CN e OB (CG), não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros analisados (dados não mostrados).

Após a indução do modelo de EoE, o grupo EoE, no esôfago e intestino, apresentou aumento significativo de mastócitos em relação ao grupo controle (Figuras 12B e 14B). O grupo OB/EoE (SAL) apresentou um número significativamente maior de mastócitos em relação ao grupo EoE (SAL) para todos os tecidos analisados (Figuras 12B, 13B e 14B). Vale ressaltar que o grupo OB (SAL), também apresentou um número maior, estatisticamente significativo, na contagem dessas células, em relação ao grupo CN (SAL), no esôfago (Figuras 12B). Os grupos EoE e OB/EoE (CG) apresentaram redução na contagem de mastócitos quando comparados aos animais do grupo (SAL) em todos os tecidos analisados (Figuras 12B, 13B e 14B).

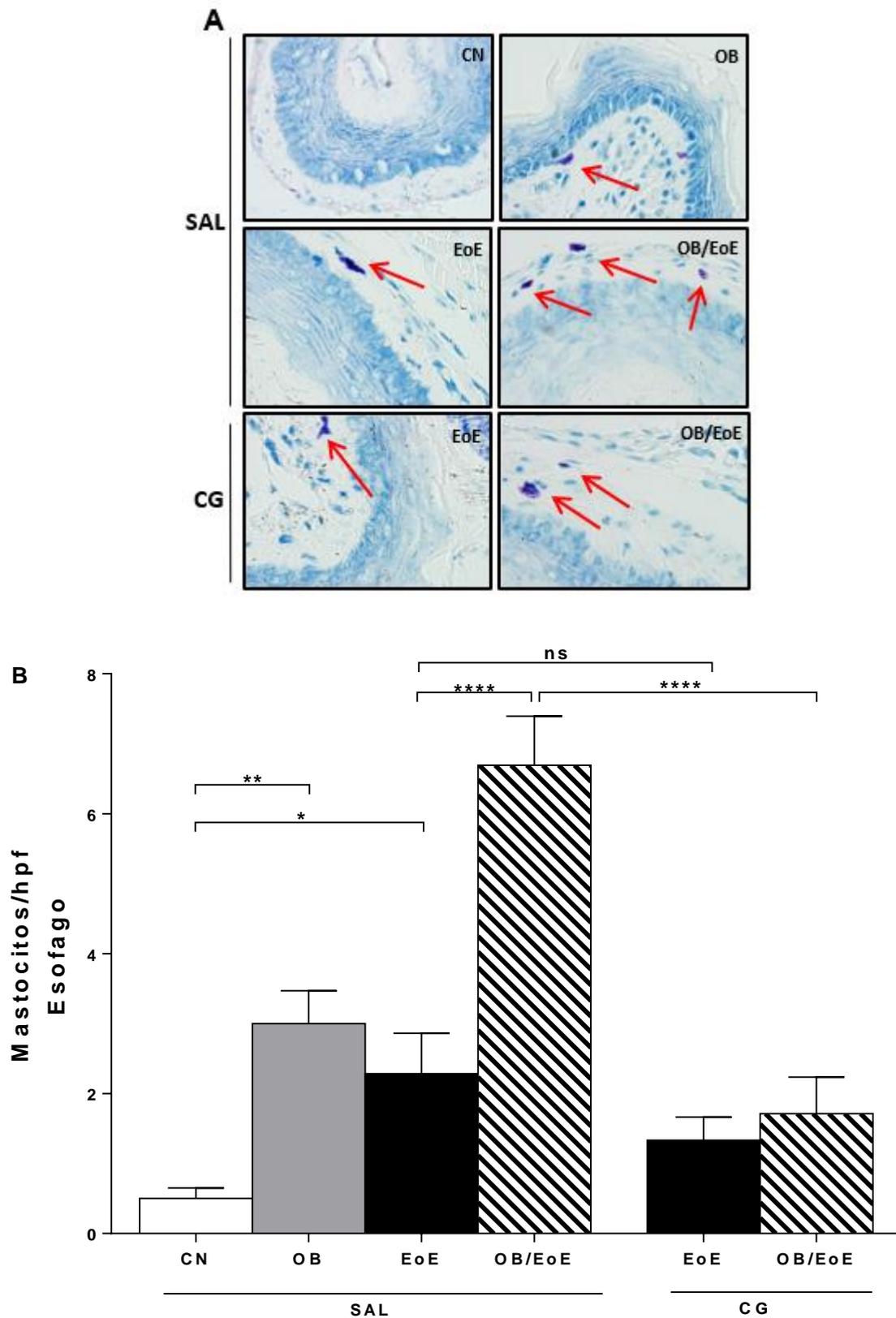


Figura 12. Contagem de Mastócitos no esôfago. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração azul de toluidina, aumento 1000x (A). Contagem de mastócitos no esôfago (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

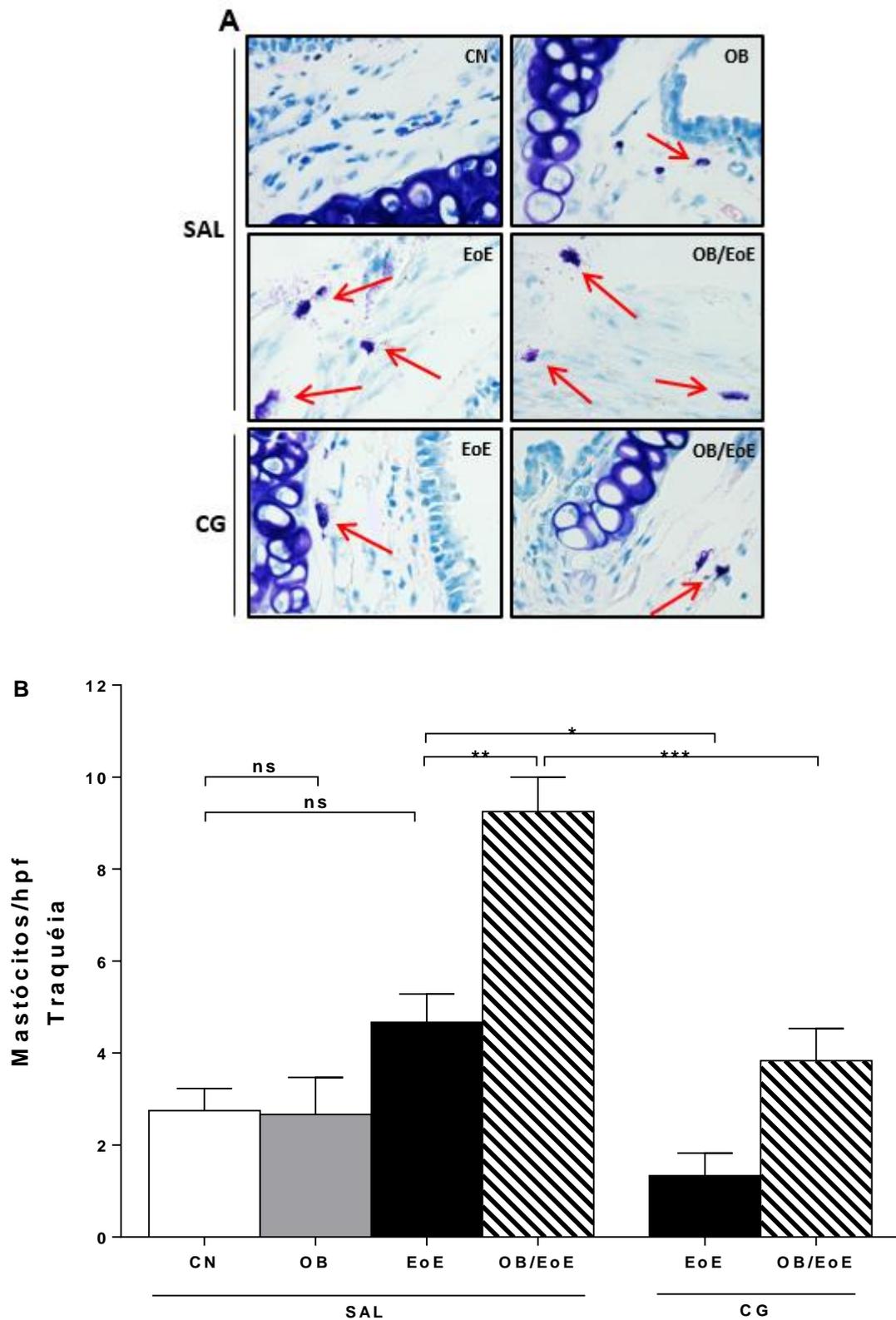


Figura 13. Contagem de Mastócitos na traquéia. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração azul de toluidina, aumento 1000x (A). Contagem de mastócitos na traquéia (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

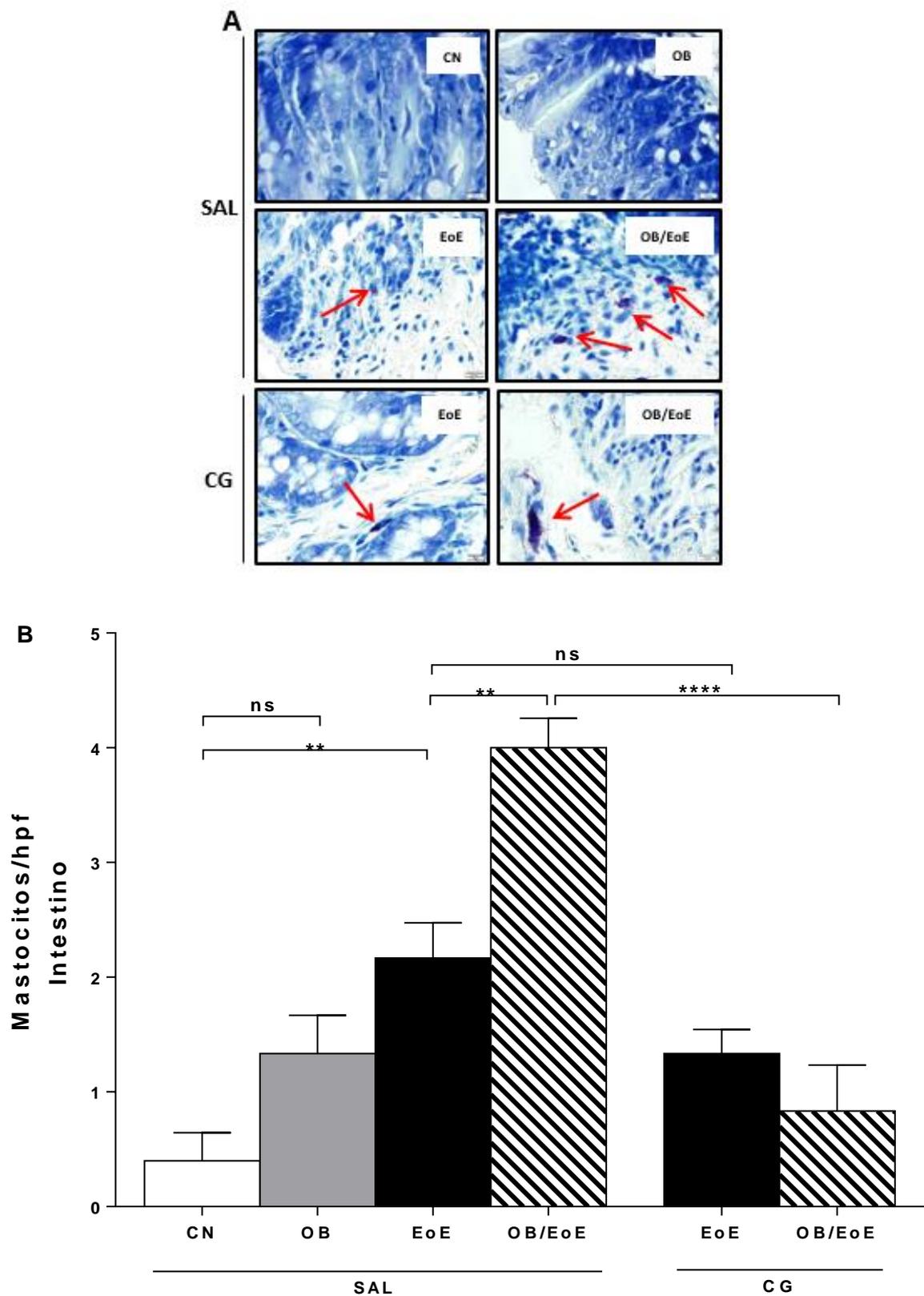


Figura 14. Contagem de Mastócitos no ceco. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração azul de toluidina, aumento 1000x (A). Contagem de mastócitos no intestino (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA Cada barra representa a média \pm EPM. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.3 A obesidade e o tratamento com cromoglicato de sódio, reduziram os níveis séricos de IgE específica anti-OVA nos animais alérgicos

Acredita-se que uma mistura das reações imunológicas como as reações imediatas, mediadas por IgE e as tardias, não mediadas por IgE, desempenhem um papel na EoE (CHEHADE; ACEVES, 2010). Por isso, os níveis séricos do anticorpo IgE, característico da resposta alérgica, também foram analisados. Os resultados demonstraram que os animais do grupo EoE, apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de IgE específica anti-OVA em relação ao grupo controle. Já os animais do grupo OB/EoE (SAL), apresentaram níveis significativamente menores quando comparados aos animais do grupo EoE (SAL). Quando avaliamos o grupo CG, observamos que houve uma redução significativa dos níveis séricos IgE nos grupos EoE e OB/EoE (CG), quando comparado aos níveis dos animais alérgicos do grupo (SAL) (Figura 15).

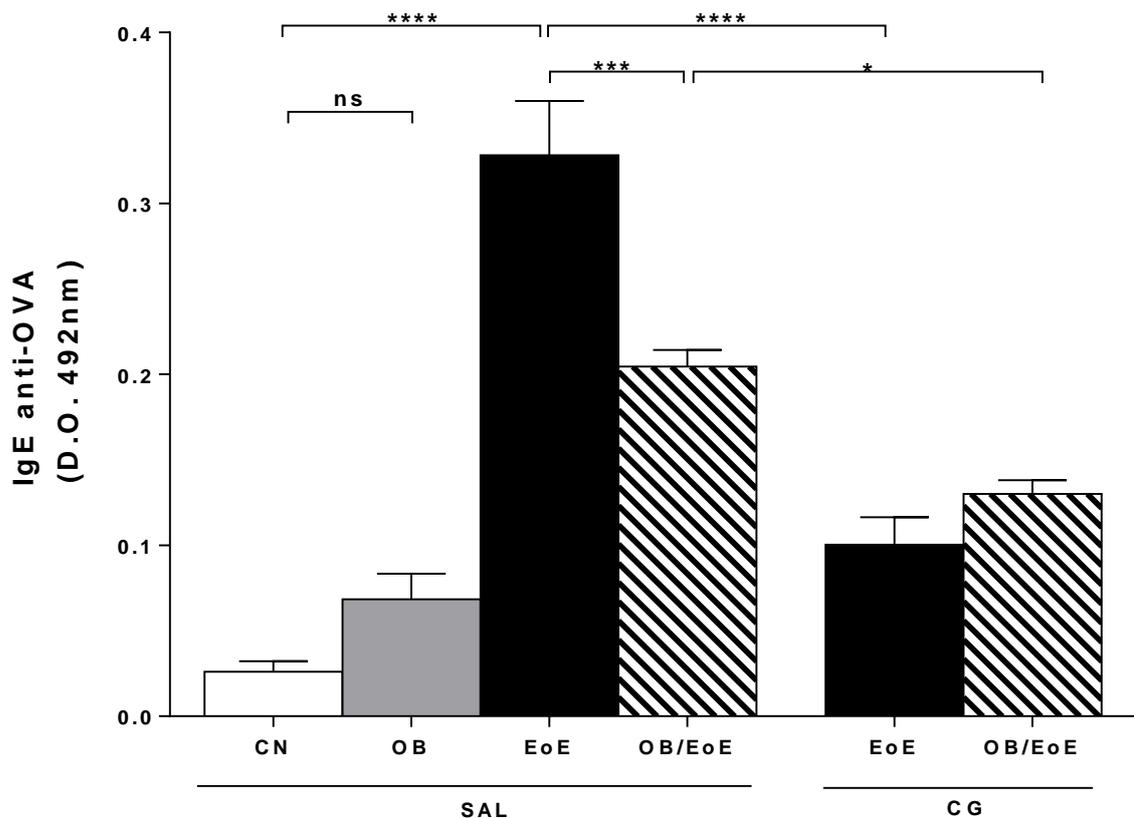


Figura 15. Avaliação dos níveis séricos de IgE específica anti-OVA. Dosagem do anticorpo IgE anti-OVA, dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA Cada barra representa a média +/- EPM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.4 A obesidade aumentou a ativação de mastócitos, com intensa degranulação e liberação de mediadores químicos, o tratamento com cromoglicato de sódio reduziu esta ativação

Os mastócitos podem contribuir para a patogênese da EoE, mas seu papel no diagnóstico ainda é desconhecido. Sua ativação, com degranulação e liberação de mediadores químicos, como a triptase, pode ser iniciada por vários fatores, incluindo ligação cruzada de anticorpos IgE (WERSHIL, 2009; DELLON et al., 2011). Com base nos resultados anteriores, que mostraram aumento do infiltrado de mastócitos no esôfago dos animais obesos/alérgicos e menores níveis de IgE, nosso objetivo foi determinar se o maior influxo dessas células estava relacionado com sua maior ativação e consequente liberação da triptase de seus grânulos de secreção.

Para isto, foi realizada imuno-histoquímica a partir de cortes histológicos do tecido esofágico, com isso foi possível observar que o grupo EoE (SAL) apresentou uma área de marcação positiva para triptase significativamente maior que o CN (SAL). Considerando que no grupo OB/EoE (SAL) este aumento foi ainda mais elevado em relação ao grupo EoE (SAL). O tratamento com o CG, nos grupos EoE (CG) e OB/EoE (CG), reduziu significativamente a área de marcação positiva para triptase em relação aos grupos EoE (SAL) e OB/EoE (SAL), respectivamente (Figuras 16A e 16B).

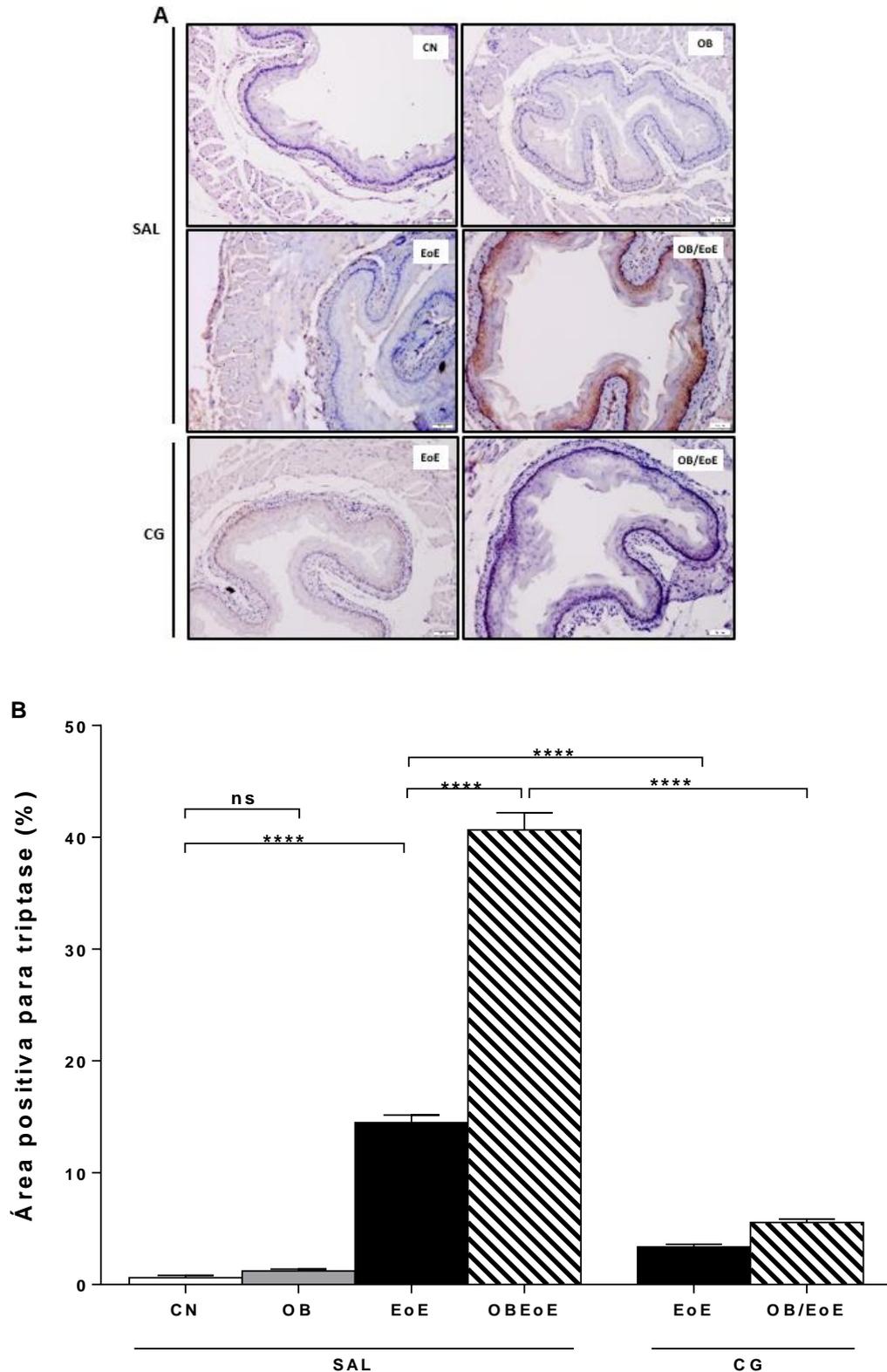


Figura 16. Avaliação da ativação mastócitos, pela liberação de triptase, no tecido esofágico. Imagem representativa da área de marcação positiva para triptase no esôfago, por imuno-histoquímica, aumento 100x (A) e gráfico do percentual (%) dessa área, determinada através da análise da imagem com o software Image-Pro Plus® versão 6.0 (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. **** $p < 0.0001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.5 Avaliação do efeito obesidade e do cromoglicato de sódio sobre o infiltrado eosinofílico nos animais alérgicos

O tecido esofágico é normalmente desprovido de eosinófilos, sendo assim, a presença dessa célula, nesta porção do tubo digestivo, pode ser indicativa de patologia subjacente (DEBROSSE et al., 2006; TALLEY et al., 2007). Para avaliar se houve infiltrado eosinofílico no esôfago dos animais estudados, foi realizada análise histológica desse tecido, utilizando-se a coloração com Sírius Red, onde se observou que o grupo EoE (SAL) apresentou número significativamente maior de eosinófilos em comparação ao grupo CN (SAL). Ao passo que no grupo OB/EoE (SAL) esse número foi significativamente maior comparado ao grupo EoE (SAL). Os grupos EoE e OB/EoE (CG) apresentaram redução na contagem dessas células quando comparados aos animais do grupo (SAL) (Figura 17B).

Outros estudos da doença eosinofílica experimental, desafiaram o paradigma de sensibilização que ocorre no trato gastrointestinal, demonstrando que não somente o esôfago, mas também na traqueia e no intestino, podem apresentar um acúmulo de eosinófilos (MISHRA et al., 2001). Desta forma, foram analisados os cortes histológicos da traqueia e intestino, e foi possível constatar que o grupo EoE, no intestino, apresentou aumento significativo de eosinófilos em relação ao grupo controle (Figuras 19B). Na traqueia e intestino do grupo OB/EoE (SAL) também houve um aumento significativo no número de eosinófilos em comparação ao EoE (SAL) (Figuras 18B e 19B).

Porém ao analisarmos o grupo CG, na traqueia, somente os animais dos grupos OB/EoE apresentaram redução na contagem de eosinófilos quando comparados aos animais do grupo (SAL) (Figuras 18B). Entretanto no intestino, houve redução significativa do infiltrado eosinofílico em ambos grupos, EoE e OB/EoE (CG) (Figura 19B).

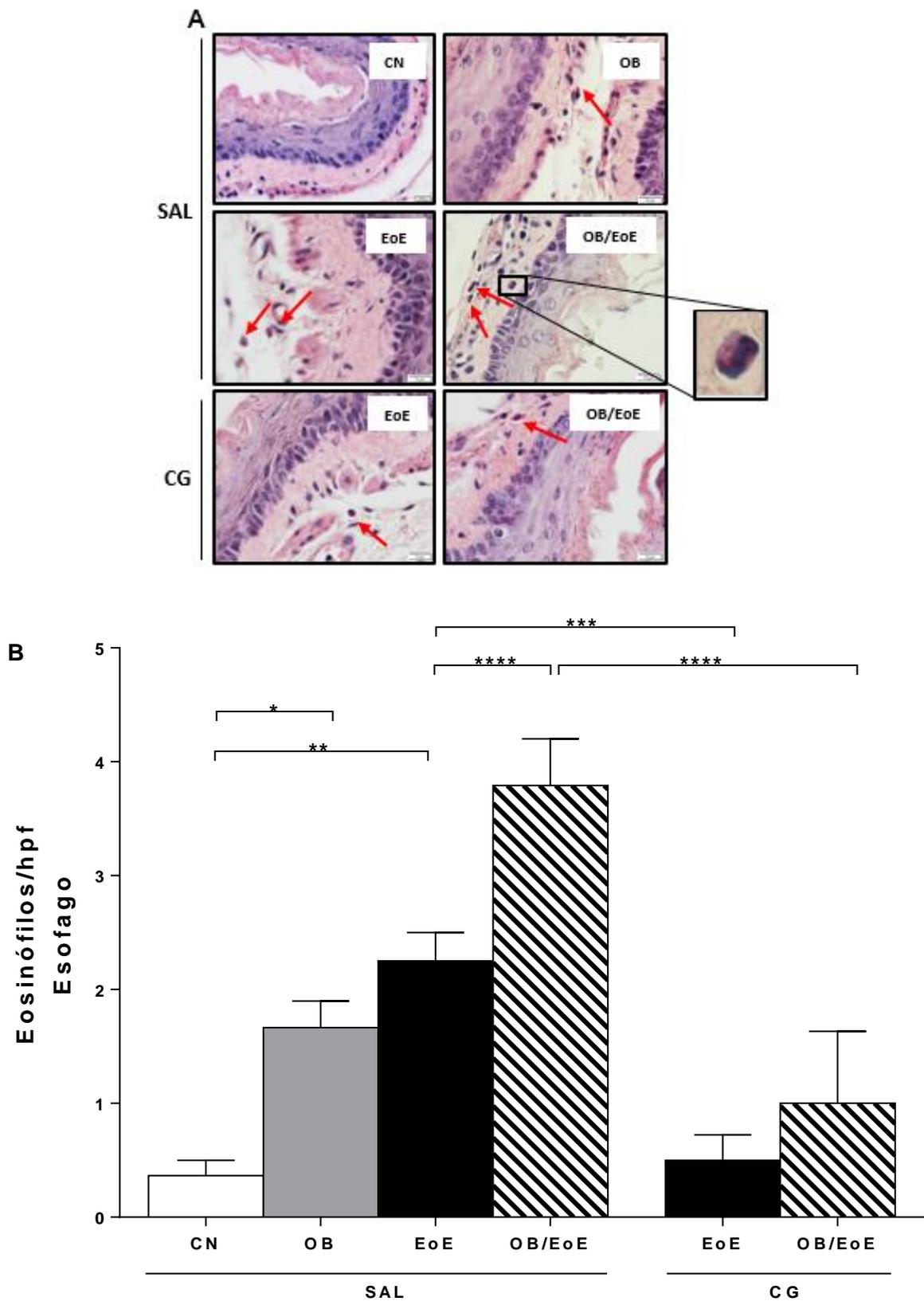


Figura 17. Contagem de eosinófilos no esôfago. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração Sírius Red, aumento 1000x (A) e gráfico da contagem de eosinófilos no esôfago (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo ($n = 6$ animais por grupo).

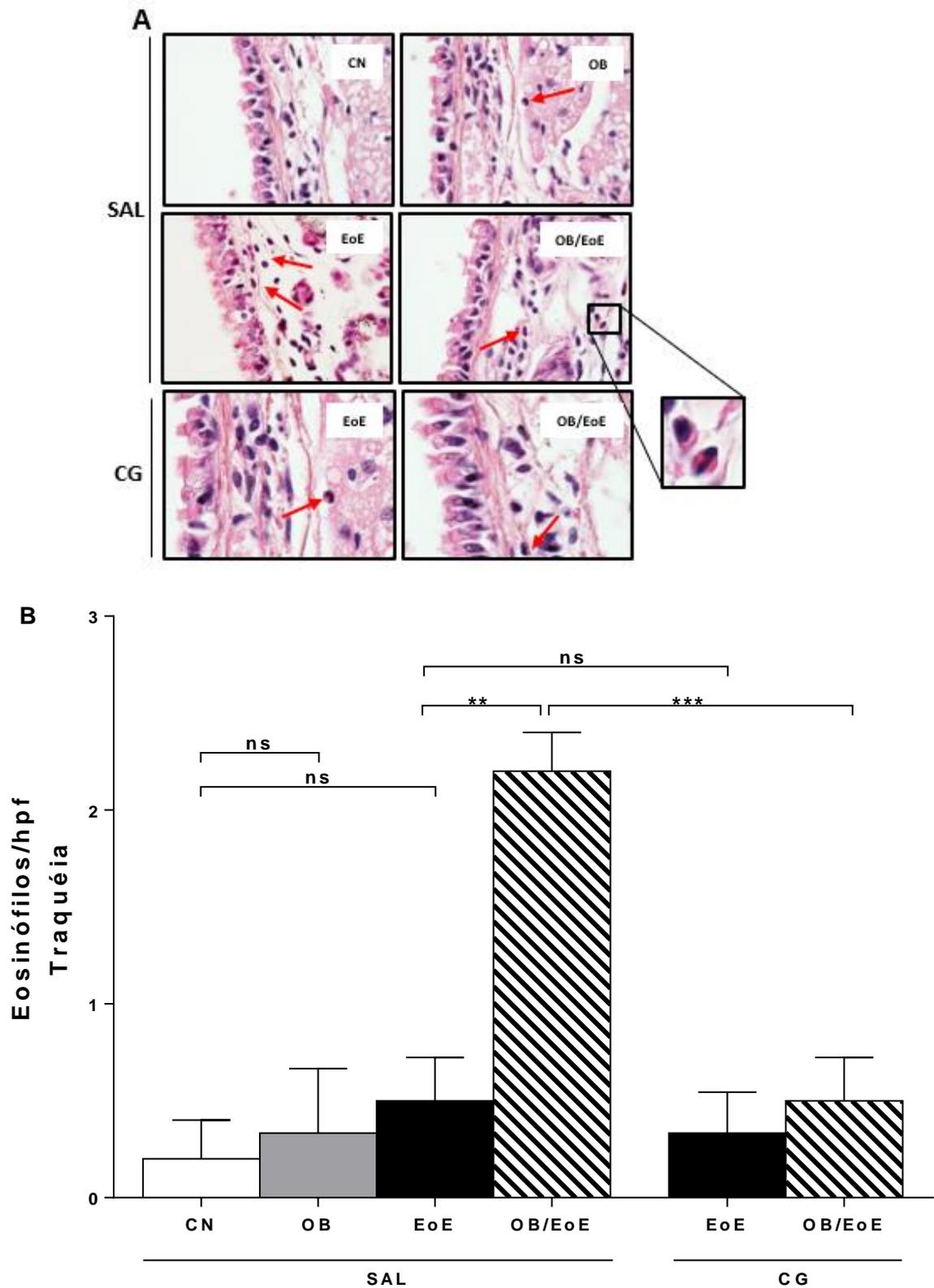


Figura 18. Contagem de eosinófilos na traquéia. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração Sírius Red, aumento 1000x (A) e gráfico da contagem de eosinófilos na traquéia (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

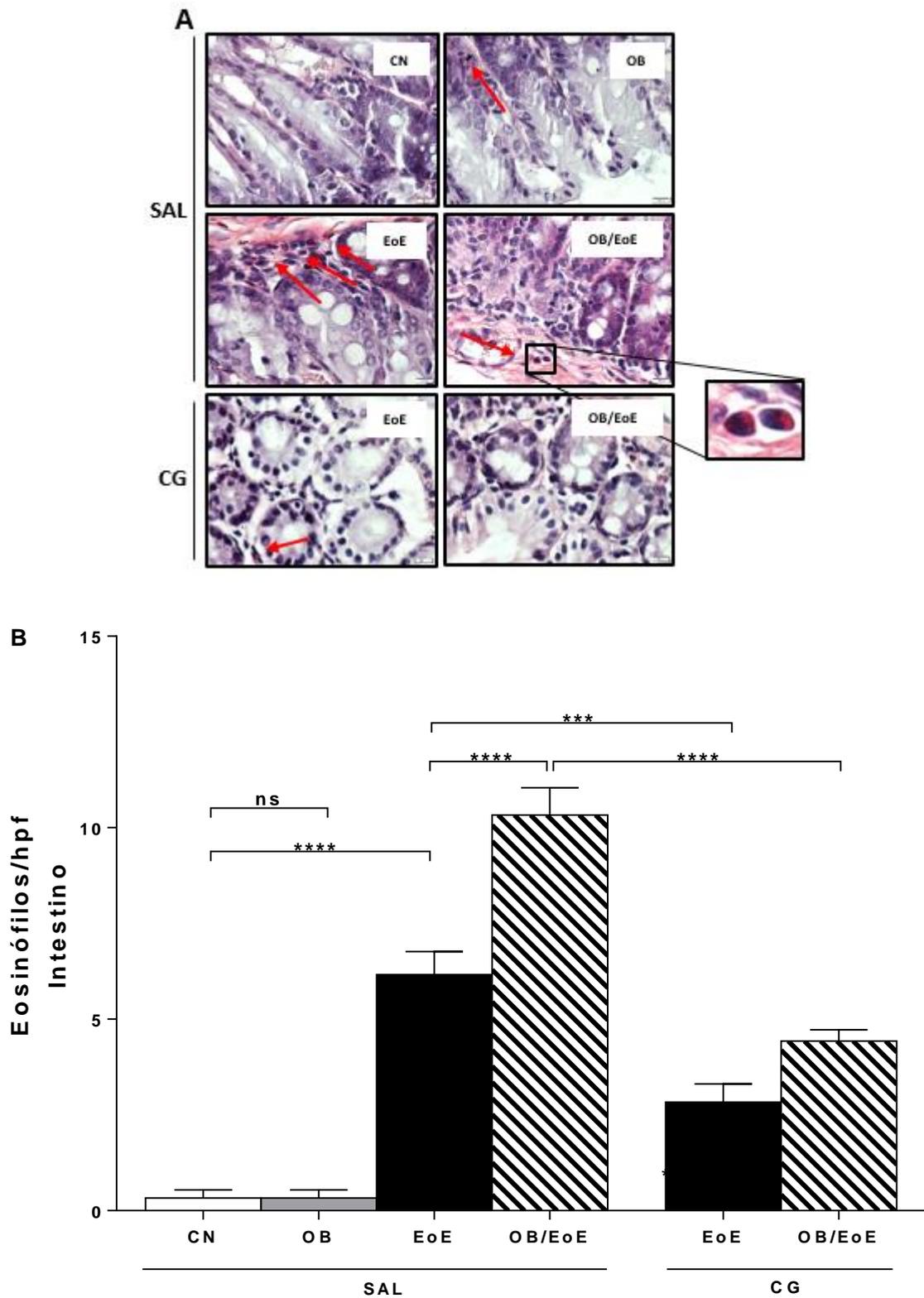


Figura 19. Contagem de eosinófilos no ceco. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração Sírius Red, aumento 1000x (A) e gráfico da contagem de eosinófilos no intestino (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo ($n = 6$ animais por grupo).

6.2.6 A obesidade induziu uma maior área de depósito de colágeno subepitelial no esôfago dos animais obesos/alérgicos

A ativação e degranulação de eosinófilos e mastócitos, pode resultar no depósito de colágeno subepitelial, levando ao remodelamento do tecido com formação de fibrose e disfunção esofágica (ACEVES; ACKERMAN, 2009). Com base nos resultados anteriores, que mostraram aumento do infiltrado de mastócitos e eosinófilos no tecido esofágico dos animais obesos/alérgicos, o presente estudo avaliou se a inflamação sistêmica mediada pela obesidade, poderia ter alguma influência na formação da fibrose existente na EoE.

A avaliação do depósito de colágeno subepitelial, no esôfago dos animais em estudo, foi determinada através da análise histológica do tecido esofágico, pela coloração com Tricrômio de Masson, com isso foi possível observar uma maior área de remodelamento (formação de fibrose) no tecido esofágico dos animais do grupo EoE (SAL) em relação ao grupo CN (SAL), e também no grupo OB/EoE (SAL) em relação ao grupo EoE (SAL). Foi ainda possível observar uma redução significativa desta área de depósito de colágeno subepitelial no esôfago dos animais dos grupos EoE e OB/EoE (CG), quando comparados aos animais do grupo (SAL) (Figura 20B).

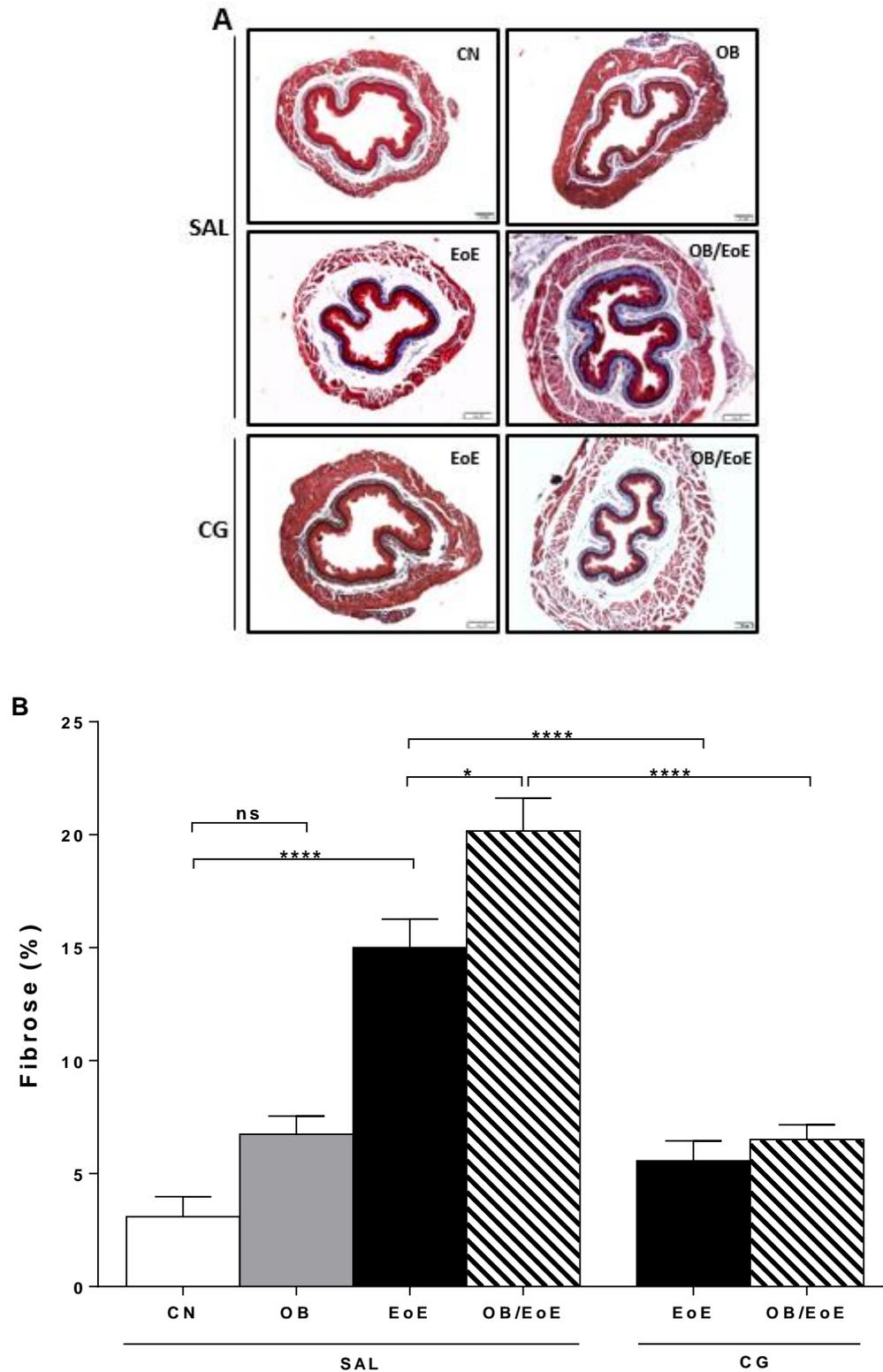


Figura 20. Avaliação da área de remodelamento no tecido esofágico. Imagem representativa da área de remodelamento no esôfago, coloração de Tricrômio de Masson, aumento 100x (A) e gráfico do percentual (%) da área de remodelamento com formação de fibrose, determinada através da análise da imagem com o software Image-Pro Plus® versão 6.0 (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo ($n=6$ animais por grupo).

6.2.7 Efeito da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio sobre o perfil das citocinas epiteliais, IL-33 e TSLP, no esôfago dos animais alérgicos

Citocinas epiteliais demonstram ser importantes para a iniciação e manutenção da inflamação eosinofílica no esôfago, como TSLP e IL-33 (SHUKLA et al., 2016). Para avaliar se a obesidade poderia ter algum efeito sobre o perfil destas citocinas epiteliais, foram analisadas as expressões relativas do RNAm da IL-33 e TSLP. Foi possível observar que o grupo OB/EoE (SAL), apresentou menor expressão de RNAm da citocina IL-33 em relação ao grupo EoE (SAL), embora não significativa. É interessante relatar que o grupo OB (SAL) também apresentou menor expressão desta citocina em relação ao CN (SAL). Os animais do grupo OB/EoE (CG) tiveram menor expressão relativa de RNAm de IL-33, ainda que não estatisticamente significativa, em relação ao grupo EoE (CG) (Figura 21A).

Para a expressão relativa de RNAm da citocina TSLP, os animais do grupo OB/EoE (SAL) obtiveram maior expressão em relação ao grupo EoE (SAL), porém não significativa. A administração do CG não alterou a expressão desse mRNA, nos grupos EoE e OB/EoE em relação aos grupos EoE e OB/EoE (SAL) (Figura 21B).

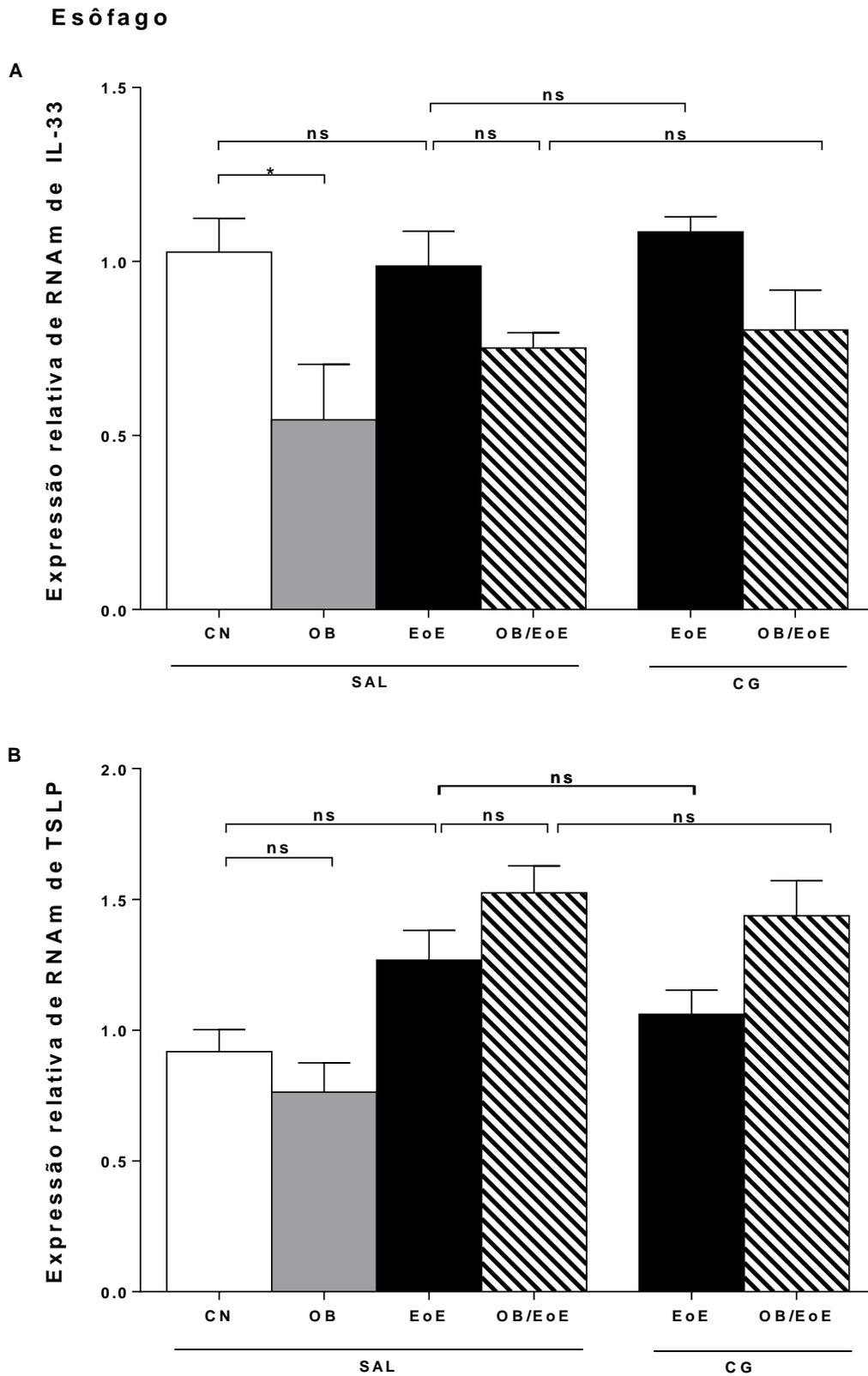


Figura 21. Efeito da obesidade na expressão de RNAm da IL33 (A) e TSLP (B), avaliada por qRT-PCR, no esôfago dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. $*p < 0.05$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.8 Efeito da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio, sobre o perfil da resposta Th2 no esôfago, dos animais alérgicos

O fator de transcrição GATA3, tem um papel central no desenvolvimento das células Th2, produtoras das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, importantes para a respostas alérgica (YAGI et al., 2011). Destas citocinas, a IL-5 induz crescimento, diferenciação, ativação e sobrevivência dos eosinófilos (MISHRA et al., 2002). Para entender a influência da obesidade na esofagite eosinofílica, analisamos a expressão do fator de transcrição GATA3 e da citocina IL-5. Para a expressão do fator de transcrição GATA3, observou-se que no grupo SAL, os animais do grupo OB e EoE apresentaram maior expressão do RNAm desse fator em relação ao grupo CN; e o grupo OB/EoE, menor expressão em relação ao grupo EoE. Ainda observamos que os grupos EoE e OB/EoE (CG), apresentaram uma redução da expressão do RNAm de GATA3 em relação ao grupo SAL (Figura 22A).

Ainda, foi possível observar, que no grupo SAL, para a citocina IL-5, não houve diferença estatística entre os grupos, porém ao analisarmos o grupo CG, os animais dos grupos OB/EoE apresentaram uma redução da expressão mRNA da IL-5, em relação ao grupo OB/EoE (SAL) (Figura 22B).

Esôfago

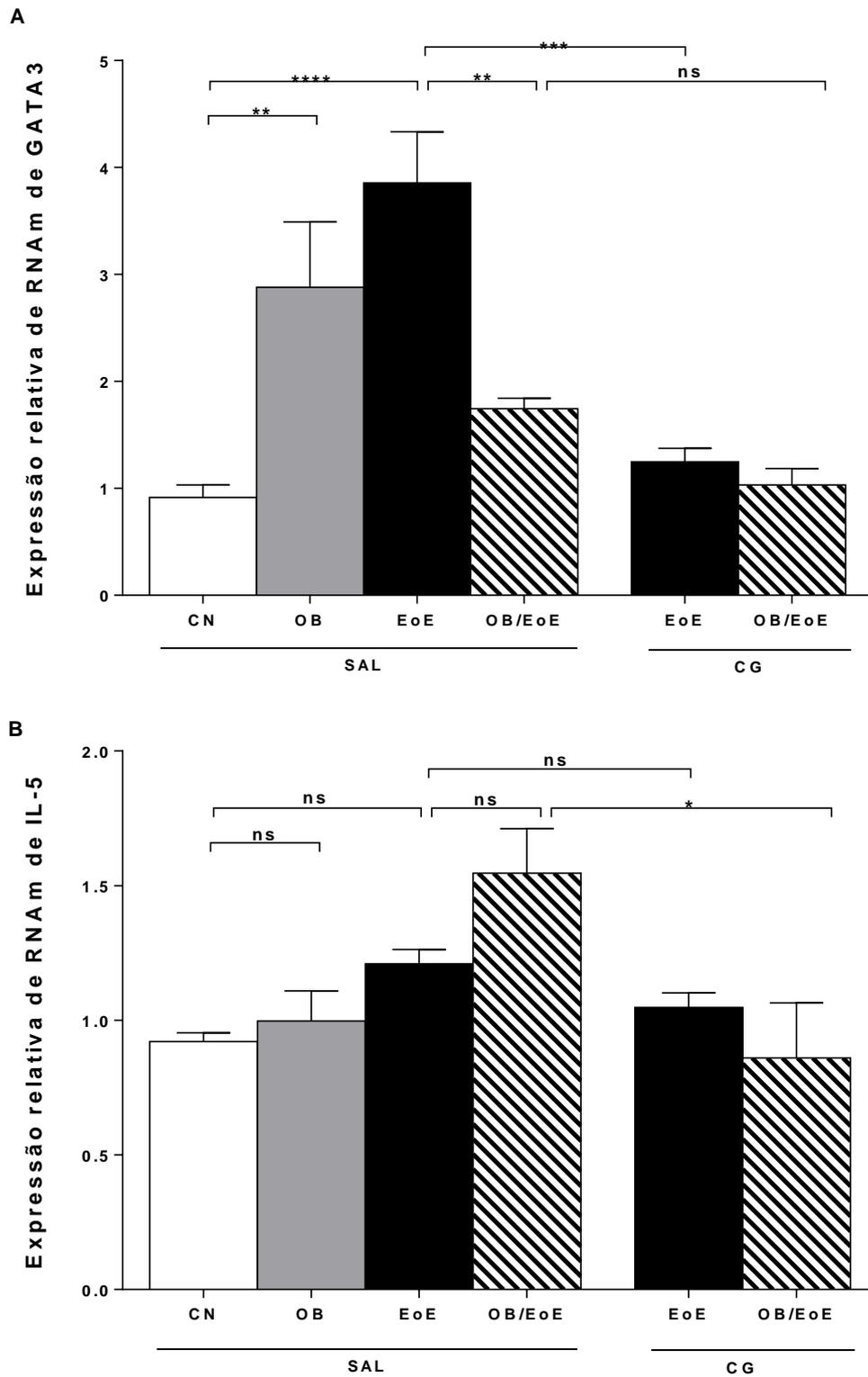


Figura 22. Efeito da obesidade na expressão de RNAm do GATA3 (A) e IL-5 (B), avaliada por qRT-PCR, no esôfago dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média +/- EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).**

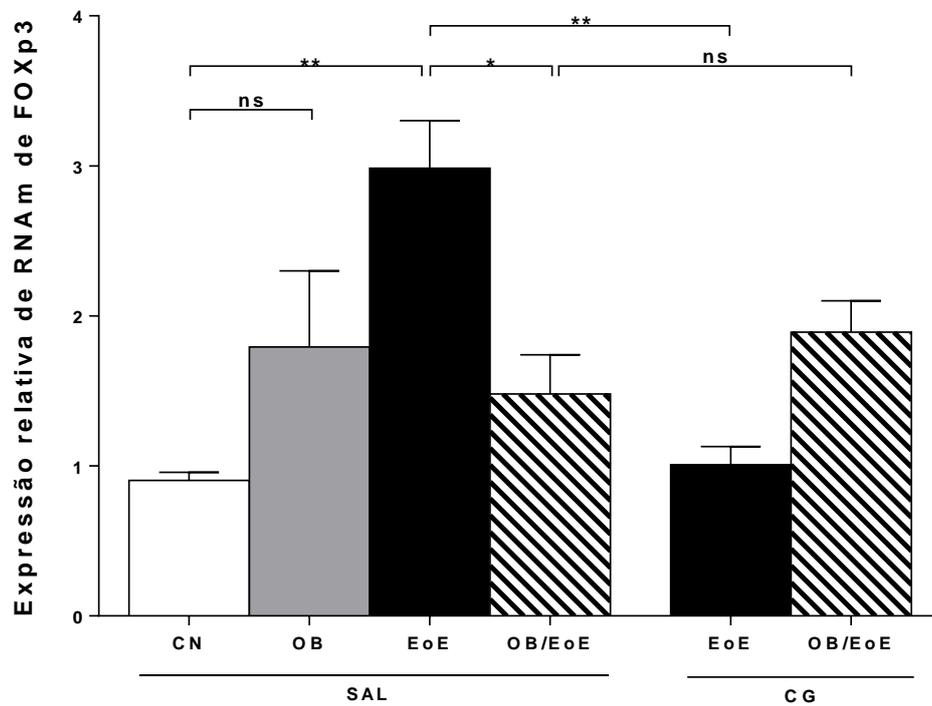
6.2.9 Obesidade induz perfil regulatório, após tratamento com cromoglicato de sódio, no esôfago dos animais alérgicos

Os linfócitos Tregs são uma subpopulação dos linfócitos T com desenvolvimento e função distintas, expressam o fator de transcrição Foxp3 e são produtoras da citocina anti-inflamatória IL-10, são também indispensáveis para a manutenção da tolerância imunitária e da homeostasia (KARAGIANNIDIS et al., 2004; PEEK et al., 2005). Desta forma, com a análise da expressão relativa de RNAm do fator de transcrição Foxp3, no grupo SAL, os animais EoE tiveram uma maior expressão RNAm de Foxp3 em relação aos animais CN. Já os animais OB/EoE tiveram uma menor expressão, em relação aos animais EoE. No grupo CG, os animais do grupo EoE apresentaram uma redução, significativa, da expressão do RNAm do fator de transcrição Foxp3, quando comparados com os animais do grupo EoE (SAL) (Figura 23A).

Para a expressão de RNAm da citocina IL-10, foi possível observar que no grupo SAL, os animais EoE apresentaram maior expressão em relação ao grupo CN e o grupo OB/EoE teve uma menor expressão significativa, do RNAm desta citocina em relação ao grupo EoE. No grupo CG, os animais OB/EoE apresentaram maior expressão do RNAm da IL-10 em relação ao respectivo grupo SAL. Outro dado interessante, foi que os animais EoE (CG) tiveram uma redução, também relevante, da expressão do RNAm da IL-10 em relação ao grupo EoE (SAL) (Figura 23B).

Esôfago

A



B

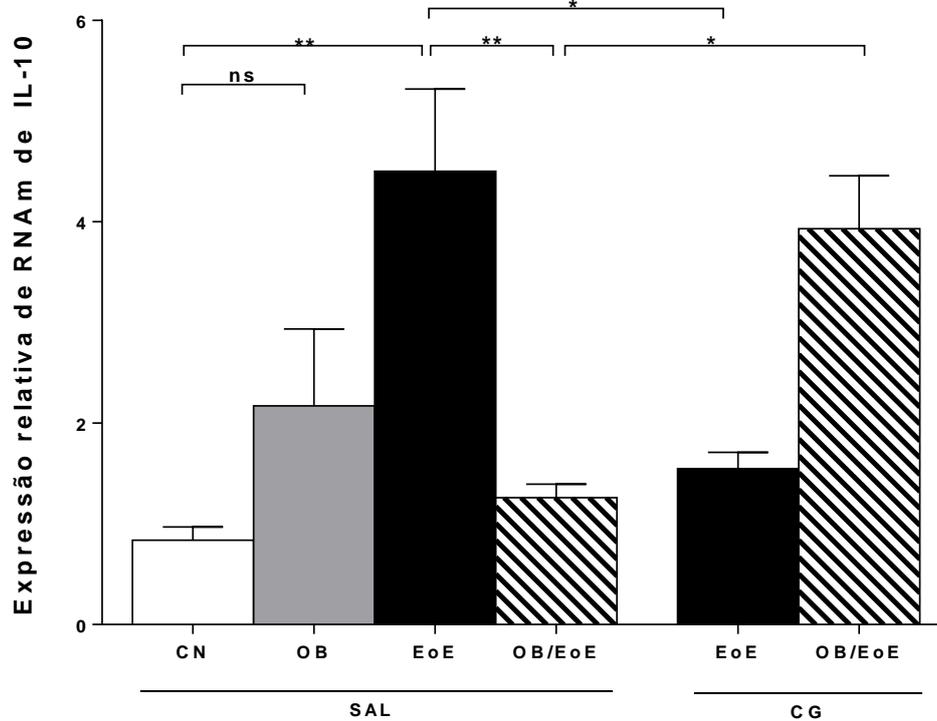


Figura 23. Efeito da obesidade na expressão de RNAm do FOXP3 (A) e IL10 (B), avaliada por qRT-PCR, no esôfago, dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.10 Efeito da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio, sobre o perfil de ativação de células dendríticas nos linfonodos mediastinais e baço

Sabe-se que as DCs são essenciais tanto na indução quanto na manutenção da tolerância oral, desempenhando um papel fundamental na apresentação de antígenos aos linfócitos T, direcionando, assim, as respostas imunes subseqüentes (WANG; TOES, 2008). A determinação do fenótipo e/ou função das DCs pode contribuir para o entendimento da patogênese da EoE. A molécula co-estimulatória CD80, presente na superfície de DCs é importante para definir o estado de ativação dessas células (LENSCHOW et al., 1993), em contrapartida, a molécula PDL-1 (do termo em inglês - programmed death ligand - 1), também presente na superfície das DCs, podem influenciar a resposta imunológica exercendo funções de regulação da resposta alérgica (BUTTE et al., 2008). Desta forma, a expressão desses marcadores foi avaliada no presente estudo.

Os resultados demonstraram que no grupo SAL, nos linfonodos mediastinais, não houve diferença significativa entre os grupos, no número absoluto de DCs CD11c⁺MHCII^{hi} expressando CD80. Nos animais do grupo CG, foi possível observar um aumento, significativo, do número absoluto DCs ativadas no grupo OB/EoE, quando comparados aos animais do grupo SAL (Figura 24B e 24C). No baço dos animais do grupo OB/EoE (SAL) houve aumento no número absoluto de DCs CD11c⁺MHCII^{hi} expressando o marcador CD80 quando comparados ao grupo EoE (SAL). Nos animais do grupo (CG), foi observado, uma redução, significativa, no número de DCs ativadas nos animais OB/EoE, quando comparados aos animais EoE (CG) (Figura 24D e 24E).

Com a análise do perfil das DCs CD11c⁺MHCII^{hi} expressando PDL-1, nos linfonodos mediastinais, foi possível detectar, que houve uma redução significativa no número de células com este fenótipo, nos animais OB/EoE (SAL), quando comparados aos animais do grupo EoE (SAL). No grupo CG, foi possível observar uma redução, também relevante, destas células, nos animais EoE (CG) quando comparados aos animais do grupo SAL (Figura 25B e 25C). A análise do perfil das DCs CD11c⁺MHCII^{hi} expressando PDL-1, no baço, demonstrou um aumento significativa no número absoluto destas células, nos animais EoE (SAL) em relação ao grupo CN (SAL) e uma redução significativa nos animais OB/EoE (SAL) quando comparados aos EoE (SAL). Nos animais CG, o grupo OB/EoE apresentou um aumento no número absoluto de células com este perfil, quando comparados aos animais do grupo SAL, embora não significativo (Figura 25D e 25E).

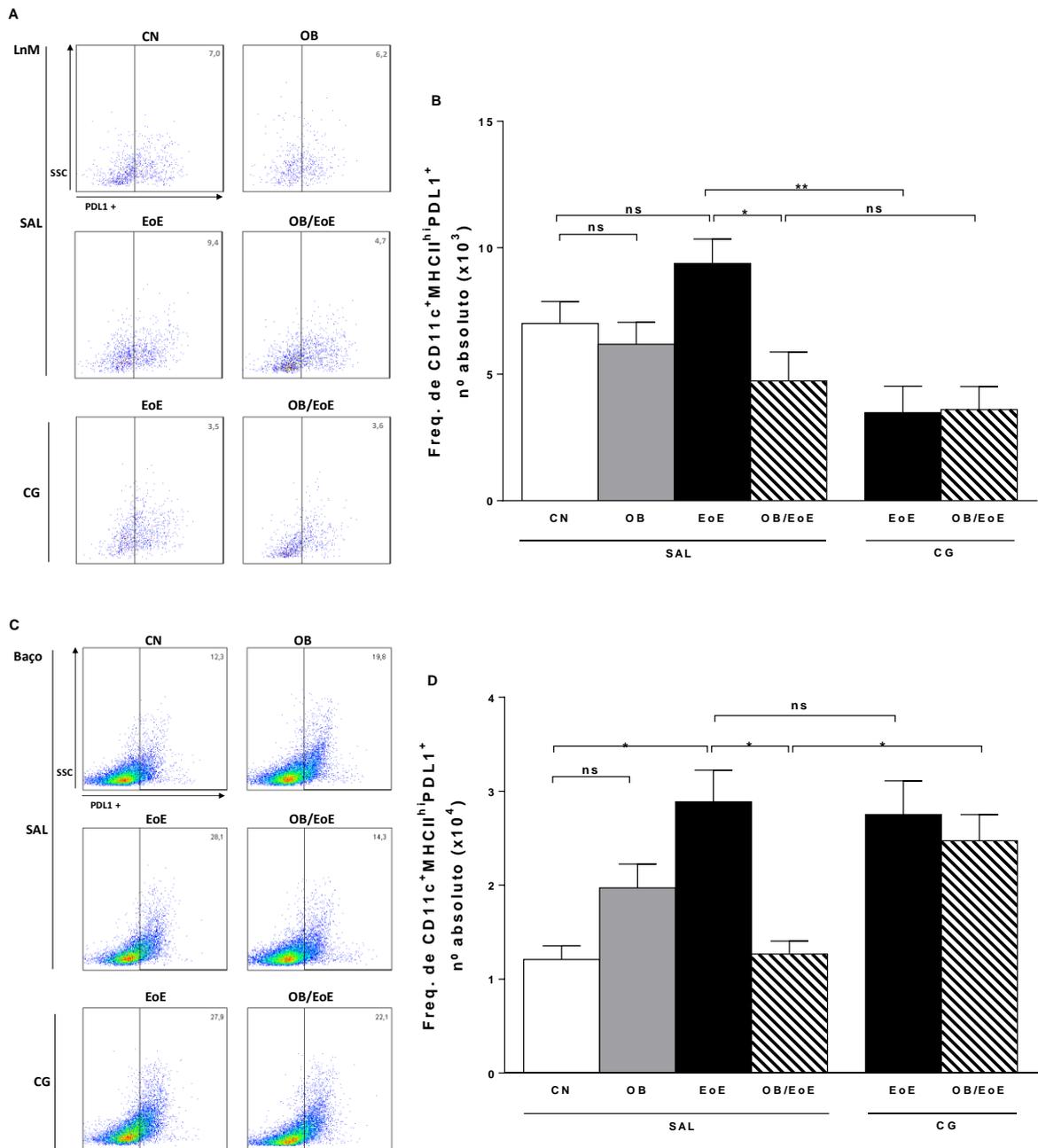


Figura 25. N° absoluto de células $CD11c^+MHCII^{hi}PDL1^+$, determinadas por citometria de fluxo. Gráficos representativos do n° absoluto de células $CD11c^+MHCII^{hi}PDL1^+$, isoladas dos linfonodos mediastinais (A, B) e baço (C, D), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.11 Influência da obesidade no perfil de ativação das células dendríticas, derivadas da medula óssea

A partir dos dados anteriores, que demonstraram alteração na ativação das DCs nos animais obesos alérgicos, o passo seguinte foi avaliar o efeito direto da ovalbumina, na resposta imune iniciada pelas DCs desde a medula óssea. Para isso, foi realizada uma cultura de DCs $CD11c^+MHCII^{hi}$ derivadas da medula óssea dos grupos estudados, e foram avaliadas quanto a expressão da molécula co-estimulatória CD80. Foi possível observar que as DCs do grupo EoE e OB/EoE (SAL), estimuladas com OVA, apresentaram aumento na expressão de CD80, quando comparado aos grupos EoE e OB/EoE (SAL), sem estímulo. Após o tratamento com CG, houve redução nesta expressão no grupo OB/EoE, estimulados com OVA, comparado ao mesmo grupo SAL (Figura 26).

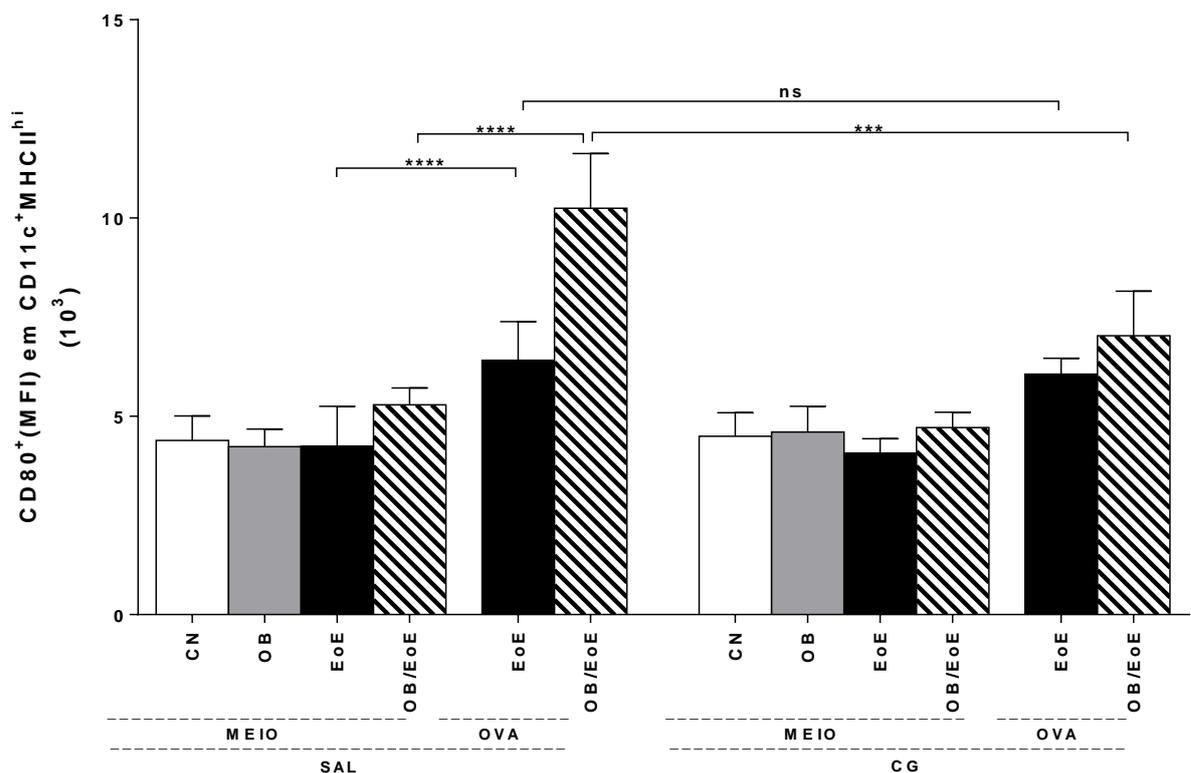


Figura 26. Expressão de $CD80^+$, pela mediana de intensidade (MFI), em células dendríticas $CD11c^+MHCII^{hi}$ derivadas da medula óssea, estimuladas com alérgeno (OVA) e não estimuladas (MEIO), nos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.12 Avaliação do efeito da obesidade e do cromoglicato de sódio, sobre o número absoluto de eosinófilos na medula óssea

Camundongos obesos submetidos ao modelo de indução de alergia pulmonar apresentam alteração na produção de células na medula óssea, favorecendo o aumento de granulócitos, como eosinófilos e neutrófilos (SILVA et al., 2017). Sendo a EoE, uma doença atópica, caracterizada por um infiltrado eosinofílico (FURUTA et al., 2007), foi avaliado se a obesidade também poderia alterar o número destas células, na medula óssea dos animais obesos/alérgicos.

A contagem de granulócitos na medula óssea, dos animais estudados, revelou um aumento do número absoluto eosinófilos, nos animais do grupo EoE (SAL) em relação aos animais do grupo CN (SAL). Embora esse aumento também tenha sido observado no grupo OB/EoE (SAL) não houve diferença significativa em relação ao grupo EoE (SAL). Vale ressaltar que o grupo OB (SAL) apresentou aumento no número dessas células quando comparadas ao CN (SAL), ainda que não significativo estatisticamente. Interessantemente, houve uma redução significativa no número absoluto de eosinófilos nos animais EoE e OB/EoE (CG) comparados aos animais do grupo SAL (Figura 27).

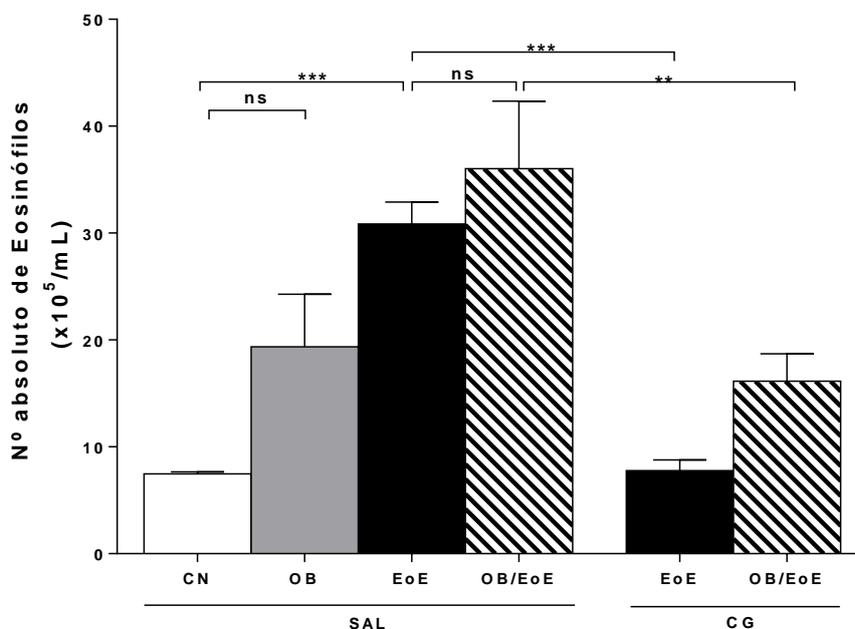


Figura 27. Número absoluto de eosinófilos na medula óssea, dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.13 Influência da obesidade e do tratamento com cromoglicato de sódio, na frequência de linfócitos Th2 produtores de IL-4, nos linfonodos mediastinais e baço

Em resposta aos alérgenos alimentares ou aeroalérgenos, a imunidade adaptativa mediada por linfócitos Th2, estimula a secreção local de interleucinas, como IL-4, IL-5 e IL-13. A infiltração eosinofílica, presente na EoE, está diretamente relacionada à presença destas interleucinas (SPERGEL, 2015). Com isso, foi avaliado no presente estudo, o número de células expressando concomitantemente o fator de transcrição GATA3⁺ e a expressão intracelular da citocina IL-4⁺, nos linfonodos mediastinais e baço. Com isso, foi possível observar uma expressão similar em ambos os órgãos linfóides periféricos, na qual o grupo EoE (SAL) apresentou aumento significativo no número absoluto de células CD3⁺CD4⁺GATA3⁺IL-4⁺ em relação ao grupo CN (SAL), sendo que no grupo OB/EoE (SAL) esse aumento foi ainda maior até mesmo quando comparado ao grupo EoE (SAL). No grupo CG, os animais OB/EoE tiveram uma redução relevante do número absoluto de CD3⁺CD4⁺GATA3⁺IL-4⁺, em relação ao grupo (SAL) (Figuras 28B, 28C, 28D e 28E).

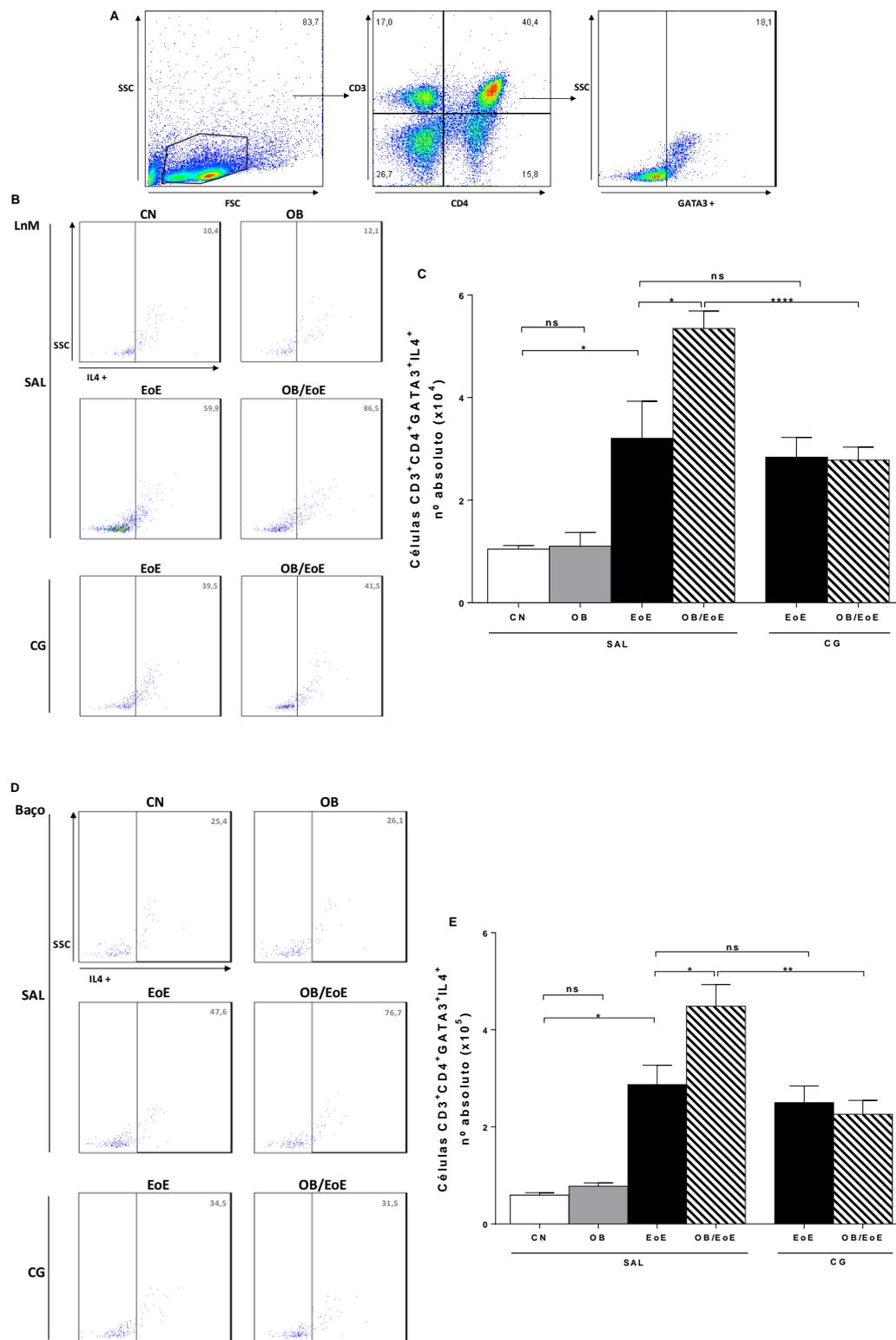


Figura 28. N° absoluto de células CD3⁺CD4⁺GATA3⁺IL4⁺, determinadas por citometria de fluxo. Dot-plot representativo da seleção de populações (A). Gráficos representativos do n° absoluto de células CD3⁺CD4⁺GATA3⁺IL4⁺, isoladas dos linfonodos mediastinais (B, C) e baço (D, E), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média +/- EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.14 Avaliação do efeito da obesidade e do cromoglicato de sódio, sobre a frequência de linfócitos B, nos linfonodos mediastinais e baço

Os linfócitos B caracterizados pelos marcadores de superfície CD19⁺CD40⁺ são células ativadas que proliferam e se diferenciam em células produtoras de anticorpos, como a IgE específica para o alérgeno alimentar ou aeroalérgenos envolvidos na EoE (LOCHEM et al., 2004; VOOGHT et al., 2013). Com o objetivo de avaliar a influência da obesidade na frequência desses linfócitos, quantificamos o número absoluto dos LB CD19⁺CD40⁺ nos órgãos linfoides periféricos, linfonodos mediastinais e baço. Observamos um aumento destas células nos animais EoE (SAL) em comparação aos animais CN (SAL) e também um aumento, nos animais OB/EoE (SAL) em comparação aos animais EoE (SAL), nos linfonodos mediastinais. Contudo no grupo CG, houve uma redução significativa, no número absoluto desses linfócitos, nos animais EoE e OB/EoE quando comparados aos animais do grupo SAL (Figura 29A). No baço, esse aumento foi visualizado nos animais OB/EoE (SAL) em comparação aos animais EoE (SAL). Supreendentemente, nesse órgão, houve uma redução significativa no número absoluto desses LB CD19⁺CD40⁺ no grupo OB/EoE (SAL) em relação aos animais EoE (SAL). Nos animais EoE e OB/EoE (CG) também foi possível observar esta redução em relação aos animais do grupo SAL, embora no grupo OB/EoE essa redução não foi significativa (Figura 29B).

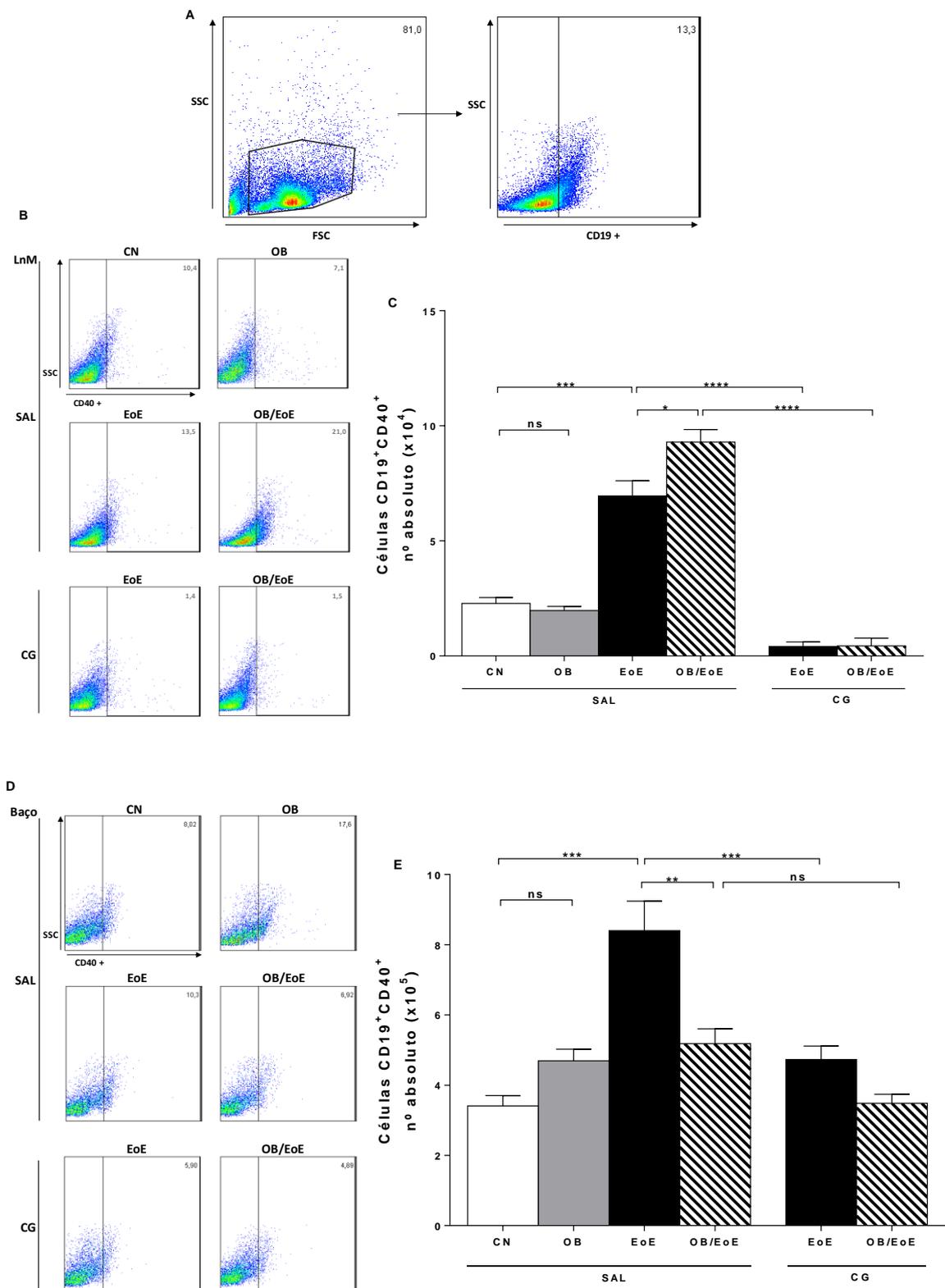


Figura 29. N° absoluto de células CD19⁺CD40⁺, determinadas por citometria de fluxo. Dot-plot representativo da seleção de populações (A). Gráficos representativos do n° absoluto de células CD19⁺CD40⁺, isoladas dos linfonodos mediastinais (B, C) e baço (D, E), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média +/- EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo (n=6 animais por grupo).

6.2.15 Efeito da obesidade e do cromoglicato de sódio, sobre a frequência de linfócitos T regulatórios, nos linfonodos mediastinais e baço

As células T reguladoras, caracterizadas pela expressão de Foxp3, são vitais para a manutenção da tolerância, atuam direta ou indiretamente suprimindo as células efetoras da inflamação alérgica, contribuindo para o controle da doença (AKDIS et al., 2005). Com base nestes dados, foi realizada a análise da frequência e intensidade de fluorescência (MFI) de linfócitos T regulatórios $CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$, nos linfonodos mediastinais dos animais estudados, e foi possível observar uma redução no número absoluto destas células, nos animais OB/EoE (SAL) quando comparados aos animais EoE (SAL), ainda que não significativo estatisticamente. O tratamento com o CG aumentou o número absoluto de linfócitos Tregs nos grupos EoE e OB/EoE, em relação aos animais do grupo SAL (Figuras 30A, 30B e 30C).

No baço, observamos também uma redução no número absoluto $CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nos animais OB/EoE (SAL) quando comparados ao grupo EoE (SAL), embora não significativo. No grupo CG, observamos, um maior número absoluto de linfócitos Tregs nos animais EoE e OB/EoE, em relação aos animais do grupo SAL (Figuras 30D e 30E). Ainda foi possível observar que a intensidade de fluorescência (MFI), para essas células, foi menor em ambos os órgãos linfoides no grupo OB/EoE (SAL) em comparação ao grupo EoE (SAL) (Figuras 31A, 31B, 31C e 31D).

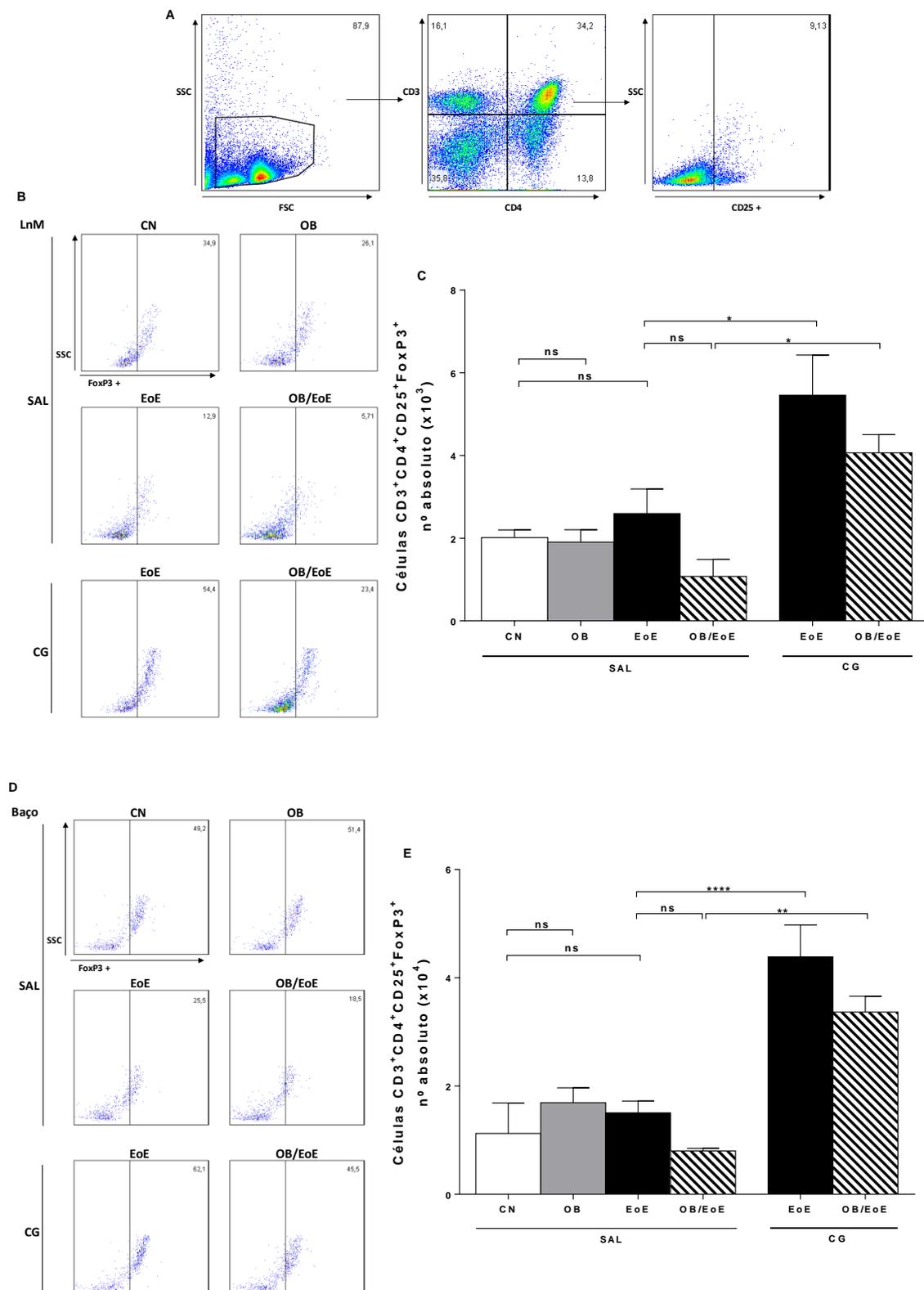


Figura 30. N° absoluto de células $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$, determinadas por citometria de fluxo. Dot-plot representativo da seleção de populações (A). Gráficos representativos do n° absoluto de células $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$, isoladas dos linfonodos mediastinais (B, C) e baço (D, E), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo ($n = 6$ animais por grupo).

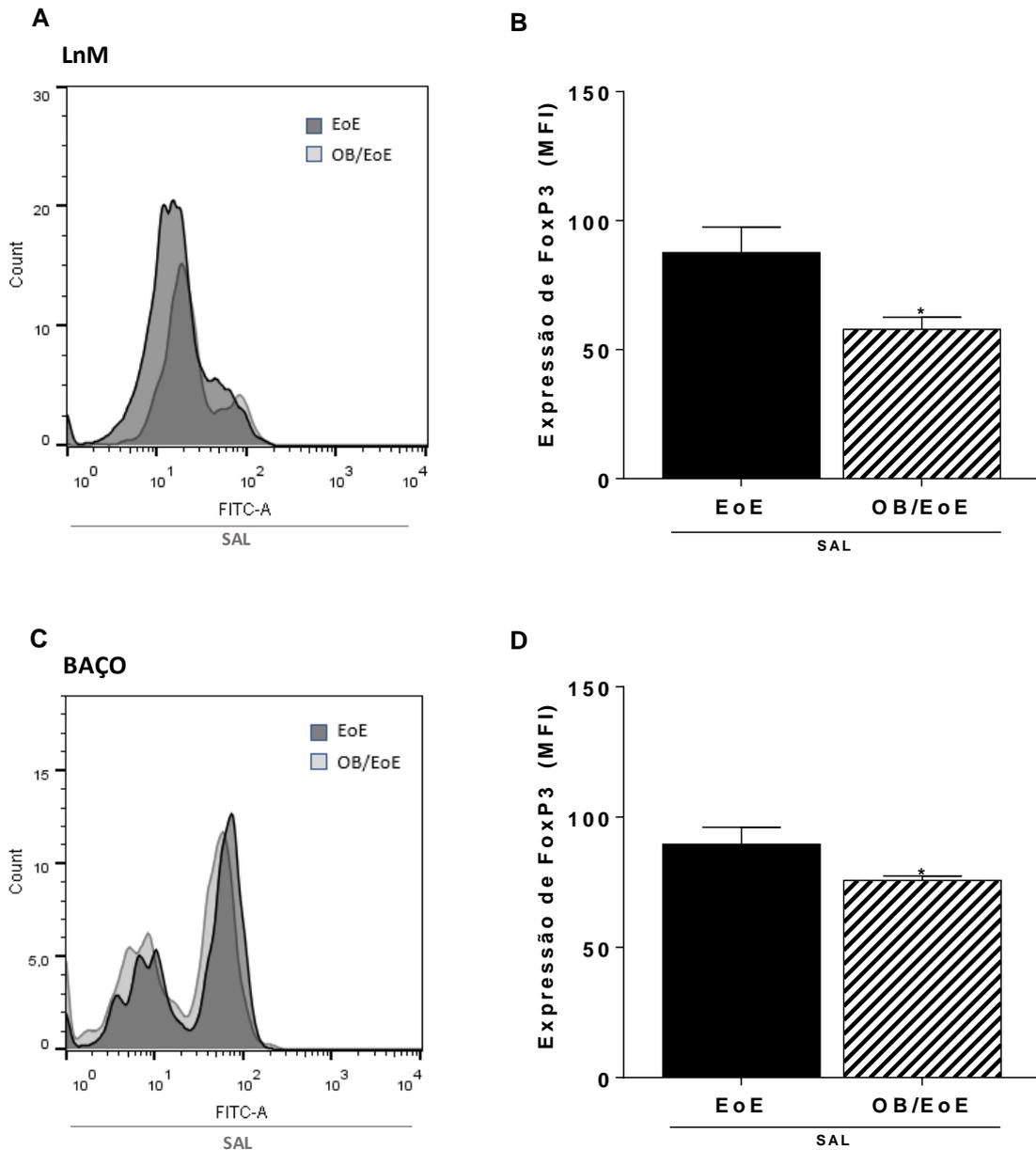


Figura 31. Avaliação da ativação dos linfócitos Tregs por intensidade de fluorescência. Histograma e gráfico representativo da intensidade de fluorescência de FoxP3 (MFI) nos linfonodos mediastinais (A, B) e baço (C, D) dos animais dos grupos EoE e OB/EoE (SAL), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. $*p < 0.05$ ($n=6$ animais por grupo).

6.3 AVALIAÇÃO DO TECIDO PULMONAR

Alguns estudos estabeleceram uma conexão fisiopatológica entre as respostas de hipersensibilidade alérgica no pulmão e esôfago, demonstrando um papel etiológico para alérgenos inalados e eosinófilos na inflamação eosinofílica (MISHRA et al., 2001; ROTHENBERG, 2004). Assim, foram realizadas análises no pulmão dos animais estudados, visando avaliar o grau de inflamação pulmonar em decorrência dos desafios com a OVA e qual seria a influência nos modelos concomitantes de obesidade e esofagite eosinofílica experimental.

6.3.1 Influência da obesidade e do cromoglicato de sódio, na contagem de eosinófilos, no tecido pulmonar dos animais alérgicos

Tendo em vista a relação fisiopatológica entre o pulmão e esôfago, relatado acima, foi realizada análise do infiltrado eosinofílico, no pulmão dos animais estudados, utilizando-se a coloração com Sírius Red. Os resultados demonstraram que houve aumento, significativo, no número de eosinófilos nos animais do grupo EoE (SAL) em relação aos animais CN (SAL). Foi observado também que houve aumento, mas não significativo, no número de eosinófilos nos animais do grupo OB/EoE (SAL) em relação aos animais EoE (SAL). Importante ressaltar, que houve uma redução relevante, em todos os grupos CG em relação ao grupo SAL (Figura 32B).

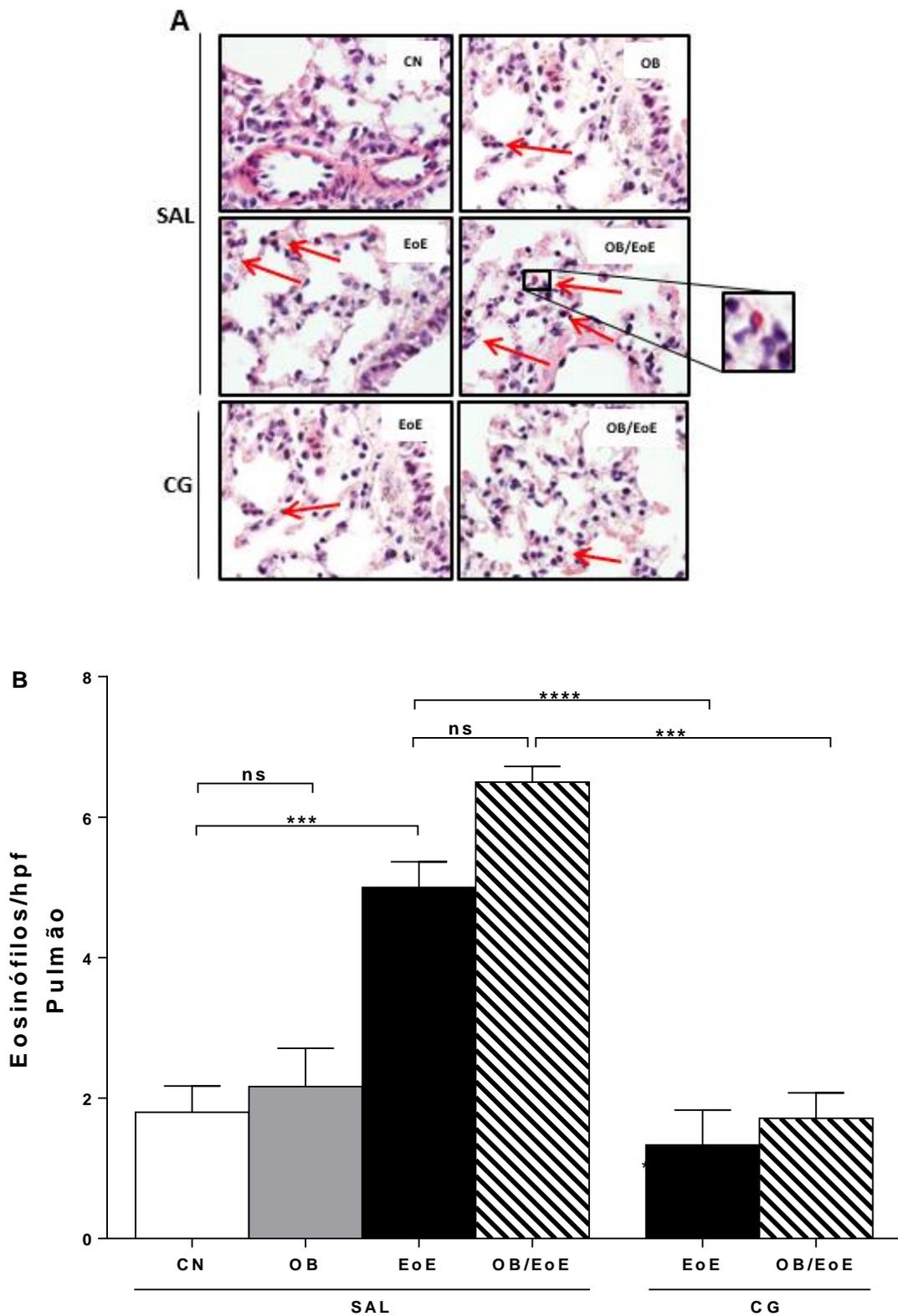


Figura 32. Contagem de eosinófilos no tecido pulmonar. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração Sírius Red, aumento 1000x (A) e gráfico da contagem de eosinófilos no pulmão (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média +/- EPM. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, não significativo (n=4 animais por grupo).

6.3.2 Efeito da obesidade, induzida por dieta hiperlipídica, e do tratamento com cromoglicato de sódio, na contagem de mastócitos, no tecido pulmonar, dos animais alérgicos

Ainda com base nesta conexão, anteriormente relatada, foi realizada a análise histológica de mastócitos no pulmão dos animais estudados, utilizando-se a coloração com Azul de Toluidina. O grupo EoE, apresentou aumento significativo de mastócitos em relação ao grupo controle, no pulmão. Não houve diferença na contagem do número de mastócitos, entre os animais do grupo EoE e OB/EoE (SAL). Porém, avaliando o grupo CG, houve redução na contagem de mastócitos, em todos os grupos estudados, quando comparados com os animais SAL (Figura 33 B).

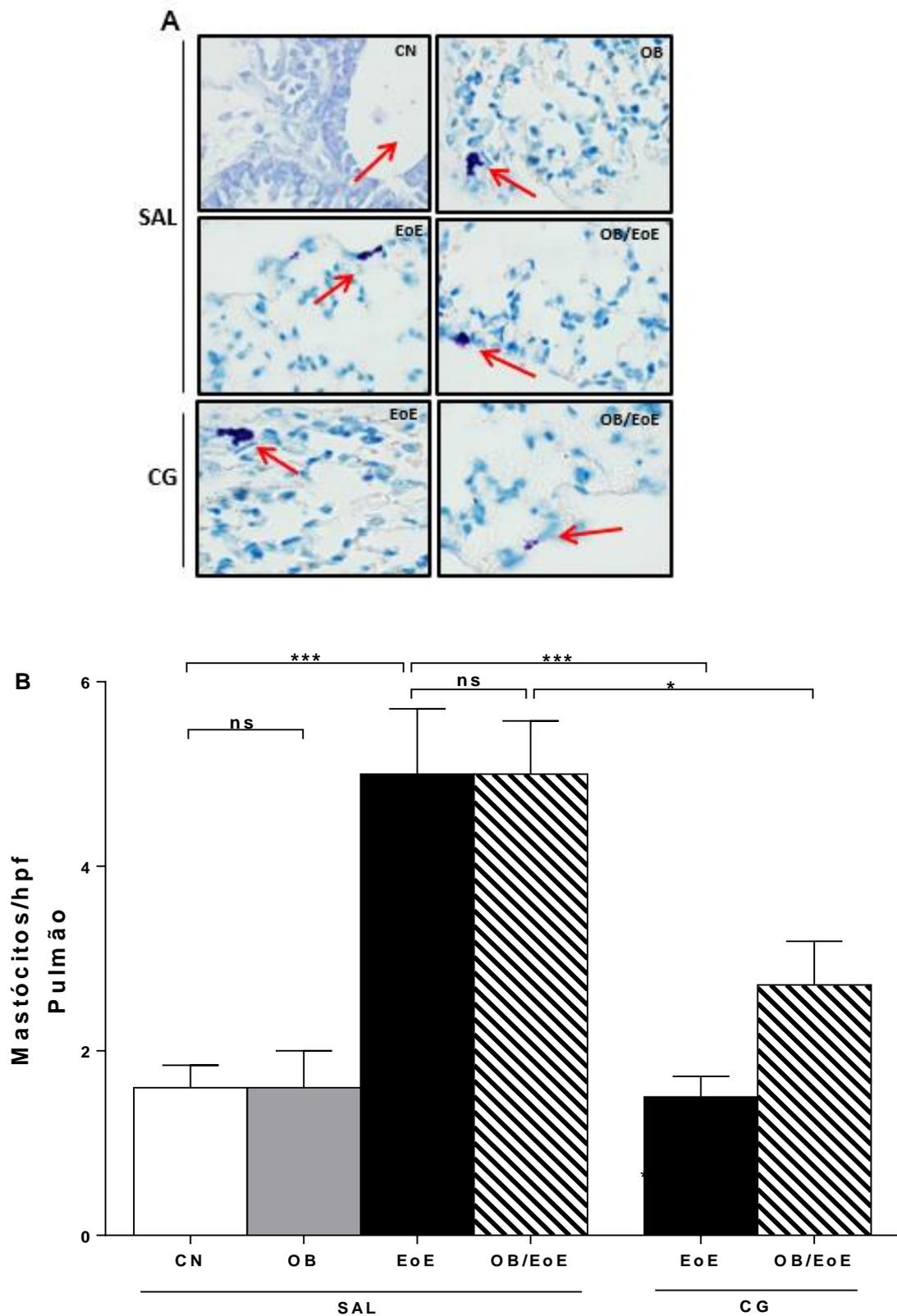


Figura 33. Contagem de mastócitos no tecido pulmonar. Imagem representativa, setas em vermelho, coloração Azul de Toluidina, aumento 1000x (A) e gráfico da contagem de mastócitos no pulmão (B), dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE (SAL) e (CG), após 10 semanas de dieta, tratamento com CG. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ns, não significativo ($n = 4$ animais por grupo).

6.3.3 Avaliação dos níveis das citocinas de perfil Th2 no tecido pulmonar

Para avaliar se a EoE influencia nos níveis de citocinas envolvidas no desenvolvimento e manutenção da resposta alérgica no pulmão, foram avaliados os níveis das citocinas de perfil Th2, IL-4, IL-5 e IL-13. Os seus níveis foram avaliados 24 horas após o último desafio com a OVA. Os níveis das citocinas de perfil Th2, analisados no homogenato do tecido pulmonar no grupo EoE apresentou apenas uma tendência para o aumento em relação ao grupo CN. No entanto, no grupo OB/EoE, a dosagem das citocinas IL-4 e IL-13, foram significativamente maiores, em relação ao grupo EoE (Figuras 34).

Tecido Pulmonar

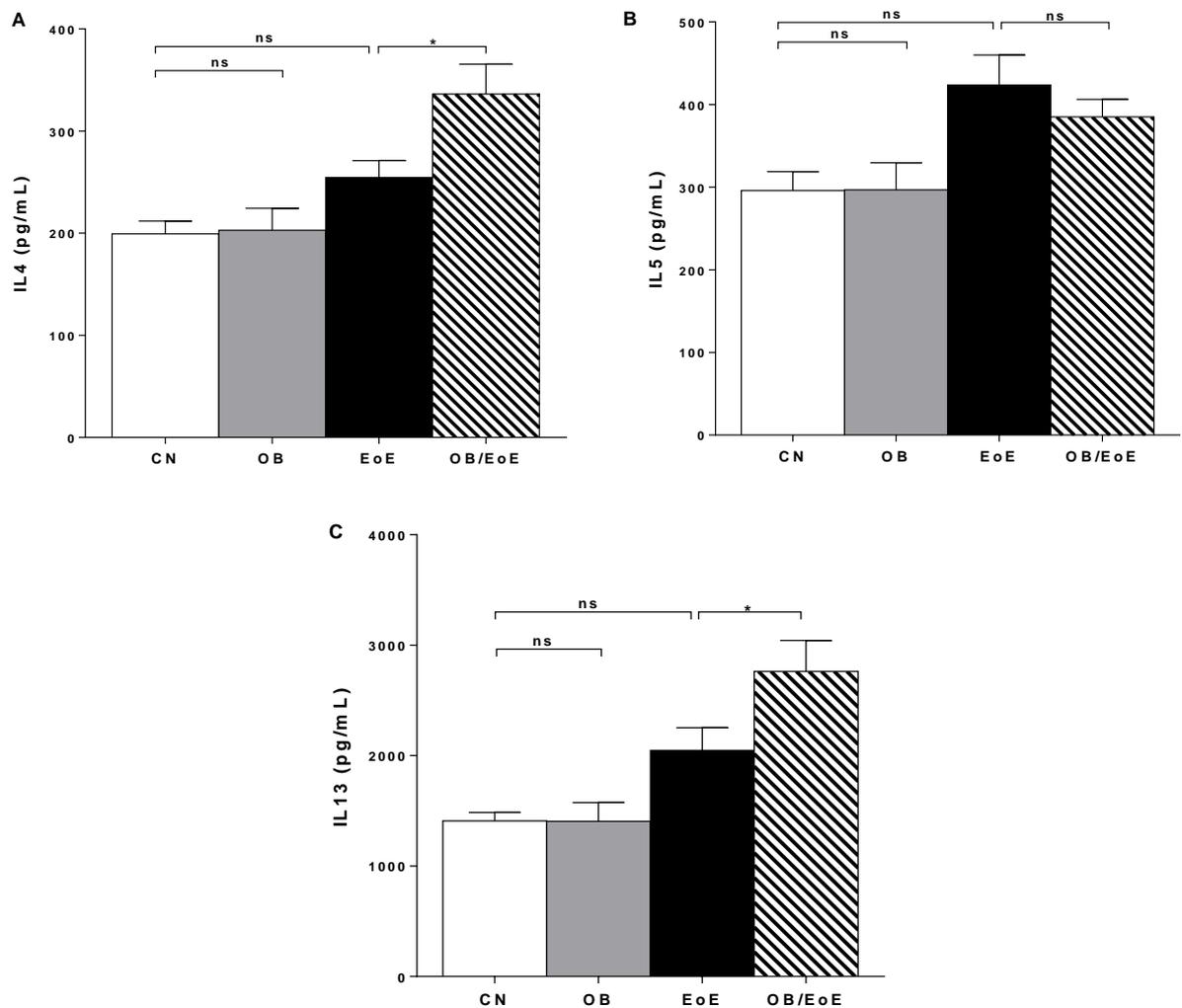


Figura 34. Citocinas de perfil Th2 no pulmão. Níveis de citocinas IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (C) no homogenato do tecido pulmonar, dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE após 10 semanas de dieta. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média \pm EPM. * $p < 0.05$; ns, não significativo (n=4 animais por grupo).

6.3.4 Avaliação da atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido pulmonar

Com relação a EPO, sabe-se que esta enzima está presente em grande quantidade no interior dos grânulos dos eosinófilos e pode contribuir para a inflamação alérgica pulmonar (ACHARYA; ACKERMAN, 2014). Nesta análise foi possível observar um aumento da atividade desta enzima nos animais do grupo OB/EoE comparados aos animais do grupo EoE (Figura 35).

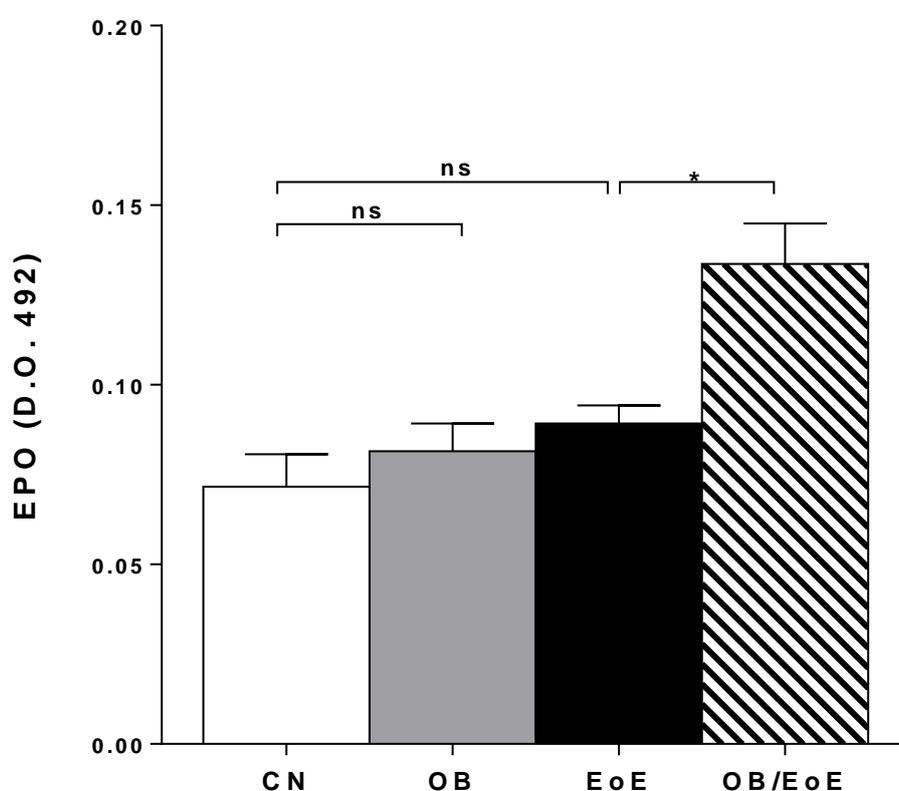


Figura 35. Avaliação da atividade de EPO no pulmão, dos animais dos grupos CN, OB, EoE e OB/EoE, após 10 semanas de dieta. Eutanásia após 24 horas após o último desafio com a OVA. Cada barra representa a média +/- EPM. * $p < 0.05$; ns, não significativo (n=4 animais por grupo).

7 DISCUSSÃO

O aumento da prevalência de doenças alérgicas é um problema de saúde pública mundial, especialmente devido à variedade de sintomas debilitantes e ao alto custo dos tratamentos. Neste contexto, encontra-se a EoE, uma doença alérgica, caracterizada por resposta imune de perfil Th2 e inflamação eosinofílica, que afeta adultos e crianças. Desenvolve-se em indivíduos geneticamente suscetíveis, após a ingestão de alimentos específicos, como a proteína do leite de vaca, trigo, ovo, soja, amendoim/nozes, peixe/frutos do mar e aeroalérgenos (HILL et al., 2017; LETNER et al., 2018). Dentre os vários fatores que podem estar contribuindo para o aumento dessas doenças alérgicas, estão as mudanças no estilo de vida, principalmente quando relacionado a hábitos alimentares e sedentarismo, que podem levar à obesidade. Já está bem documentado que diversos fatores dessa patologia podem contribuir para o aumento da prevalência e gravidade de diversas alergias, como a asma. Nesse contexto, o processo inflamatório, presente na obesidade, pode promover uma piora dos sintomas e o desenvolvimento de um fenótipo clínico distinto (APPLETON et al., 2006; TAYLOR et al., 2008; FITZPATRICK et al., 2012; GIBEON et al., 2013, HASEGAWA et al., 2014).

Dessa forma, estando a obesidade ligada diretamente a práticas alimentares, será que ela também, não poderia ser um fator de risco ou de agravamento dos aspectos patológicos da esofagite eosinofílica? Sendo assim, com o objetivo de avaliar a influência da obesidade sobre a resposta inflamatória observada na EoE, o presente estudo, foi o primeiro a pesquisar esta relação. Para isso, desenvolveu-se concomitantemente, um modelo experimental de obesidade e esofagite eosinofílica, em camundongos machos BALB/c. Essa linhagem foi usada por ser considerada mais susceptível ao desenvolvimento de uma resposta imune de perfil Th2, sendo um bom modelo experimental de alergia (SAHU et al., 2010).

Em relação a indução de obesidade, foi empregado o protocolo utilizado por Silva e colaboradores, 2017. Já para a EoE, foi adaptado o modelo experimental de esofagite eosinofílica, segundo o protocolo padronizado por Sokulsky e colaboradores, 2016. Durante o período de indução da obesidade, houve um ganho de massa corporal em decorrência do acúmulo de gordura na região perigonadal. A hipertrofia do tecido adiposo e a morte dos adipócitos que promove a formação de estruturas em forma de coroa de células ou CLS, sendo esta, uma característica marcante do estado obeso. Nessas estruturas são encontrados sobretudo macrófagos de perfil M1 e linfócitos T ativados, os quais são responsáveis pela produção e liberação de citocinas inflamatórias (DALMAS et al., 2011; GONZÁLEZ-MUNIESA et al.,

2017). Esse acúmulo de gordura na região abdominal é, reconhecidamente, o tipo de gordura que mais está envolvido com o processo inflamatório e com as doenças metabólicas, que frequentemente acompanham a obesidade (BUCCI et al., 2014). Estando assim, os resultados do presente trabalho em conformidade com vários estudos anteriores de indução de obesidade, utilizando dieta hiperlipídica, em camundongos da linhagem BALB/c (PARK et al., 2011; KIM et al., 2011; JAMES et al., 2012; RAMALHO et al., 2013; BUCCI et al., 2014; SILVA et al., 2017). Ainda com relação ao ganho de massa corporal, ao analisarmos os grupos alérgicos, foi observado que ambos se comportaram de forma semelhante aos animais controles. Não ocorrendo, portanto, alterações substanciais para esses parâmetros, dessa forma, esses dados estão em concordância com a literatura, que relata poder ou não ocorrer perda de peso nos pacientes com esofagite eosinofílica (SPERGEL et al., 2002; ARORA; YAMAZAKI, 2004; ARIAS; LUCENDO, 2018). Uma outra possibilidade para essa questão, seria o tempo curto do protocolo de alergia utilizado nesse modelo.

Sabe-se que a obesidade é caracterizada por uma inflamação sistêmica e crônica de baixo grau, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e hormônios peptídicos, como a leptina (ERUSAN et al., 2012). O ganho de peso observado nesses animais, é acompanhado de distúrbios metabólicos, dislipidemia e alteração da taxa de glicemia de jejum, de acordo com os parâmetros observados em humanos (FALUDI et al., 2017). No presente estudo, os animais obesos exibiram níveis séricos elevados de TNF- α e leptina, corroborando com os resultados de Park e colaboradores (2011) e James e colaboradores (2012). Somado a esses fatores, houve aumento nos níveis séricos de colesterol total, colesterol-LDL, triglicérides e glicemia de jejum. Em conjunto, esses resultados demonstram que os animais obesos apresentaram características de um processo inflamatório crônico e sistêmico, associado a distúrbios metabólicos, confirmando, portanto, a indução da obesidade em camundongos da linhagem BALB/c.

Uma vez que tenha sido estabelecida a indução da obesidade no modelo do presente estudo, foi avaliado também, qual o efeito dessas alterações na EoE. Esta patologia é uma doença inflamatória crônica do esôfago, altamente debilitante (JENSEN et al., 2015). Seus sintomas incluem insuficiência de crescimento, vômitos, dor torácica e abdominal, disfagia e impactação alimentar, progredindo nessa ordem desde a infância até a idade adulta (NOEL et al., 2004). Comparada com outras doenças crônicas da infância, a EoE é uma das piores em qualidade de vida, provavelmente devido à restrição de dietas, dor crônica e necessidade de endoscopias recorrentes (SAFRONEVA et al., 2015). Além disso, a EoE compartilha características imunológicas com outras doenças atópicas, como acúmulo de eosinófilos e

níveis séricos elevados de IgE (SPERGEL, 2015), demonstrando uma conexão fisiopatológica com outros órgãos (MISHRA et al., 2001; ROTHENBERG, 2004). Foi observado no presente estudo, que além do esôfago, a traqueia, pulmão e intestino, igualmente foram afetados pela indução do modelo utilizado, no qual a obesidade também induziu o influxo de mastócitos e eosinófilos para esses órgãos. No pulmão, isto foi associado ao aumento dos níveis de IL-4 e IL-13. Dessa forma, a maioria dos pacientes adultos e pediátricos, com EoE, possuem distúrbios alérgicos concomitantes, como rinite, asma brônquica, alergia alimentar e/ou dermatite atópica (VITELLAS et al., 1993; SPERGEL et al., 2002). Esses pacientes apresentam um padrão de células inflamatórias e expressão de citocinas (STRAUMANN; SIMON, 2004), semelhante aos encontrados na EoE, estabelecendo uma relação entre vias respiratórias e trato gastrointestinal, possibilitando uma conexão entre alérgenos alimentares e ambientais (BOUSQUET et al., 2003; SIMON et al., 2005).

A EoE é uma doença clínico-patológica e, assim, seu diagnóstico depende de certos achados endoscópicos, em indivíduos com histórico clínico, que incluem anéis esofágicos, sulcos lineares, placas e estenoses. Entretanto, esses achados não são específicos para essa doença (MIEHLKE, 2014; DAVIS; ROTHENBERG, 2016). Atualmente o diagnóstico da EoE, tem se baseado na detecção de no mínimo 15 eosinófilos/hpf na mucosa esofágica (DELLON et al., 2013; PARK, 2014; ADAMIAK; PLATI, 2018). No presente estudo, notavelmente, a obesidade promoveu maior influxo de eosinófilos nos animais alérgicos, e também aumentou a área de remodelamento tecidual e o diâmetro do esôfago nesses animais. O esôfago normalmente é um órgão desprovido de eosinófilos, por isso a presença mesmo que o número pequeno dessas células é indicativo de doença ativa (FRIESEN et al., 2002; KHAN, 2005; DEBROSSE et al., 2006; TALLEY et al., 2007). Vale ressaltar que, os animais apenas obesos apresentaram maior número de eosinófilos, associado ao maior diâmetro do esôfago. Esses dados indicam que a obesidade pode ser considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento da EoE e também contribuir para a exacerbação dos sintomas através de modificações imunológicas e patológicas associadas ao influxo intensificado de células inflamatórias, que podem estar relacionadas à disfunção esofágica. Esse acúmulo de eosinófilos na mucosa do esôfago e a detecção de grânulos extracelulares além da hiperplasia de células epiteliais, mimetizam as alterações fisiopatológicas observadas nos indivíduos com esofagite eosinofílica (FURUTA, 1998).

As características patológicas da EoE se desenvolvem devido a uma resposta imune mediada por células Th2, envolvendo a liberação das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 a alérgenos alimentares e/ou ambientais. Um dos principais fatores de recrutamento e ativação de

eosinófilos é a IL-5. Essa citocina tem um papel crucial no desenvolvimento de eosinófilos na medula óssea, além de recrutá-los para locais de inflamação e desencadear ativação e sua sobrevivência (MISHRA et al., 2002), enquanto a IL-13 estimula o epitélio esofágico a produzir eotaxina 3, uma quimiocina potente que recruta também eosinófilos para o esôfago (SIMON et al., 2016). No tecido, eosinófilos ativados liberam seus grânulos citoplasmáticos, incluindo proteases e o TGF- β , que promovem inflamação local e lesão tecidual (ARIAS et al., 2016). Esses mediadores podem alterar o músculo liso esofágico e romper a barreira epitelial. Nesse sentido, a inflamação eosinofílica correlaciona-se com o remodelamento esofágico e a fibrose subepitelial (AMSDEN et al., 2012). No presente estudo, após os desafios orais com a OVA, a obesidade induziu maior expressão relativa do RNAm da IL-5, quando comparado com os animais alérgicos não obesos. Polimorfismos no gene codificador de IL-5 também ocorrem em pacientes com EoE, e uma maior expressão do RNAm desta citocina indica uma doença ativa em humanos e em modelos experimentais (NAMJOU et al., 2014; HILL; SPERGEL, 2016; KOTTYAN; ROTHENBERG, 2017).

Não podemos descartar que o aumento do diâmetro do esôfago, nos animais obesos, independente da alergia, possa também ter sido em decorrência da DRGE, uma que vez a obesidade é um importante fator de risco para esta doença e para alterações na fisiologia do esôfago. Além disso, a EoE e a DRGE compartilham algumas similaridades patológicas que levam aos sintomas clínicos que dificultam a diferenciação de seu diagnóstico (CHANG; FRIEDENBERG, 2014).

A expressão gênica desregulada e a liberação de citocinas epiteliais, como a IL-33 e a TSLP, na mucosa esofágica são eventos precoces que promovem a resposta Th2 na EoE (SIMON et al., 2015; ROCHMAN et al., 2018). A IL-33 é uma alarmina, da família da citocina IL-1, que sinaliza através do receptor ST2, expresso em vários tipos celulares. A elevada expressão de IL-33 está associada com a EoE em crianças e em modelo experimental (JUDD et al., 2016; TRAVERS et al., 2017). No presente estudo, embora não tenha sido observado um aumento significativo na expressão do RNAm dessa citocina nos animais alérgicos magros, houve uma tendência a esse aumento. No entanto os animais obesos, independente do seu *status* alérgico, apresentaram uma menor expressão de IL-33, sugerindo que as características imunopatológicas observadas nos animais obesos alérgicos foi independente de mecanismos envolvendo a IL-33. Corroborando com esse dado, a expressão de IL-33/ST2 está reduzida na biopsia de tecido cardíaco, adiposo e fígado, em ratos obesos em relação ao controle (MASEK-HAMMERMAN et al., 2018). Além disso, na obesidade essa citocina exerce um papel protetor

(SATTAR et al., 2010; MASEK-HAMMERMAN et al., 2018). Contudo o potencial efeito dessa redução no esôfago não foi avaliado no presente estudo.

Ainda nesse contexto, é bem conhecido que a citocina epitelial TSLP contribui para o estabelecimento da EoE, potencializando a ativação de células dendríticas e induzindo-as a polarizar a resposta imune para o perfil Th2 (PATTARIN et al., 2017). É importante ressaltar que polimorfismo no gene codificador da TSLP já foi identificado na EoE. Ao passo que, a deleção desse gene em modelo murino de EoE, elimina completamente a eosinofilia (ROTHENBERG et al., 2010; SHERRILL et al., 2010). No presente estudo, a indução da alergia promoveu o aumento na expressão de TSLP no tecido esofágico dos animais alérgicos, e com uma tendência a ser mais elevada nos animais obesos alérgicos. Esse dado sugere que a obesidade possa contribuir para o agravamento da EoE por mecanismos precoces envolvendo a alta expressão de TSLP, conseqüentemente, potencializando a cascata de ativação celular subsequente. Em conjunto, os resultados do presente estudo, demonstram um efeito diferencial da obesidade na expressão da IL-33 em relação a TSLP. Uma possibilidade para esse reação poderia ser que a IL-33 seja produzida no esôfago por células epiteliais não diferenciadas, enquanto a TSLP, por células epiteliais maduras, sugerindo que a obesidade possa atuar nas células do epitélio esofágico de acordo com o seu grau de maturação (TRAVERS; ROTHENBERG, 2015; TRAVERS et al., 2017).

Em conformidade com a função da TSLP em potencializar a ativação da DCs (PATTARIN et al., 2017), foi observado, no presente estudo, que a obesidade influenciou fortemente a resposta imune nos linfonodos mediastinais e no baço, após o protocolo de indução da alergia. Nesse sentido os dados demonstraram que as DCs, que são as células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T nos órgãos linfoides periféricos, foram fortemente influenciadas durante a associação da obesidade com a EoE. Visto que a expressão da molécula co-estimulatória CD80⁺ nessas células estava elevada particularmente no baço dos animais alérgicos e obesos alérgicos. No entanto, o grupo obeso alérgico apresentou maior expressão desse marcador de ativação de DCs, em comparação com o grupo alérgico magro. Em contraste, o número de DCs CD11c⁺MHCII^{hi} expressando PDL1, estava elevada nos animais alérgicos, em ambos órgãos linfoides. Embora esse marcador seja tradicionalmente conhecido como uma molécula regulatória, o seu papel nas respostas alérgicas é contraditório. Uma vez que existem trabalhos que mostram sua atuação na exacerbação da inflamação em processos alérgicos, enquanto outros o demonstram com função protetora (AKBARI et al., 2010). O aumento da expressão dessa molécula nos animais com EoE magros, poderia ser uma tentativa do sistema imunológico em regular a resposta alérgica, no entanto o seu papel ainda não foi explorado

nessa doença. Enquanto isso, a obesidade não alterou a expressão desse marcador em até mesmo em relação ao controle. Esse cenário poderia estar sustentando o aumento da ativação/proliferação de células Th2, uma vez que observamos nos resultados, um maior número de células Th2 produzindo IL-4 ($CD3^+CD4^+GATA3^+IL-4^+$) nos animais obesos alérgicos em comparação aos animais somente alérgicos.

A IL-4 originada a partir de células Th2, são indutoras eficazes da ativação/proliferação de células B, promovendo a mudança de classe de IgG para IgE nos centros germinativos (WU; ZARRIN, 2014). No presente estudo, os níveis de IgE específicos para OVA estavam diminuídos nos animais obesos alérgicos, o que poderia ser uma consequência da obesidade sobre os níveis de IgE, uma vez que tal efeito já foi observado em um estudo com modelo experimental de obesidade/asma, também na linhagem BALB/c (SILVA et al., 2017). Diante do exposto, nós avaliamos se a obesidade poderia estar afetando a ativação/proliferação dos linfócitos B no baço e nos linfonodos mediastinais. Inicialmente, foi observado que os animais alérgicos não obesos, apresentaram maior número de células B $CD19^+CD40^+$ em ambos órgãos linfoides secundários, após a protocolo de indução da alergia. Sugerindo que as células B impulsionam a produção de IgE, nesses os órgãos. Contudo, os animais obesos alérgicos apresentaram um perfil distinto, com maior número de células B $CD19^+CD40^+$ nos linfonodos mediastinais e um menor número no baço, em comparação com os animais alérgicos magros. Esse dado implica que os menores níveis de IgE observados nos animais obesos alérgicos poderia ser em decorrência do número menor de linfócitos B no baço. Interessantemente, um estudo prévio desenvolvido pelo nosso grupo, demonstrou efeito semelhante em um modelo de obesidade e asma (dados em processo de publicação). Esse resultado está de acordo com estudos que mostram que a obesidade pode causar danos na função e redução do número de células B esplênicas em modelo experimental, indicando que a imunidade humoral estaria prejudicada nos obesos (JAGSI et al., 2017).

Por outro lado, em modelo experimental, foi demonstrado que camundongos deficientes em células B desenvolvem eosinofilia esofágica e hiperplasia epitelial independente da produção de anticorpos e linfócitos B (MISHRA et al., 2006). Dessa forma, vale ressaltar que apesar dos níveis elevados de IgE observados em estudos clínicos e experimentais (HILL et al., 2017), existem várias linhas de evidência que apontam a EoE como uma doença não mediada por IgE (CLAYTON et al., 2014; MAGGADOTTIR et al., 2014). Além disso, a ligação da IgE com a EoE surge em subtipos específicos de pacientes (MULDER et al., 2012), uma vez que já foi observado, que a terapia com o anticorpo Omalizumab, por exemplo, ou outras imunoterapias orais, não são eficazes na redução da EoE em alguns pacientes (ROCHA

et al., 2011), podendo até estar ligada ao aumento do risco de desenvolver a doença (LUCENDO; ARIAS; et al., 2014; MAGGADOTTIR et al., 2014). Estudos clínicos já demonstraram que ocorre uma maior produção de IgG4 em detrimento a produção de IgE, porém em modelo experimental, não foi ainda identificado um correspondente da IgG4 (CLAYTON et al., 2014; ROSENBERG et al., 2018).

As funções efetoras da IgE envolvem a sua interação com receptores expressos na superfície de vários subtipos celulares. Assim, existem dois receptores para IgE: o receptor Fc de alta afinidade (FcεRI) e o receptor Fc de baixa afinidade (FcεRII, também conhecido como CD23). O FcεRI é expresso por mastócitos e basófilos, nos quais sua ativação medeia a degranulação celular, a produção de eicosanoides e a produção de citocinas. Em humanos, o FcεRI também é expresso por células dendríticas e macrófagos, promovendo a internalização de antígenos ligados a IgE, para processamento e apresentação do antígeno na superfície celular, bem como a produção de citocinas que promovem respostas imunes do tipo Th2. O FcεRII (CD23) é expresso por células B maduras, nas quais regula a produção de IgE e facilita o processamento e apresentação de antígenos (KIJIMOTO-OCHIAI, 2002; GALLI; TSAI, 2013). No presente estudo, embora tenha havido uma redução nos níveis séricos de IgE, nos animais obesos alérgicos, esses apresentaram maior número de mastócitos no esôfago, em comparação com os animais alérgicos não obesos, sugerindo uma relação destas células com a obesidade e EoE concomitantemente. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de produção local de IgE na mucosa esofágica (ROSENBERG et al., 2018).

No intuito de avaliar a ativação dos mastócitos no tecido esofágico, uma vez que o seu número estava aumentado nos animais obesos alérgicos, foi analisada a liberação da enzima triptase, presente nos grânulos dessas células. Os resultados mostraram um perfil de ativação mais expressivo dos mastócitos nos animais obesos alérgicos, confirmada por uma área positiva maior de marcação para essa enzima, quando comparados aos animais alérgicos não obesos. Corroborando com esse resultado, um estudo já demonstrou haver ativação dos mastócitos, com intensa degranulação e liberação da triptase, em pacientes com EoE (ACEVES et al., 2010; KUTTY et al., 2019). Vale ressaltar que o número de mastócitos, nos animais estudados, estava elevado na mucosa esofágica, independentemente da indução da EoE, sugerindo que a obesidade pode preceder o desenvolvimento e o agravamento da doença, por mecanismos precoces envolvidos com acúmulo dessas células. De acordo com esses resultados, modelos experimentais já demonstraram que mastócitos precedem o acúmulo de eosinófilos na EoE (YU et al., 2008; ZUO et al., 2010), e estudos clínicos também mostraram um número elevado de mastócitos em biópsias de esôfago de pacientes EoE (MULDER et al., 2012). Além disso, o

aumento dessas células na mucosa esofágica pode ser usado no diagnóstico, a fim de discernir a EoE da DRGE (DELLON et al., 2011).

A disfagia proeminente na doença é um sintoma clínico de pacientes com EoE, resultado da combinação de fibrose e anormalidades motoras. A esse respeito, mastócitos e eosinófilos são poderosos indutores de remodelamento da mucosa esofágica. Ambas as células são conhecidas como produtoras de TGF- β , considerado um potente ativador de fibroblastos, e indutor de transição epitelial mesênquima e contração do músculo liso esofágico (CHENG et al., 2012). No presente estudo, os animais obesos alérgicos apresentaram aumento do número de mastócitos e eosinófilos, o que resultou uma maior área de depósito de colágeno subepitelial, responsável pelo remodelamento do tecido, o que pode resultar em uma disfagia aumentada semelhante à dos humanos com formação de fibrose e disfunção esofágica (RIEDER et al., 2014; SOKULSKY et al., 2016).

Tendo em vista o grande influxo de mastócitos no esôfago dos animais obesos, o papel destas células foi questionado no presente estudo e, para esse propósito foi realizado o tratamento com o cromoglicato de sódio, a fim de tentarmos entender a participação delas no modelo experimental utilizado. O CG é um composto que apresenta eficácia no controle e tratamento da asma em crianças e adultos (ANDERSSON et al., 2001; GUEVARA et al., 2006; HICKSON, 2007). Ele atua como um agente estabilizador de mastócitos, inibindo a liberação de seus mediadores químicos (BERNSTEIN, 1985; NETZER et al., 2012; VALLE-DORADO et al., 2015; ROVIEZZO et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Tem sido relatado que o CG possui atividade protetora relacionada ao seu efeito em alguns tipos de células, envolvidos na inflamação crônica das vias aéreas, resultando na ação terapêutica visualizada na asma (YAZID et al., 2009). Mombeini e colaboradores, 2012, também relataram que o CG atua na prevenção dos sintomas desta doença agindo como broncodilatador.

Embora o efeito do CG na EoE tem sido pouco relatado na literatura, os dados ainda não são consistentes (LIEBERMAN et al., 2018). No presente estudo, foi possível observar que o tratamento reduziu consideravelmente o número de mastócitos e eosinófilos no esôfago nos animais alérgicos, independente da obesidade. Aliado a isso, houve redução da área de remodelamento no tecido esofágico, o que indica uma melhora das características imunopatológicas da doença. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Hoshino e Nakamura (1997), que demonstraram o efeito anti-inflamatório do CG, através de biópsias da mucosa brônquica em pacientes com asma, antes e após o tratamento com CG inalado. Nesse estudo, o número de eosinófilos, mastócitos, linfócitos T e macrófagos estavam significativamente reduzidos, como resultado da ação desse medicamento (HOSHINO;

NAKAMURA, 1997; YANG et al., 2010). Vale destacar, que os mastócitos são críticos para a cascata de eventos que sequencialmente envolvem a ativação de células T, células B e produção de IgE nos processos alérgicos (ZHANG et al., 2016).

Já foi demonstrado que o CG é eficaz na prevenção dos sintomas da alergia por reduzir a absorção de macromoléculas ingeridas, como alérgenos, polietilenoglicóis e lactulose (YOKOOJI; MATSUO, 2015). É importante ressaltar, que no presente estudo, a redução dessas células, aconteceu em todos os animais tratados, sem relação com a obesidade, sendo assim o CG pode estar agindo na diminuição dos sintomas, por prevenir a absorção de alérgenos. Houve também uma redução significativa na liberação da enzima triptase, provavelmente esse fato pode estar associado ao menor influxo/ativação de mastócitos no tecido esofágico, em consequência do efeito do CG, atuando como um agente estabilizador da membrana dessas células.

Nesse sentido, o envolvimento da sinalização via CD23 no mecanismo de ação do CG já foi proposto na literatura (HOLEN; ELSAYED, 1995). Em particular, Holen e Elsayed mostraram, em 1995, que o CG fornece um sinal inibitório para as células mononucleares, coletadas do sangue periférico de pacientes alérgicos, que expressam esse receptor. Por conseguinte, Roviezzo e colaboradores em 2016, descobriram que o CG reduz a expressão de CD23 em células TCD4⁺ e TCD8⁺, sem alterar o recrutamento desses linfócitos. Além disso, foi observado que após o tratamento com CG, houve uma redução no influxo de células B para o pulmão, paralela à redução da expressão de CD23 (ROVIEZZO et al., 2016). A molécula CD23 também é expressa em células B e sua densidade está associada com os níveis de IgE (SELB et al., 2017), e um estudo clínico demonstrou que o CG inibe a produção de IgE (KIMATA et al., 1991). No presente estudo, foi possível observar que o tratamento com CG também reduziu o número de células B nos linfonodos mediastinais e baço, nos animais tratados obesos ou não, o que poderia explicar os níveis reduzidos de IgE observados nesses grupos após o tratamento, demonstrando que realmente pode ocorrer o envolvimento da sinalização de CD23 no mecanismo de ação do CG, embora não tenha sido analisada a sua expressão.

Adicionalmente, os dados do presente estudo, mostram que houve uma redução do número de células T produtoras de IL-4 com o tratamento com CG, nos linfonodos mediastinais e baço, nos animais obesos alérgicos. Embora não tenha ocorrido o mesmo, nos alérgicos. Observamos também uma menor expressão do fator de transcrição GATA3 e da citocina IL-5, no esôfago dos animais alérgicos e obesos alérgico, após o tratamento. Isto pode indicar a possibilidade de redução do processo inflamatório mediado por essas células na EoE, visto que essas citocinas estão envolvidas na ativação células Th2, mudança de classe de células B para

produzir IgE, na proliferação e recrutamentos de eosinófilos, além da indução de mastócitos (DAVIS; ROTHENBERG, 2016). Apesar de alguns trabalhos relatarem que o tratamento com CG não mostra qualquer efeito significativo na liberação de IL-4, entretanto, sendo essa citocina uma das mais potentes indutoras da expressão de CD23 nas células B (PUNNONEN et al., 1993; ROVIEZZO et al., 2016), a redução do número de células T produtoras de IL-4, encontrada no presente trabalho, pode ser relevante, uma vez que poderia ser um dos mecanismos de ação do CG na EoE no grupo obeso alérgico.

Em contrapartida aos dados descritos acima, os quais mostram que a obesidade potencializa o recrutamento e ativação de vários tipos celulares que promovem as características imunopatológicas da EoE, foi avaliado também o efeito da obesidade em células T regulatórias na EoE. Essas células são caracterizadas, principalmente, pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e pelo marcador de superfície CD25 em sua membrana. As Tregs podem exercer sua função por diferentes mecanismos, entre eles, destaca-se a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 (WORKMAN et al., 2009). No presente estudo ficou evidenciado a tentativa do sistema imune em regular a resposta inflamatória estabelecida pela indução do modelo de alergia no tecido esofágico, uma vez que houve aumento na expressão do RNAm de Foxp3, indicando a presença dessas células no tecido, assim como também houve aumento da expressão RNAm da IL-10 nos animais alérgicos magros. Esse resultado está de acordo com estudos que mostram o aumento de Tregs no esôfago de crianças com EoE, sugerindo um mecanismo de *feedback* negativo para regular a resposta inflamatória (TANTIBHAEDHYANGKUL et al., 2009; FUENTEBELLA et al., 2010). Surpreendentemente, esse efeito não foi observado nos animais obesos alérgicos.

As células Tregs tem um papel crucial na manutenção da tolerância oral à exposição a alérgenos alimentares (JOSEFOWICZ et al., 2012). Em contraste ao observado no tecido periférico, não houve diferença no número dessas células em ambos os órgãos linfoides em todos os grupos analisados no presente estudo. Porém a expressão do Foxp3 nos animais obesos alérgicos, foi menor, indicando que a função dessas células estaria prejudicada, coincidindo com a reduzida expressão de IL-10 no tecido esofágico. De fato, a obesidade, é capaz de não só reduzir o número, mas também, prejudicar a função de células Tregs (CAVA et al., 2007; LUMENG et al., 2011).

Vale destacar que após o tratamento com CG, o número de células com perfil regulatório aumentou nos órgãos linfoides periféricos, tanto nos animais alérgicos magros quanto nos obesos alérgicos, reforçando a ideia do efeito anti-inflamatório do CG. Ao passo que, no tecido esofágico, após o tratamento, o grupo alérgico magro apresentou uma redução

dessas células. Esse evento pode ter ocorrido devido ao atraso ou uma retenção dessas células nos órgãos linfoides, de onde elas poderiam estar controlando a proliferação de linfócitos B CD19⁺CD40⁺, explicando a redução dos níveis de IgE após o tratamento com CG. Porém não teve efeito nos linfócitos T de perfil Th2. Nas DCs o tratamento não alterou a expressão da molécula CD80, nos animais alérgicos magros, porém reduziu a expressão da molécula PDL-1 somente nos linfonodos mediastinais nesses animais. Em contraste, nos animais obesos alérgicos, houve um aumento o número de DCs expressando CD80 nos linfonodos e uma redução no baço. Esse efeito no baço foi acompanhado pelo aumento de DCs expressando PDL-1, esses dados demonstram uma ação seletiva nas DCs em relação aos diferentes órgãos periféricos. Isso foi associado a atividade direta do CG em DCs derivadas da medula óssea, as quais apresentaram uma redução na expressão de CD80, sugerindo menor ativação.

Considerando que a obesidade é um fator de risco e agravamento para as doenças alérgicas, os dados do presente trabalho ressaltam a importância da avaliação dos mecanismos envolvendo a associação da obesidade e a EoE. Em resumo os dados demonstram que: Primeiro: a obesidade por si só promove o influxo de células inflamatórias de perfil Th2, como de mastócitos e eosinófilos para o esôfago, podendo ser considerado um fator de risco para EoE; segundo: após o protocolo de indução da alergia, a obesidade potencializou o influxo de mastócitos e eosinófilos para o esôfago e esse evento foi associado ao maior remodelamento tecidual e conseqüentemente a piora dos sintomas clínicos; terceiro: eventos precoces, como o aumento da produção/liberação de TSLP no epitélio das vias aéreas, foram determinantes na cascata de ativação que culminou com aumento da resposta Th2 no tecido, mediada células dendríticas; quarto: a produção de IgE foi devido ao menor número de LB no baço; quinto: independente de IgE, houve uma maior ativação de mastócitos; sexto: o tratamento com o cromoglicato de sódio reduziu características imunopatológicas da EoE em decorrência da redução da resposta imune Th2 e aumento da resposta regulatória.

8 CONCLUSÃO

O acúmulo desproporcional de mastócitos e eosinófilos na mucosa esofágica implica que a obesidade é um importante fator de risco e/ou piora dos sintomas da EoE. Esse efeito foi mediado pela exacerbação da resposta imune Th2 e comprometimento do perfil regulatório, nos órgãos linfoides periféricos. Esses dados fornecem um novo conhecimento sobre outro fator de risco para EoE, contribuindo para futuras estratégias de tratamento em subgrupos de pacientes específicos. Reforçando também, o efeito protetor do cromoglicato de sódio, que poderia ser utilizado como mais uma abordagem terapêutica na prevenção e tratamento da EoE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABONIA, J. P.; BLANCHARD, C.; BUTZ, B. B.; et al. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 1, p. 140–149, 2010.
- ACEVES, S. S.; ACKERMAN, S. J. Relationships Between Eosinophilic Inflammation, Tissue Remodeling and Fibrosis in Eosinophilic Esophagitis. **Immunol Allergy Clin North Am.**, v. 29, n. 1, p. 197–212, 2009.
- ACEVES, S. S.; CHEN, D.; NEWBURY, R. O.; et al. Mast cells infiltrate the esophageal smooth muscle in patients with eosinophilic esophagitis, express TGF- β 1, and increase esophageal smooth muscle contraction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 6, p. 1198–1204.e4, 2010.
- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406–17415, 2014.
- ADAMIAK, T.; PLATI, K. F. Pediatric Esophageal Disorders: Diagnosis and Treatment of Reflux and Eosinophilic Esophagitis. **Pediatrics in Review**, v. 39, n. 8, p. 392–402, 2018.
- AKBARI, O.; STOCK, P.; SINGH, A. K.; et al. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 1, p. 81–91, 2010.
- AKDIS, C. A.; BLESKEN, T.; AKDIS, M.; WÜTHRICH, B.; BLASER, K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 1, p. 98–106, 1998.
- AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 5, p. 961–969, 2005.
- ALMANSA, C.; KRISHNA, M.; BUCHNER, A. M.; et al. Seasonal distribution in newly diagnosed cases of eosinophilic esophagitis in adults. **American Journal of Gastroenterology**, v. 104, n. 4, p. 828–833, 2009.
- ALTOUNYAN, R. E. C. Inhibition of experimental asthma by a new compound-disodium cromoglycate (Intal). **Allergy**, v. 22, p. 487–551, 1967.
- ALTOUNYAN, R. E. C. Review of clinical activity and mode of action of sodium cromoglycate. **Clinical Allergy**, v. 10, p. 481–490, 1980.
- AMSDEN, K.; DU, J.; PROTHEROE, C. A.; et al. Eosinophilic esophagitis: Epithelial mesenchymal transition contributes to esophageal remodeling and reverses with treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 5, p. 1387–1396.e7, 2012.
- ANDERSSON, F.; KJELLMAN, M.; FORSBERG, G.; MÖLLER, C.; ARHEDEN, L. Comparison of the cost-effectiveness of budesonide and sodium cromoglycate in the management of childhood asthma in everyday clinical practice. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 86, n. 5, p. 537–544, 2001.

ARIAS, Á.; LUCENDO, A. J. Incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis increase continuously in adults and children in Central Spain: A 12-year population-based study. **Digestive and Liver Disease**, 2018.

ARIAS, A.; LUCENDO, A. J.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, P.; et al. Dietary treatment modulates mast cell phenotype, density, and activity in adult eosinophilic oesophagitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 46, n. 1, p. 78–91, 2016.

ARIAS, A.; PEREZ-MARTINEZ, I.; TENÍAS, J. M.; LUCENDO, A. J. Systematic review with meta-analysis: The incidence and prevalence of eosinophilic oesophagitis in children and adults in population-based studies. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, n. 1, p. 3–15, 2016.

ARORA, A. S.; YAMAZAKI, K. Eosinophilic esophagitis: asthma of the esophagus? **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 2, n. 7, p. 523–530, 2004.

ARROYO-JOHNSON, C.; MINCEY, K. D. Obesity epidemiology trends by race/ethnicity, gender, and education: National Health Interview Survey, 1997–2012. **Gastroenterol Clinical North American**, v. 45, n. 4, p. 571–579, 2016.

ATTWOOD, S.; SMYRK, T.; DEMEESTER, T.; JONES, J. Eosophageal eosinophilia with dysphagia. A distinct clinicopathological syndrome. **Journal of Digestive Diseases**, v. 38, n. 1, p. 109–116, 1993.

BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M.-G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 120, n. 2, p. 227–235, 2007.

BERIN, M. C.; SHREFFLER, W. G. T(H)2 adjuvants: implications for food allergy. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 6, p. 1311–1320, 2008.

BERNSTEIN, I. L. Cromolyn sodium. **Chest**, v. 87, n. 1 SUPPL., p. 68S–73S, 1985.

BLANCHARD, C. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene- expression profile in eosinophilic esophagitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 536–547, 2006.

BLASER, B.; WÜTHRICH, H.-U.; SIMON, K.; et al. Eosinophilic Inflammatory Diseases Eosinophils Express Functional IL-13 in. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 1021–1027, 2002.

BORTHWICK, L. A.; WYNN, T. A.; FISHER, A. J. Cytokine mediated tissue fibrosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 7, p. 1049–1060, 2014.

BOUFFI, C.; ROCHMAN, M.; ZUST, C. B.; et al. IL-33 Markedly Activates Murine Eosinophils by an NF- B-Dependent Mechanism Differentially Dependent upon an IL-4-Driven Autoinflammatory Loop. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 8, p. 4317–4325, 2013.

BOUSQUET, J.; VIGNOLA, A. M.; DEMOLY, P. Links between rhinitis and asthma. **Allergy**, v. 58, n. 8, p. 691–706, 2003.

- BROWN, L. F.; GOLDMAN, H.; ANTONIOLI, D. A. Intraepithelial eosinophils in endoscopic biopsies of adults with reflux esophagitis. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 8, n. 12, p. 899–905, 1984.
- BUCCI, M.; KARMI, A. C.; IOZZO, P.; et al. Enhanced fatty acid uptake in visceral adipose tissue is not reversed by weight loss in obese individuals with the metabolic syndrome. **Diabetologia**, v. 58, n. 1, p. 158–164, 2014.
- BUETTNER, R.; SCHÖLMEICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.
- BUNOUT, D.; MUÑOZ, C.; LÓPEZ, M.; et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor in obese alcoholics compared with normal-weight patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 3, p. 373–376, 1996.
- BURKS, A. W.; SAMPSON, H. A. Double-blind placebo-controlled trial of oral cromolyn in children with atopic dermatitis and documented food hypersensitivity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 81, n. 2, p. 417–423, 1988.
- BUTTE, M. J.; PENA-CRUZ, V.; KIM, M.-J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. Interaction of Human PD-L1 and B7-1. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 13, p. 3567–3572, 2008.
- CAVA, A. LA; CALÌ, G.; FONTANA, S.; et al. A Key Role of Leptin in the Control of Regulatory T Cell Proliferation. **Immunity**, v. 26, n. 2, p. 241–255, 2007.
- CHANG, P.; FRIEDENBERG, F. Obesity & GERD. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 43, n. 1, p. 161–173, 2014.
- CHEHADE, M.; ACEVES, S. S. Food allergy and eosinophilic esophagitis. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 3, p. 231–237, 2010.
- CHEN, Y.; KUCHROO, V. K.; INOBE, J.; HAFLER, D. A.; WEINER, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5176, p. 1237–40, 1994.
- CHENG, E.; SOUZA, R. F.; SPECHLER, S. J. Tissue remodeling in eosinophilic esophagitis. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 303, n. 11, p. G1175-87, 2012.
- CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G.; et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, 2005.
- CLÀRIA, J. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 fatty acid-derived lipid mediators. **Frontiers in Immunology**, v. 2, n. 49, p. 1–8, 2011.
- CLAYTON, F.; FANG, J. C.; GLEICH, G. J.; et al. Eosinophilic esophagitis in adults is associated with IgG4 and not mediated by IgE. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 602–609, 2014.

- COFFEY, M. J.; TORRETTI, B.; MANCUSO, P. Adipokines and Cysteinyl Leukotrienes in the Pathogenesis of Asthma. **Journal of Allergy**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- COLLINS, S.; MARTIN, T. L.; SURWIT, R. S.; ROBIDOUX, J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 243–248, 2004.
- CORNELIS, M. C.; HU, F. B. Systems Epidemiology: A New Direction in Nutrition and Metabolic Disease Research. **Current Nutrition Reports**, v. 2, n. 4, p. 225–235, 2013.
- COX, J. S.; BEACH, J. E.; BLAIR, A. M.; et al. Disodium cromoglycate (Intal). **Advances in Drug Research**, v. 5, p. 115–196, 1970.
- D’ALESSANDRO, A.; ESPOSITO, D.; PESCE, M.; et al. Eosinophilic esophagitis : From pathophysiology to treatment. **World Journal Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 150–158, 2015.
- DALMAS, E.; CLÉMENT, K.; GUERRE-MILLO, M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 7, p. 307–314, 2011.
- DAVIS, B. P.; ROTHENBERG, M. E. Mechanisms of Disease of Eosinophilic Esophagitis. **Annual review of pathology**, v. 11, p. 365–393, 2016.
- DEBROSSE, C. W.; CASE, J. W.; PUTNAM, P. E.; COLLINS, M. H.; ROTHENBERG, M. E. Quantity and Distribution of Eosinophils in the Gastrointestinal Tract of Children. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 9, n. 3, p. 210–218, 2006.
- DELLON, E. S. Epidemiology of eosinophilic esophagitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 201–218, 2014.
- DELLON, E. S.; CHEN, X.; MILLER, C. R.; et al. Tryptase staining of mast cells may differentiate eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 2, p. 264–271, 2011.
- DELLON, E. S.; GONSALVES, N.; HIRANO, I.; et al. ACG clinical guideline: Evidenced based approach to the diagnosis and management of esophageal eosinophilia and eosinophilic esophagitis (EoE). **American Journal of Gastroenterology**, v. 108, n. 5, p. 679–692, 2013.
- DELLON, E. S.; HIRANO, I. Epidemiology and Natural History of Eosinophilic Esophagitis. **Gastroenterologia**, v. 154, n. 2, p. 319–332, 2018.
- DELLON, E. S.; JENSEN, E. T.; MARTIN, C. F.; SHAHEEN, N. J.; KAPPELMAN, M. D. Prevalence of Eosinophilic Esophagitis in the United States. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 4, p. 589–596.e1, 2014.
- DELLON, E. S.; KIM, H. P.; SPERRY, S. L. W.; et al. A phenotypic analysis shows that eosinophilic esophagitis is a progressive fibrostenotic disease. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 79, n. 4, 2014.
- DOHIL, R.; NEWBURY, R.; FOX, L.; BASTIAN, J.; ACEVES, S. Oral viscous budesonide is effective in children with eosinophilic esophagitis in a randomized, placebo-controlled trial. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 418–429.e1, 2010.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98–107, 2011.

DRAZEN, B. J. M.; ARM, J. P.; AUSTEN, K. F. Commentary Sorting Out the Cytokines of Asthma. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 1, p. 1–5, 1996.

DUNBAR, K. B.; AGOSTON, A. T.; ODZE, R. D.; et al. Association of Acute Gastroesophageal Reflux Disease With Esophageal Histologic Changes. **JAMA**, v. 315, n. 19, p. 2104–2112, 2016.

EDAIRE CHENG, M. D.; RHONDA F. SOUZA, M. D.; STUART JON SPECHLER, M. . Eosinophilic Esophagitis: Interactions with Gastroesophageal Reflux Disease. **Gastroenterology Clinical North American**, v. 43, n. 2, p. 243–256, 2014.

EIWEGGER, T.; AKDIS, C. A. IL-33 links tissue cells, dendritic cells and Th2 cell development in a mouse model of asthma. **European journal of immunology**, v. 41, n. 6, p. 1535–1538, 2011.

ELLIOTT, E. J.; THOMAS, D.; MARKOWITZ, J. E. Non-surgical interventions for eosinophilic esophagitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, , n. 3, p. 1–21, 2010.

ERUSAN, R. R.; NALINI, D.; MANOHAR, G.; MALATHI, R. Correlation between Obesity and Inflammation in Cardiovascular Diseases—Evaluation of Leptin and Inflammatory Cytokines. **Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases**, v. 2, p. 7–15, 2012.

FALUDI, A.; IZAR, M.; SARAIVA, J.; et al. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 1–76, 2017.

FARAH, C. S.; SALOME, C. M. Asthma and obesity: A known association but unknown mechanism. **Respirology**, v. 17, n. 3, p. 412–421, 2012.

FASS, R.; GASIOROWSKA, A. Refractory GERD: what is it? **Current Gastroenterology Reports**, v. 10, n. 3, p. 252–257, 2008.

FERREIRA, C. T.; VIEIRA, M. C.; VIEIRA, S. M. G.; et al. Eosinophilic esophagitis in 29 pediatric patients. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 45, n. 2, p. 141–146, 2008.

FOX, V. L.; NURKO, S.; FURUTA, G. T. Eosinophilic esophagitis: it's not just kid's stuff. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 56, n. 2, p. a126390, 2002.

FRANCIOSI, J. P.; HOMMEL, K. A.; DEBROSSE, C. W.; et al. Quality of life in paediatric eosinophilic oesophagitis: What is important to patients? **Child: Care, Health and Development**, v. 38, n. 4, p. 477–483, 2012.

FRANZIUS, D.; HOTH, M.; PENNER, R. Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 428, n. 5–6, p. 433–438, 1994.

FRAYN, K. N.; KARPE, F.; FIELDING, B. A.; MACDONALD, I. A.; COPPACK, S. W. Integrative physiology of human adipose tissue. **International Journal of Obesity**, v. 27, n. 8, p. 875–888, 2003.

- FRIESEN, C. A.; ANDRE, L.; GAROLA, R.; HODGE, C.; ROBERTS, C. Activated duodenal mucosal eosinophils in children with dyspepsia: a pilot transmission electron microscopic study. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 35, n. 3, p. 329–33, 2002.
- FUENTEBELLA, J.; PATEL, A.; NGUYEN, T.; et al. Increased number of regulatory T cells in children with eosinophilic esophagitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 283–289, 2010.
- FURUTA, G. T. Eosinophils in the esophagus: acid is not the only cause. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 26, n. 4, p. 468–71, 1998.
- FURUTA, G. T.; LIACOURAS, C. A.; COLLINS, M. H.; et al. Eosinophilic Esophagitis in Children and Adults: A Systematic Review and Consensus Recommendations for Diagnosis and Treatment. Sponsored by the American Gastroenterological Association (AGA) Institute and North American Society of Pediatric Gastroenterol. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1342–1363, 2007.
- GALLI, STEPHEN J; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 693–704, 2013.
- GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 108–15, 2001.
- GIRARD, J. P.; BERTRAND, J. Study of 2% solution of sodium cromoglycate in perennial rhinitis assessed by subjective and objective parameters. **Clinical allergy**, v. 5, n. 3, p. 301–309, 1975.
- GONÇALVES, L. O.; LOPES, M.; REZENDE, E. R. M. DE A.; SEGUNDO, G. R. S. Incidence of Childhood Eosinophilic Esophagitis in Central Brazil : How Many Are We Missing ? **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 28, n. 4, p. 241–245, 2018.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, P.; MÁRTINEZ-GONZÁLEZ, M. A.; HU, F. B.; et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17034, p. 1–18, 2017.
- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011.
- GUEVARA, J. P.; DUCHARME, F. M.; KEREN, R.; NIHTIANOVA, S.; ZORC, J. Inhaled corticosteroids versus sodium cromoglycate in children and adults with asthma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, n. 4, p. 1098–1099, 2006.
- GUILHERME, A.; VIRBASIU, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367–377, 2008.
- HARRIS, P. R.; WRIGHT, S. W.; SERRANO, C.; et al. Helicobacter pylori Gastritis in Children Is Associated With a Regulatory T-Cell Response. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 491–499, 2008.
- HARRIS, R. F.; MENARD-KATCHER, C.; ATKINS, D.; FURUTA, G. T.; KLINNERT, M.

D. Psychosocial dysfunction in children and adolescents with eosinophilic esophagitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 500–505, 2013.

HARTL, D.; KOLLER, B.; MEHLHORN, A. T.; et al. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 119, n. 5, p. 1258–66, 2007.

HEEK, M. VAN; COMPTON, D. S.; FRANCE, C. F.; et al. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 3, p. 385–390, 1997.

HEERASING, N.; LEE, S. Y.; ALEXANDER, S.; DOWLING, D. Prevalence of eosinophilic oesophagitis in adults presenting with oesophageal food bolus obstruction. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 244–247, 2015.

HILDEBRAND, K. A.; GALLANT-BEHM, C. L.; KYDD, A. S.; HART, D. A. The Basics of Soft Tissue Healing and General Factors that Influence Such Healing. **Sports Med Arthrosc Rev**, v. 13, n. 3, p. 136–144, 2005.

HILL, D. A.; DUDLEY, J. W.; SPERGEL, J. M. The Prevalence of Eosinophilic Esophagitis in Pediatric Patients with IgE-Mediated Food Allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 5, n. 2, p. 369–375, 2017.

HILL, D. A.; SPERGEL, J. M. The Immunologic Mechanisms of Eosinophilic Esophagitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 16, n. 2, p. 1–15, 2016.

HIRANO, I. Eosinophilic Esophagitis and Gastroesophageal Reflux Disease: There and Back Again. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 2, p. 99–101, 2011.

HIRANO, I.; MOY, N.; HECKMAN, M. G.; et al. Endoscopic assessment of the oesophageal features of eosinophilic oesophagitis: Validation of a novel classification and grading system. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 489–495, 2013.

HOGAN, S. P. Functional role of eosinophils in gastrointestinal inflammation. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 129–140, 2009.

HOGAN, S. P.; MISHRA, A.; BRANDT, E. B.; FOSTER, P. S.; ROTHENBERG, M. E. A critical role for eotaxin in experimental oral antigen-induced eosinophilic gastrointestinal allergy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6681–6686, 2000.

HOLEN, E.; ELSAYED, S. The effect of disodium cromoglycate (DSCG) on in vitro proliferation of CD4+, CD8+, and CD19+ cell populations derived from allergic and healthy donors. **Allergy**, v. 50, n. 3, p. 249–256, 1995.

HOSHINO, M.; NAKAMURA, Y. The effect of inhaled sodium cromoglycate on cellular infiltration into the bronchial mucosa and the expression of adhesion molecules in asthmatics. **European Respiratory Journal**, v. 10, n. 4, p. 858–865, 1997.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5091, p. 87–92, 1993.

- HRUZ, P.; STRAUMANN, A.; BUSSMANN, C.; et al. Escalating incidence of eosinophilic esophagitis: A 20-year prospective, population-based study in Olten County, Switzerland. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1349–1350, 2011.
- HU, B.; PHAN, S. H. Myofibroblasts. **Current Opinion Rheumatology**, v. 25, n. 1, p. 71–77, 2014.
- HU, F. B. Obesity and Mortality: Watch Your Waist, Not Just Your Weight. **Archives of internal medicine**, v. 167, n. 9, p. 875–876, 2007.
- HUANG, T. T.; DREWNOSKI, A.; KUMANYIKA, S.; GLASS, T. A. A systems-oriented multilevel framework for addressing obesity in the 21st century. **Preventing chronic disease**, v. 6, n. 3, p. 1–10, 2009.
- JAGSI, R.; JIANG, J.; MOMOH, A. O.; et al. B-cell activity is impaired in human and mouse obesity and is responsive to an essential fatty acid upon murine influenza infection. **Journal of immunology**, v. 192, n. 12, p. 4738–4752, 2017.
- JAMES, B. R.; TOMANEK-CHALKLEY, A.; ASKELAND, E. J.; et al. Diet-induced obesity alters dendritic cell function in the presence and absence of tumor growth. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 3, p. 1311–1321, 2012.
- JAMES, P. T.; LEACH, R.; KALAMARA, E.; SHAYEGHI, M. The Worldwide Obesity Epidemic. **Obesity Research**, v. 9, n. S11, p. 228S–233S, 2001.
- JENSEN, E. T.; KAPPELMAN, M. D.; MARTIN, C. F.; DELLON, E. S. Health-Care Utilization, Costs, and the Burden of Disease Related to Eosinophilic Esophagitis in the United States. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 5, p. 626–632, 2015.
- JIN, C.; FLAVELL, R. A. Innate sensors of pathogen and stress: Linking inflammation to obesity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 2, p. 287–294, 2013.
- JOSEFOWICZ, S. Z.; NIEC, R. E.; KIM, H. Y.; et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal Th2 inflammation. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 395–399, 2012.
- JUDD, L. M.; HEINE, R. G.; MENHENIOTT, T. R.; et al. Elevated IL-33 expression is associated with pediatric eosinophilic esophagitis, and exogenous IL-33 promotes eosinophilic esophagitis development in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 1, p. G13–G25, 2016.
- JYONOUCHI, S.; BROWN-WHITEHORN, T. A.; SPERGEL, J. M. Association of Eosinophilic Gastrointestinal Disorders with Other Atopic Disorders. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 85–97, 2009.
- JYONOUCHI, S.; SMITH, C. L.; SARETTA, F.; et al. Invariant natural killer T cells in children with eosinophilic esophagitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 44, n. 1, p. 58–68, 2014.
- KAGALWALLA, A. F.; SENTONGO, T. A.; RITZ, S.; et al. Effect of Six-Food Elimination Diet on Clinical and Histologic Outcomes in Eosinophilic Esophagitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, n. 9, p. 1097–1102, 2006.

KARAGIANNIDIS, C.; AKDIS, M.; HOLOPAINEN, P.; et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 6, p. 1425–1433, 2004.

KARLSSON, M. R.; RUGTVEIT, J.; BRANDTZAEG, P. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 12, p. 1679–88, 2004.

KASHYAP, M.; ROCHMAN, Y.; SPOLSKI, R.; SAMSEL, L.; LEONARD, W. J. Thymic Stromal Lymphopoietin Is Produced by Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 3, p. 1207–1211, 2011.

KELLY, T.; YANG, W.; CHEN, C. S.; REYNOLDS, K.; HE, J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 9, p. 1431–1437, 2008.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KHAN, S. Eosinophilic gastroenteritis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 19, n. 2, p. 177–198, 2005.

KIA, L.; HIRANO, I. Distinguishing GERD from eosinophilic oesophagitis: concepts and controversies. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 7, p. 379–86, 2015.

KIJIMOTO-OCHIAI, S. CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: A multidomain and multifunctional molecule. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 4, p. 648–664, 2002.

KIM, E. J.; CHOI, M.-R.; PARK, H.; et al. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 4, p. R78, 2011.

KIM, H. P.; VANCE, R. B.; SHAHEEN, N. J.; DELLON, E. S. The Prevalence and Diagnostic Utility of Endoscopic Features of Eosinophilic Esophagitis: A Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 9, p. 988–996, 2012.

KIMATA, H.; YOSHIDA, A.; ISHIOKA, C.; MIKAWA, H. Disodium cromoglycate (DSCG) selectively inhibits IgE production and enhances IgG4 production by human B cells in vitro. **Clinical and experimental immunology**, v. 84, p. 395–399, 1991.

KLINNERT, M. D.; SILVEIRA, L.; HARRIS, R.; et al. Health-related quality of life over time in children with eosinophilic esophagitis and their families. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 308–316, 2014.

KOMIYA, A.; NAGASE, H.; YAMADA, H.; et al. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. **Cellular Immunology**, v. 225, n. 2, p. 91–100, 2003.

KONDO, S.; KAGAMI, S.; KIDO, H.; et al. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. **J Am Soc.Nephrol**, v. 12, n. 1046–6673, p. 1668–1676, 2001.

KOTTYAN, L. C.; ROTHENBERG, M. Genetics of eosinophilic esophagitis. **Molecular Immunology**, v. 10, n. 3, p. 580–588, 2017.

KUSUNOKI, H.; TANIYAMA, Y.; OTSU, R.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. Anti-inflammatory effects of hepatocyte growth factor on the vicious cycle of macrophages and adipocytes. **Hypertension Research**, v. 37, n. 6, p. 500–506, 2014.

KUTTY, G. R.; DOWNS-KELLY, E.; CRISPIN, H. T.; PETERSON, K. A. Elevated Tryptase in EoE Is an Independent Phenomenon Associated with Extra-Esophageal Symptoms. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 64, n. 1, p. 152–157, 2019.

LANDRES, R. T.; KUSTER, G. G.; STRUM, W. B. Eosinophilic esophagitis in a patient with vigorous achalasia. **Gastroenterology**, v. 74, n. 6, p. 1298–1301, 1978.

LEE, D.; ALBENBERG, L.; COMPHER, C.; et al. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1087–1106, 2015.

LENSCHOW, D. J.; HUEI-TING SU, G.; ZUCKERMAN, L. A.; et al. Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 11054–11058, 1993.

LEONARD, W. J. TSLP: finally in the limelight. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 605–607, 2002.

LETNER, D.; FARRIS, A.; KHALILI, H.; GARBER, J. Pollen-food allergy syndrome is a common allergic comorbidity in adults with eosinophilic esophagitis. **Diseases of the Esophagus**, v. 31, n. 2, p. 1–8, 2018.

LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 5, p. 860–876, 2000.

LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I.; SAN MARTÍN-CLARK, O.; LORENZO, P. Role of sodium cromoglycate on analgesia, locomotor activity and opiate withdrawal in mice. **Psychopharmacology**, v. 107, n. 4, p. 595–600, 1992.

LIACOURAS, C. A.; FURUTA, G. T.; HIRANO, I.; et al. Eosinophilic esophagitis: updated consensus recommendations for children and adults. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 128, n. 1, p. 3–20.e6, 2011.

LIACOURAS, C. A.; SPERGEL, J. M.; RUCHELLI, E.; et al. Eosinophilic esophagitis: A 10-year experience in 381 children. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 12, p. 1198–1206, 2005.

LIEBERMAN, J. A.; ZHANG, J.; WHITWORTH, J.; CAVENDER, C. A randomized, double-blinded, placebo-controlled study of the use of viscous oral cromolyn sodium for the treatment of eosinophilic esophagitis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 120, n. 5, p. 527–531, 2018.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J.-P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 11, p. 676–689, 2016.

- LOCHEM, E. G. VAN; VELDEN, V. H. J. VAN DER; WIND, H. K.; et al. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. **Cytometry**, v. 60B, n. 1, p. 1–13, 2004.
- LORD, G. M.; MATARESE, G.; HOWARD, J. K.; et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 897–901, 1998.
- LUCENDO, A. J.; ARIAS, Á.; REZENDE, L. C. DE; et al. Subepithelial collagen deposition, profibrogenic cytokine gene expression, and changes after prolonged fluticasone propionate treatment in adult eosinophilic esophagitis: A prospective study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 5, p. 1037–1046, 2011.
- LUCENDO, A. J.; ARIAS, Á.; TENIAS, J. M. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: A systematic review with meta-analysis. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 113, n. 6, p. 624–629, 2014.
- LUCENDO, A. J.; MOLINA-INFANTE, J.; ARIAS, Á.; et al. Guidelines on eosinophilic esophagitis: evidence-based statements and recommendations for diagnosis and management in children and adults. **United European Gastroenterology Journal**, 23. Apr. 2017.
- LUCENDO, A. J.; SÁNCHEZ-CAZALILLA, M.; MOLINA-INFANTE, J.; et al. Transcultural adaptation and validation of the “Adult Eosinophilic Esophagitis Quality of Life Questionnaire” into Spanish. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v. 106, n. 6, p. 386–394, 2014.
- LUMENG, C.; KOLLENGODE, M.; NARULA, V.; et al. Visceral Adipose Inflammation in Obesity Is Associated with Critical Alterations in Tregulatory Cell Numbers. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16376, 2011.
- LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111–2117, 2011.
- LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. **Current protocols in pharmacology**, v. Chapter 5, n. Unit5.61, p. 1–21, 2012.
- MACKENZIE, S. H.; GO, M.; CHADWICK, B.; et al. Eosinophilic oesophagitis in patients presenting with dysphagia—a prospective analysis. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 28, n. 9, p. 1140–6, 2008.
- MAGGADOTTIR, S. M.; HILL, D. A.; RUYMANN, K.; et al. Resolution of acute IgE-mediated allergy with development of eosinophilic esophagitis triggered by the same food. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 5, p. 1487–1490, 2014.
- MALIK, V. S.; WILLETT, W. C.; HU, F. B. Global obesity: Trends, risk factors and policy implications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 13–27, 2013.
- MARTIN, N. T.; MARTIN, M. U. Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. **Nature Immunology**, v. 17, n. 2, p. 122–131, 2016.

- MASEK-HAMMERMAN, K.; NOCKA, K.; NUNEZ, A.; et al. Modulation of the IL-33/IL-13 Axis in Obesity by IL-13R α 2. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 4, p. 1347–1359, 2018.
- MASTERSON, J. C.; MCNAMEE, E. N.; HOSFORD, L.; et al. Local hypersensitivity reaction in transgenic mice with squamous epithelial IL-5 overexpression provides a novel model of eosinophilic oesophagitis. **Gut**, v. 63, n. 1, p. 43–53, 2012.
- MATHEU, P. P.; SEN, M.; CAHALAN, D. D.; PARKER, M. D. Generation of Bone Marrow Derived Murine Dendritic Cells for Use in 2-photon Imaging. **Journal of Visualized Experiments**, v. e773, n. 17, p. 1–3, 2008.
- MERVES, J.; MUIR, A.; MODAYUR CHANDRAMOULEESWARAN, P.; et al. Eosinophilic esophagitis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 112, n. 5, p. 397–403, 2014.
- METZ, C. N. Fibrocytes : a unique cell population implicated in wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 2003, p. 1342–1350, 2003.
- MIEHLKE, S. Clinical features of eosinophilic esophagitis. **Digestive Diseases**, v. 32, n. 1–2, p. 61–67, 2014.
- MISHRA, A.; BRANDT, E. B.; ROTHENBERG, M. E.; et al. An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis Find the latest version : An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 83–90, 2001.
- MISHRA, A.; HOGAN, S. P.; BRANDT, E. B.; MARC, E. IL-5 Promotes Eosinophil Trafficking to the Esophagus. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2464–2469, 2002.
- MISHRA, A.; ROTHENBERG, M. E. Intratracheal IL-13 induces eosinophilic esophagitis by an IL-5, eotaxin-1, and STAT6-dependent mechanism. **Gastroenterology**, v. 125, n. 5, p. 1419–27, 2003.
- MISHRA, A.; SCHLOTMAN, J.; WANG, M.; ROTHENBERG, M. E. Critical role for adaptive T cell immunity in experimental eosinophilic esophagitis in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 4, p. 916–924, 2006.
- MOAWAD, F. J. Eosinophilic Esophagitis Incidence and Prevalence. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics North of America**, v. 28, n. 1, p. 15–25, 2017.
- MOAWAD, F. J.; CHENG, E.; SCHOEPFER, A.; et al. Eosinophilic esophagitis : current perspectives from diagnosis to management. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1380, n. 1, p. 204–217, 2016.
- MOMBEINI, T.; ZAHEDPOURE-ANARAKI, M. R.; DEHPOUR, A. R. Effects of sodium cromoglycate on Iranian asthmatic subjects without exposure to any bronchoconstrictor agent. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 2, p. 549–557, 2012.

MOON, P.-D.; CHOI, I.-H.; KIM, H.-M. Naringenin suppresses the production of thymic stromal lymphopoietin through the blockade of RIP2 and caspase-1 signal cascade in mast cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 671, n. 1–3, p. 128–132, 2011.

MORI, M. A.; LIU, M.; BEZY, O.; et al. A systems biology approach identifies inflammatory abnormalities between mouse strains prior to development of metabolic disease. **Diabetes**, v. 59, n. 11, p. 2960–71, 2010.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. R113–R127, 2014.

MULDER, D. J.; MAK, N.; HURLBUT, D. J.; JUSTINICH, C. J. Atopic and non-atopic eosinophilic oesophagitis are distinguished by immunoglobulin E-bearing intraepithelial mast cells. **Histopathology**, v. 61, n. 5, p. 810–822, 2012.

NAMJOU, B.; MARSOLO, K.; CAROLL, R. J.; et al. Phenome-wide association study (PheWAS) in EMR-linked pediatric cohorts, genetically links PLCL1 to speech language development and IL5-IL13 to Eosinophilic Esophagitis. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 401, p. 1–12, 2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PUBCHEM DATABASE. 105878-73-7, SID=134992706, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/134992706> (accessed on Mar. 20, 2019). .

NETZER, N. C.; KÜPPER, T.; VOSS, H. W.; ELIASSON, A. H. The actual role of sodium cromoglycate in the treatment of asthma - A critical review. **Sleep and Breathing**, v. 16, n. 4, p. 1027–1032, 2012.

NIELSEN, R. G.; HUSBY, S. Eosinophilic oesophagitis: Epidemiology, clinical aspects, and association to allergy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 45, n. 3, p. 281–289, 2007.

NOEL, R. J.; PUTNAM, P. E.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophilic Esophagitis. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 9, p. 940–941, 2004.

NOTI, M.; WOJNO, E. D. T.; KIM, B. S.; et al. Thymic stromal lymphopoietin–elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1005–1013, 2013.

OOSTERHOUT, A. J. M. VAN; BLOKSMA, N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. **The European respiratory journal**, v. 26, n. 5, p. 918–32, 2005.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

PAPADOPOULOU, A.; KOLETZKO, S.; HEUSCHKEL, R.; et al. Management guidelines of eosinophilic esophagitis in childhood. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 107–118, 2014.

PARK, H. An Overview of Eosinophilic Esophagitis. **Gut and Liver**, v. 8, n. 6, p. 590–597, 2014.

PARK, H.; KIM, M.; KWON, G. T.; et al. A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice. **Molecular Carcinogenesis**, v. 51, n. 11, p. 869–880, 2011.

PATTARIN, L.; TRICHOT, C.; BOGIATZI, S.; et al. TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 5, p. 1529–1546, 2017.

PAWANKAR, R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. **The World Allergy Organization journal**, v. 7, n. 12, p. 1–3, 2014.

PEEK, E. J.; RICHARDS, D. F.; FAITH, A.; et al. Interleukin-10–Secreting “Regulatory” T Cells Induced by Glucocorticoids and β_2 -Agonists. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 105–111, 2005.

PEERY, A. F.; DELLON, E. S.; LUND, J.; et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1179–1187.e3, 2012.

PRASAD, G. A.; ALEXANDER, J. A.; SCHLECK, C. D.; et al. Epidemiology of Eosinophilic Esophagitis Over Three Decades in Olmsted County, Minnesota. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 10, p. 1055–1061, 2009.

PRASAD, G. A.; TALLEY, N. J.; ROMERO, Y.; et al. Prevalence and predictive factors of eosinophilic esophagitis in patients presenting with dysphagia: a prospective study. **The American journal of gastroenterology**, v. 102, n. 12, p. 2627–32, 2007.

PUNNONEN, J.; AVERSA, G.; COCKS, B. G.; et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells (B-cell differentiation/isotype switching/allergy). **Immunology**, v. 90, n. April, p. 3730–3734, 1993.

QUAN, T. E.; COWPER, S.; WU, S.; BOCKENSTEDT, L. K.; BUCALA, R. Circulating fibrocytes : collagen-secreting cells of the peripheral blood. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 2004, p. 598–606, 2004.

RAJAVELU, P.; RAYAPUDI, M.; MOFFITT, M.; MISHRA, A.; MISHRA, A. Significance of para-esophageal lymph nodes in food or aeroallergen-induced iNKT cell-mediated experimental eosinophilic esophagitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 7, p. G645–G654, 2012.

RAMALHO, R.; ALMEIDA, J.; BELTRÃO, M.; et al. Substance P antagonist improves both obesity and asthma in a mouse model. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 68, n. 1, p. 48–54, 2013.

RATNER, P. H.; EHRLICH, P. M.; FINEMAN, S. M.; MELTZER, E. O.; SKONER, D. P. Use of Intranasal Cromolyn Sodium for Allergic Rhinitis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 77, n. 4, p. 350–354, 2002.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S. J.; GLIMCHER, L. H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. **Immunology Today**, v. 21, n. 10, p. 479–483, 2000.

REZENDE, E. R. M. DE A.; BARROS, C. P.; YNOUE, L. H.; et al. Clinical characteristics and sensitivity to food and inhalants among children with eosinophilic esophagitis. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 47, p. 1–7, 2014.

RHIJN, B. D. V.; VERHEIJ, J.; SMOUT, A. J. P. M.; BREDENOORD, A. J. Rapidly increasing incidence of eosinophilic esophagitis in a large cohort. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2013.

RIEDER, F.; NONEVSKI, I.; MA, J.; et al. T-helper 2 Cytokines, Transforming Growth Factor β 1, and Eosinophil Products Induce Fibrogenesis and Alter Muscle Motility in Patients with Eosinophilic Esophagitis. **Gastroenterology**, v. 146, n. 5, p. 1266–1277, 2014.

RIVELLESE, F.; SUURMOND, J.; PAULIS, A. DE; et al. IgE and IL-33-mediated triggering of human basophils inhibits TLR4-induced monocyte activation. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 10, p. 3045–3055, 2014.

ROCHA, R.; VITOR, A. B.; TRINDADE, E.; et al. Omalizumab in the treatment of eosinophilic esophagitis and food allergy. **European Journal of Pediatrics**, v. 170, n. 11, p. 1471–1474, 2011.

ROCHMAN, M.; AZOUZ, N. P.; ROTHENBERG, M. E. Epithelial origin of eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 142, n. 1, p. 10–23, 2018.

ROSENBERG, C. E.; MINGLER, M. K.; CALDWELL, J. M.; et al. Esophageal IgG4 levels correlate with histopathologic and transcriptomic features in eosinophilic esophagitis. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 73, n. 9, p. 1892–1901, 2018.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 1, p. 11–29, 2004.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilic esophagitis: biology to therapy. **Gastroenterology**, v. 137, n. 4, p. 1238–1249, 2009.

ROTHENBERG, M. E. Molecular, genetic, and cellular bases for treating eosinophilic esophagitis. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1143–1157, 2015.

ROTHENBERG, M. E.; LUSTER, A. D.; LEDER, P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 19, p. 8960–8964, 1995.

ROTHENBERG, M. E.; MISHRA, A.; COLLINS, M. H.; PUTNAM, P. E. Pathogenesis and clinical features of eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 6, p. 891–894, 2001.

ROTHENBERG, M. E.; SPERGEL, J. M.; SHERRILL, J. D.; et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. **Nature Genetics**, v. 42, n. 4, p. 289–291, 2010.

ROVIEZZO, F.; SORRENTINO, R.; IACONO, V. M.; et al. Disodium cromoglycate inhibits asthma-like features induced by sphingosine-1-phosphate. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 626–635, 2016.

RUBINSTEIN, E.; CHO, J. Y.; ROSENTHAL, P.; et al. Siglec-F inhibition reduces esophageal eosinophilia and angiogenesis in a mouse model of eosinophilic esophagitis. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 53, n. 4, p. 409–16, 2011.

RUCHELLI, E.; WENNER, W.; VOYTEK, T.; KURT, B.; LIACOURAS, C. Severity of Esophageal Eosinophilia Gastroesophageal Reflux Therapy. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 2, n. 1, p. 15–18, 1999.

SAFRONEEVA, E.; COSLOVSKY, M.; KUEHNI, C. E.; et al. Eosinophilic oesophagitis: Relationship of quality of life with clinical, endoscopic and histological activity. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, n. 8, p. 1000–1010, 2015.

SAHU, N.; MORALES, J. L.; FOWELL, D.; AUGUST, A. Modeling Susceptibility versus Resistance in Allergic Airway Disease Reveals Regulation by Tec Kinase Itk. (J. Zimmer, Ed.) **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–9, 2010.

SAMPSON, H. A.; ANDERSON, J. A. Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 30, n. 1, p. S87–S94, 2000.

SATTAR, N.; XU, D.; MCKENZIE, A. N.; et al. Interleukin-33 Induces Protective Effects in Adipose Tissue Inflammation During Obesity in Mice. **Circulation Research**, v. 107, n. 5, p. 650–658, 2010.

SAWADA, A.; HASHIMOTO, A.; UEMURA, R.; et al. Association between endoscopic findings of eosinophilic esophagitis and responsiveness to proton pump inhibitors. **Endoscopy international open**, v. 7, n. 4, p. 433–439, 2019.

SCHAEFER, E. T.; FITZGERALD, J. F.; MOLLESTON, J. P.; et al. Comparison of Oral Prednisone and Topical Fluticasone in the Treatment of Eosinophilic Esophagitis: A Randomized Trial in Children. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 165–173, 2008.

SCHOEPFER, A. M.; SAFRONEEVA, E.; BUSSMANN, C.; et al. Delay in diagnosis of eosinophilic esophagitis increases risk for stricture formation in a time-dependent manner. **Gastroenterology**, v. 145, n. 6, p. 1230–1236, 2013.

SELB, R.; ECKL-DORNA, J.; NEUNKIRCHNER, A.; et al. CD23 surface density on B cells is associated with IgE levels and determines IgE-facilitated allergen uptake, as well as activation of allergen-specific T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 1, p. 290–299.e4, 2017.

SELL, H.; ECKEL, J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, n. 4, p. 366–370, 2010.

- SHAH, A.; KAGALWALLA, A. F.; GONSALVES, N.; et al. Histopathologic variability in children with eosinophilic esophagitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 104, n. 3, p. 716–721, 2009.
- SHAPIRO, G. G.; KÖNIG, P. Cromolyn sodium: a review. **Pharmacotherapy**, v. 5, n. 3, p. 156–170, 1985.
- SHERRILL, J. D.; GAO, P. S.; STUCKE, E. M.; et al. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, n. 1, p. 160–165.e3, 2010.
- SHERRILL, J. D.; KC, K.; WU, D.; et al. Desmoglein-1 regulates esophageal epithelial barrier function and immune responses in eosinophilic esophagitis. **Mucosal Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 718–729, 2014.
- SHUKLA, A.; MISHRA, A.; VENKATESHAIAH, S. U.; MURLI MANOHAR, C. P. M.; MISHRA, A. Elements Involved In Promoting Eosinophilic Gastrointestinal Disorders. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**, v. 6, n. 2, p. 265–286, 2016.
- SILVA, F. M. C.; OLIVEIRA, E. E.; GOUVEIA, A. C. C.; et al. Obesity promotes prolonged ovalbumin-induced airway inflammation modulating T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses in BALB/c mice. **Clinical and experimental immunology**, v. 189, n. 1, p. 47–59, 2017.
- SILVERSTEIN, A. M. Clemens freiherr von pirquet: Explaining immune complex disease in 1906. **Nature Immunology**, v. 1, n. 6, p. 453–455, 2000.
- SIMON, D.; CIANFERONI, A.; SPERGEL, J. M.; et al. Eosinophilic esophagitis is characterized by a non-IgE-mediated food hypersensitivity. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 71, n. 5, p. 611–620, 2016.
- SIMON, D.; MARTI, H.; HEER, P.; et al. Eosinophilic esophagitis is frequently associated with IgE-mediated allergic airway diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 90–92, 2005.
- SIMON, D.; RADONJIC-HÖSLI, S.; STRAUMANN, A.; YOUSEFI, S.; SIMON, H. U. Active eosinophilic esophagitis is characterized by epithelial barrier defects and eosinophil extracellular trap formation. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 70, n. 4, p. 443–452, 2015.
- SIRACUSA, M. C.; SAENZ, S. A.; HILL, D. A.; et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 229–233, 2011.
- SOKULSKY, L. A.; COLLISON, A. M.; NIGHTINGALE, S.; et al. TRAIL deficiency and PP2A activation with salmeterol ameliorates egg allergen-driven eosinophilic esophagitis. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 311, n. 6, p. 998–1008, 2016.
- SOOD, A.; SHORE, S. A. Adiponectin, Leptin, and Resistin in Asthma: Basic Mechanisms through Population Studies. **Journal of allergy**, v. 2013, p. 785835, 2013.

SOUMELIS, V.; RECHE, P. A.; KANZLER, H.; et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 673–680, 2002.

SOUZA, R. F.; HUO, X.; MITTAL, V.; SCHULER, C. M.; CARMACK, S. W. Gastroesophageal Reflux Might Cause Esophagitis Through a Cytokine-Mediated Mechanism Rather Than Caustic Acid Injury. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1776–1784, 2009.

SPECHLER, S. J.; GENTA, R. M.; SOUZA, R. F. Thoughts on the complex relationship between gastroesophageal reflux disease and eosinophilic esophagitis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, n. 6, p. 1301–1306, 2007.

SPERGEL, J.; ACEVES, S. S. Allergic components of eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 142, n. 1, p. 1–8, 2018.

SPERGEL, J. M. An allergist's perspective to the evaluation of Eosinophilic Esophagitis. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 29, n. 5, p. 771–781, 2015.

SPERGEL, J. M.; BEAUSOLEIL, J. L.; MASCARENHAS, M.; LIACOURAS, C. A. The use of skin prick tests and patch tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, n. 2, p. 363–368, 2002.

SPERGEL, J. M.; BEAUSOLEIL, J. L.; MASCARENHAS, M.; LIACOURAS, C. A. The use of skin prick tests and patch tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 109, n. 2, p. 363–368, 2002.

SPERGEL, J. M.; BOOK, W. M.; MAYS, E.; et al. Variation in prevalence, diagnostic criteria, and initial management options for eosinophilic gastrointestinal diseases in the United States. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 300–306, 2011.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973. 137: 1142-1162. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 1, p. 5–25, 2007.

STEVENS, G. A.; SINGH, G. M.; LU, Y.; et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. **Population Health Metrics**, v. 10, n. 1, p. 22–38, 2012.

STRAUMANN, A. Treatment of eosinophilic esophagitis: Diet, drugs, or dilation? **Gastroenterology**, v. 142, n. 7, p. 1409–1411, 2012.

STRAUMANN, A.; ACEVES, S. S.; BLANCHARD, C.; et al. Pediatric and adult eosinophilic esophagitis: Similarities and differences. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 67, n. 4, p. 477–490, 2012.

STRAUMANN, A.; BAUER, M.; FISCHER, B.; BLASER, K.; SIMON, H. U. Idiopathic eosinophilic esophagitis is associated with a T(H)2-type allergic inflammatory response. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 108, n. 6, p. 954–61, 2001.

STRAUMANN, A.; CONUS, S.; DEGEN, L.; et al. Budesonide is effective in adolescent and adult patients with active eosinophilic esophagitis. **Gastroenterology**, v. 139, n. 5, p. 1526–1537, 2010.

STRAUMANN, A.; SIMON, H. U. The physiological and pathophysiological roles of eosinophils in the gastrointestinal tract. **Allergy**, v. 59, n. 1, p. 15–25, 2004.

STRAUMANN, A.; SIMON, H. U. Eosinophilic esophagitis: Escalating epidemiology? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 2, p. 418–419, 2005.

STRAUMANN, A.; SPICHTIN, H. P.; GRIZE, L.; et al. Natural History of Primary Eosinophilic Esophagitis: A Follow-up of 30 Adult Patients for Up to 11.5 Years. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1660–1669, 2003.

SUN, S.; JI, Y.; KERSTEN, S.; QI, L. Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. **Annual Review of Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 261–286, 2012.

TALLEY, N. J.; SHORTER, R. G.; PHILLIPS, S. F.; ZINSMEISTER, A. R. Eosinophilic gastroenteritis: a clinicopathological study of patients with disease of the mucosa, muscle layer, and subserosal tissues. **Gut**, v. 31, n. 1, p. 54–58, 2007.

TANG, C.; ROLLAND, J. M.; WARD, C.; et al. Modulatory effects of alveolar macrophages on CD4+ T-cell IL-5 responses correlate with IL-1 β , IL-6, and IL-12 production. **European Respiratory Journal**, v. 14, n. 1, p. 106–112, 1999.

TANTIBHAEDHYANGKUL, U.; TATEVIAN, N.; GILGER, M. A.; MAJOR, A. M.; DAVIS, C. M. Increased esophageal regulatory T cells and eosinophil characteristics in children with eosinophilic esophagitis and gastroesophageal reflux disease. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 39, n. 2, p. 99–107, 2009.

TASCHE, M. J. A.; UIJEN, J.; BERNSEN, R.; JONGSTE, J. C.; WOUDE, J. C. VAN DER. Inhaled sodium cromoglycate in children with asthma. **Thorax**, v. 57, n. 8, p. 751–752, 2002.

TORDAY, J. S.; SUN, H.; WANG, L.; TORRES, E. Leptin Mediates the Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP) Paracrine Stimulation of Fetal Lung Maturation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 3, p. 405–410, 2002.

TRAVERS, J.; ROCHMAN, M.; CALDWELL, J. M.; et al. IL-33 is induced in undifferentiated, non-dividing esophageal epithelial cells in eosinophilic esophagitis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17563, 2017.

TRAVERS, J.; ROTHENBERG, M. E. Eosinophils in mucosal immune responses. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 3, p. 464–475, 2015.

UMETSU, D. T. Mechanisms by which obesity impacts upon asthma. **Thorax**, v. 72, n. 2, p. 174–177, 2017.

VALLE-DORADO, M. G.; SANTANA-GÓMEZ, C. E.; OROZCO-SUÁREZ, S. A.; ROCHA, L. The mast cell stabilizer sodium cromoglycate reduces histamine release and status epilepticus-induced neuronal damage in the rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 92, p. 49–55, 2015.

- VASILOPOULOS, S.; MURPHY, P.; AUERBACH, A.; et al. The small-caliber esophagus: An unappreciated cause of dysphagia for solids in patients with eosinophilic esophagitis. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 55, n. 1, p. 99–106, 2002.
- VEIGAS, L.; PEREIRA, P. C.; VICENTE, F.; MESQUITA, M. F. Overweight, Obesity and Abdominal Adiposity Effects in Inflammatory Proteins: C-reactive Protein and Fibrinogen. **Journal of Medical Sciences(Faisalabad)**, v. 12, n. 3, p. 70–77, 2012.
- VISSCHER, T. L. S.; SEIDELL, J. C. THE PUBLIC HEALTH IMPACT OF OBESITY. **Annual Review of Public Health**, v. 22, p. 355–375, 2001.
- VISSER, M.; BOUTER, L. M.; MCQUILLAN, G. M.; WENER, M. H.; HARRIS, T. B. Low-grade systemic inflammation in overweight children. **Pediatrics**, v. 107, n. 1, p. E13, 2001.
- VITELLAS, K. M.; BENNETT, W. F.; BOVA, J. G.; et al. Idiopathic eosinophilic esophagitis. **Radiology**, v. 186, n. 3, p. 789–793, 1993.
- VOOGHT, V. DE; CARLIER, V.; DEVOS, F. C.; et al. B-lymphocytes as key players in chemical-induced asthma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.
- WANG, J.; TOES, R. E. M. Mechanisms of oral tolerance revisited. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 2, p. 108, 2008.
- WATANABE, N.; HANABUCHI, S.; SOUMELIS, V.; et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. **Nature Immunology**, v. 5, n. 4, p. 426–434, 2004.
- WEISS, S. T. Obesity: Insight into the origins of asthma. **Nature Immunology**, 2005.
- WERSHIL, B. K. Exploring the Role of Mast Cells in Eosinophilic Esophagitis. **Immunology Allergy Clinical North American**, v. 29, n. 1, p. 189–195, 2009.
- WHELAN, K. A.; MUIR, A. B.; NAKAGAWA, H. Esophageal 3D Culture Systems as Modeling Tools in Esophageal Epithelial Pathobiology and Personalized Medicine. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 461–478, 2018.
- WHITEHEAD, G. S.; WALKER, J. K. L.; BERMAN, K. G.; FOSTER, W. M.; SCHWARTZ, D. A. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 1, p. 32–42, 2003.
- WILLS-KARP, M.; FINKELMAN, F. D. Untangling the Complex Web of IL-4-and IL-13-Mediated Signaling Pathways. **Scientific Signaling**, v. 1, n. 51, p. pe55, 2008.
- WINTER, H. S.; MADARA, J. L.; STAFFORD, R. J.; et al. Intraepithelial eosinophils: a new diagnostic criterion for reflux esophagitis. **Gastroenterology**, v. 83, n. 4, p. 818–823, 1982.
- WOLF, W. A.; JERATH, M. R.; SPERRY, S. L. W.; SHAHEEN, N. J.; DELLON, E. S. Dietary elimination therapy is an effective option for adults with eosinophilic esophagitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, n. 8, 2014.

WORKMAN, C. J.; SZYMCZAK-WORKMAN, A. L.; COLLISON, L. W.; PILLAI, M. R.; VIGNALI, D. A. A. **The Development and Function of Regulatory T Cells**. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2018- Monitoring Health for the SDG's (Sustainable development goals)**. 2018.

WU, L. C.; ZARRIN, A. A. The production and regulation of IgE by the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 247–259, 2014.

YAGI, R.; ZHU, J.; PAUL, W. E. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. **International Immunology**, v. 23, n. 7, p. 415–420, 2011.

YANG, Y.; LU, J. Y. L.; WU, X.; et al. G-protein-coupled receptor 35 is a target of the asthma drugs cromolyn disodium and nedocromil sodium. **Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 1–5, 2010.

YAZID, S.; SOLITO, E.; CHRISTIAN, H.; et al. Cromoglycate drugs suppress eicosanoid generation in U937 cells by promoting the release of Anx-A1. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 12, p. 1814–1826, 2009.

YE, J. Adipose Tissue Vascularization: Its Role in Chronic Inflammation. **Current Diabetes Reports**, v. 11, n. 3, p. 203–210, 2011.

YE, J.; MCGUINNESS, O. P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 5, p. 466–477, 2013.

YEN, E. H.; HORNICK, J. L.; DEHLINK, E.; et al. Comparative analysis of fc ϵ ri expression patterns in patients with eosinophilic and reflux esophagitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, n. 5, p. 584–592, 2010.

YING, S.; O'CONNOR, B.; RATOFF, J.; et al. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 174, n. 12, p. 8183–90, 2005.

YOKOOJI, T.; MATSUO, H. Sodium cromoglycate prevents exacerbation of IgE-mediated food-allergic reaction induced by aspirin in a rat model of egg allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 167, n. 3, p. 193–202, 2015.

YU, S.; STAHL, E.; LI, Q.; OUYANG, A. Antigen inhalation induces mast cells and eosinophils infiltration in the guinea pig esophageal epithelium involving histamine-mediated pathway. **Life Sciences**, v. 82, n. 5–6, p. 324–330, 2008.

ZHANG, T.; FINN, D. F.; BARLOW, J. W.; WALSH, J. J. Mast cell stabilisers. **European Journal of Pharmacology**, v. 778, p. 158–168, 2016.

ZUO, L.; FISCHETTI, C. A.; FINKELMAN, F. D.; et al. IL-13 Induces Esophageal Remodeling and Gene Expression by an Eosinophil-Independent, IL-13R 2-Inhibited Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p. 660–669, 2010.