



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

Efeitos do Glúten de Trigo em modelo de Colite Experimental

Penélope Lacrísio dos Reis Menta

Orientadora: Prof.^a Jacqueline Isaura Alvarez Leite

**Belo Horizonte-MG
Janeiro de 2018**

Penélope Lacrísio dos Reis Menta

Efeitos do Glúten de Trigo em modelo de Colite Experimental

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte-MG

2018

Dedico este trabalho ao meu companheiro de vida, meu amor e incentivador Jonas, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns quando busquei novos desafios. Com você tudo se tornou bem mais fácil, leve e prazeroso!

À minha mãe Marina pelo incentivo, carinho e cuidados em muitos momentos dessa trajetória e à minha filha Gabriela, quem me deu estímulo e para quem deixo meu exemplo de determinação e foco para que sirva de inspiração para a realização de seus objetivos.

Em primeiro lugar, agradeço ao universo, pela vida, pela oportunidade de aprender e por sincronizar todas as coisas no momento certo e por ter colocado pessoas tão maravilhosas no meu caminho!

À minha orientadora Jacque, não só pela orientação e enorme contribuição para o meu crescimento científico e profissional, mas principalmente pelo carinho com que me acolheu em sua família labiniana, pela confiança e estímulo contínuo. Obrigada por compartilhar seu tempo, conhecimento, sempre com dedicação, competência, alegria de ensinar e por ser um exemplo de mãe, mulher, parceira e orientadora que é! Além disso, obrigada por promover maravilhosos momentos (e bolos), sempre com disposição e satisfação por estar com a gente!

Ao Ed, pela idealização desse maravilhoso projeto e por todas as valiosas discussões, ensinamentos, disponibilidade, paciência e por todos os momentos divertidos que tivemos durante os experimentos.

Ao Dr. Valbert Cardoso e à Maria Emília, pelas análises de permeabilidade intestinal e translocação bacteriana. Além disso, ganhei uma amiga carismática e sempre disposta a ajudar!

Às doutoras Denise Carmona, pela análise histológica e Gleydes Gambogi, pela contribuição durante a análise das imagens de microscopia de transmissão.

Ao Dr. Luciano Capettini, pelas análises de imunofluorescência e por ter sempre uma boa ideia para compartilhar.

Ao Dr. Luciano Borges, por toda contribuição durante a fase de análise das imagens de microscopia de transmissão e por me orientar em relação aos complexos aspectos da biologia celular.

À Maria Helena, pelo cuidado com o biotério e nossos preciosos animais.

Ao Jamil, Chico, Anderson, Eneida e a todos os colegas dos outros laboratórios por terem me ajudado de alguma forma, emprestando equipamentos, ensinando técnicas e doando reagentes.

À Polly, por ter animado e iluminado com sua alegria os nossos dias no laboratório.

À Lana e Lorryne, que me receberam e me acolheram tão bem no início dessa trajetória.

À Paola, minha amiga de tanto tempo, por ter me levado ao LABiN, pela paciência em me ensinar as técnicas de laboratório, pelas trocas de pensamentos científicos e pelos momentos de alegria e brincadeiras que sempre tivemos e, claro, pelo nosso cross-comedy diário durante esses anos! Graduação, pós-graduação...o que será que vem agora? #tropadeelisa #ppgs.

Ao pessoal do laboratório: Ana Carolina, Danisão, Hirlis, Núbis, Wesley “Kbeça”, Simone “trucão”, Carol, Rachel Horta, Cristina, Luana, Ketllyn, Brenda, Marcos e Karine. Obrigada por todos os momentos especiais que passamos juntos!

À Fernanda Gandra, Rachel Bacha, e Elândia, por serem maravilhosas ouvintes em momentos importantes da minha vida. Além de companheiras de trabalho, se tornaram pessoas muito preciosas e queridas para mim e agradeço pela oportunidade de tê-las como amigas!

Aos bebês Victor, Bruna, Júlia e Melissa, por me darem a oportunidade de contribuir de alguma forma para o crescimento de vocês e por me ajudarem a encontrar o meu caminho. Sou muito grata a todos vocês! Estarão sempre em meu coração!

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Aos professores que compartilharam comigo seu conhecimento e contribuíram com a minha formação acadêmica e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, por sempre promover eventos científicos, abrir espaço para diálogo e dar apoio aos seus alunos.

A todos os meus amigos, de longe ou perto, que de certa forma, direta ou indiretamente, contribuíram e torceram para que tudo saísse bem.

À minha mãe linda, batalhadora, sempre do meu lado, cuidando com carinho e me encorajando a seguir em frente. Me ensinou a ser forte e a estar sempre pronta para os desafios da vida!

À Gaby, minha filha querida, de quem tenho muito orgulho por tudo que já conquistou e sei que ainda vai conquistar. Obrigada pelo estímulo e incentivo! #tamojunta!

Por último, ao meu marido Jonas, principal incentivador deste trabalho. Temos vivido momentos incríveis e eu agradeço todos os dias pela bênção de ter alguém tão especial caminhando comigo nesta jornada. Só tenho a agradecer por todo carinho, estímulo, companheirismo, dedicação, pelas conversas esclarecedoras sobre a vida e por me fortalecer a cada dia para que eu tome as melhores decisões sempre! Esta conquista é nossa!

“Escolhe um trabalho que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”

Confúcio, 551 a.C – 479 a.C

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 GLÚTEN DE TRIGO: DEFINIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA	18
2.2 DIGESTÃO E IMUNOGENICIDADE DO GLÚTEN	19
2.3 RECEPTOR CXCR3	26
2.4 EPITÉLIO INTESTINAL.....	27
2.5 TRANSPORTE E DIGESTÃO INTRACELULAR	30
<i>Vesículas do sistema endossomo/lisossomo.....</i>	<i>30</i>
2.6 PERMEABILIDADE INTESTINAL	32
2.7 TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	33
2.8 INFLUÊNCIA DO GLÚTEN NAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.....	35
<i>Retocolite Ulcerativa</i>	<i>36</i>
2.9 COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR DSS	37
3. JUSTIFICATIVA.....	39

4. OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVO GERAL	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
5.2 PREPARO DAS DIETAS.....	41
5.3 VERIFICAÇÃO DO CONSUMO HÍDRICO E DIETÉTICO	44
5.4 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO PONDERAL	44
5.5 ESCORE CLÍNICO	44
5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	45
5.7 PERFIL DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DO CÓLON	46
5.8 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	48
5.9 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	48
5.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	49
5.11 WESTERN BLOT	49
5.12 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	50
5.13 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR.....	51
5.14 MÉTODOS ESTATÍSTICOS DE TRATAMENTO DOS DADOS	53
6- RESULTADOS	54
6.1 CONSUMO ALIMENTAR, INGESTÃO HÍDRICA E PESO CORPORAL	54
<i>Consumo alimentar e ingestão hídrica</i>	54
<i>Peso corporal</i>	55
6.2 ESCORE CLÍNICO	55
6.3 COMPRIMENTO DO CÓLON	57

6.4 ESCORE HISTOPATOLÓGICO	58
6.5 PERFIL DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO	60
<i>Análise indireta de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos</i>	60
6.6 PERMEABILIDADE INTESTINAL	62
6.7. TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA	62
6.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	65
6.9 WESTERN BLOT	68
6.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	69
6.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	73
7. DISCUSSÕES	74
8. CONCLUSÃO	83
9. PERSPECTIVAS	84
10. APÊNDICE	85
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Composição das dietas ofertadas aos animais, baseadas em 1 kg de dieta padrão (AIN-93M) controle ou modificada com Farinha de trigo ou 4,5% de Glúten.....42
- Tabela 2.** Distribuição energética (% do valor calórico total) e densidade calórica das dietas padrão (AIN-93M) controle ou modificada com Farinha de trigo ou 4,5% de Glúten.....42
- Tabela 3.** Sistema de pontuação para análise comparativa de consistência das fezes e hemorragia intestinal.....44
- Tabela 4.** Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no cólon.....53

Lista de figuras

Figura 1. Imagens cintilográficas do trato gastrointestinal obtidas em gama câmara.....	20
Figura 2. Epítomos da gliadina.....	23
Figura 3: Mecanismos de liberação da zonulina, aumento de permeabilidade intestinal e indução de resposta autoimune por fragmentos de gliadina.....	25
Figura 4. Epitélio intestinal e complexo juncional.....	30
Figura 5. Etapas do transporte e digestão intracelular de moléculas.....	31
Figura 6. Vias de transporte celular.....	33
Figura 7. Vias de translocação bacteriana.....	34
Figura 8. Desenho experimental.....	43
Figura 9. Análise histológica do cólon.....	46
Figura 10. Ingestão calórica durante o experimento.....	54
Figura 11. Ingestão hídrica durante o experimento.....	54
Figura 12. Avaliação ponderal.....	55
Figura 13. Escore clínico.....	56
Figura 14. Comprimento do cólon.....	57
Figura 15. Escore histopatológico do cólon.....	58
Figura 16. Aspecto morfológico do cólon.....	59
Figura 17. Extensão da lesão do cólon.....	59
Figura 18. Análise do perfil inflamatório de células inflamatórias do cólon.....	61

Figura 19. Determinação da permeabilidade intestinal usando DTPA marcado com Tecnécio	62
Figura 20. Determinação da translocação bacteriana usando ^{99m} Tc- <i>Escherichia coli</i>	63
Figura 21. Determinação da translocação bacteriana e da concentração de ^{99m} Tc- <i>Escherichia coli</i>	64
Figura 22. Determinação da distância entre as células epiteliais do cólon.....	65
Figura 23. Microvilosidades do cólon.....	66
Figura 24. Estruturas citoplasmáticas do cólon.....	67
Figura 25. Expressão de proteínas do complexo juncional.....	68
Figura 26. Proteínas de junção de adesão por imunofluorescência: E-Caderina e β-Catenina.	70
Figura 27. Proteínas de junção de adesão por imunofluorescência: α-E-Catenina.....	71
Figura 28. Quantificação da expressão das proteínas de junção de adesão por imunofluorescência.....	72
Figura 29. Expressão gênica de proteínas de junção de adesão.....	73
Figura A (Apêndice).	85

Lista de abreviaturas e siglas

^{99m}Tc	Tecnécio 99m
$^{99m}\text{Tc-GLU}$	Glúten radiomarcado com tecnécio
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Tecnécio livre
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μmol	Micromol
ATI	“Amylase trypsin inhibitor”
BHT	Hidroxitolueno butilado
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
Caco-2	Linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano
CEBIO	Centro de bioterismo
CETEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
CCFA	“The Crohn's & Colitis Foundation of America”
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CXCR3	Receptor de quimiocina do tipo CXC
CXCL	Ligante de quimiocina do tipo CXC
CPM	Contagem por minuto
DC	Doença celíaca
DCR	Doença celíaca em remissão
DII	Doença inflamatória intestinal
DIG	Dieta isenta de glúten
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	“deoxynucleotide triphosphates”
DSS	“Dextran sulfate sodium”
DTPA	Ácido dietilenoaminopentacético
<i>E. Coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

EPO	Peroxidase de eosinófilos
FODMAPs	“Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides e Polyols”
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HCL	Ácido clorídrico
HETAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
HLA	Antígeno leucocitário humano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ICB	Instituto de ciências biológicas
IEC-6	Linhagem de célula epitelial intestinal de rato
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1-Beta
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
JA	Junção de adesão
JO	Junção de oclusão
L	Litro
kg	Quilograma
kcal	Quilocaloria
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar (mol por litro)
MBq	Mega becquerel
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma de peso
MIIC	compartimentos enriquecidos com MHC-II
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMLV	“Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”

MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator 88 de diferenciação mielóide
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-Acetilglucosaminidase
NC	Não celíaco
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NK	Natural Killer
OPD	Ortofenilenediamina
PBS	Salina tamponada com fosfato
pH	Potencial de hidrogênio
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RCU	Retocolite ulcerativa
rpm	Rotações por minuto
SDS	sodium dodecyl (lauryl) sulfate
SGNC	Sensibilidade ao glúten não celíaca
TLR2	Receptor do tipo Toll 2
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
Th1	Células T secretoras do padrão 1 de citocinas
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
tTG	Enzima transglutaminase tecidual
U/mg	Unidades por miligrama
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
ZO-1	Zonula Occludens 1

Resumo

Objetivos: Estudos demonstram que o glúten é apenas parcialmente digerido pelas enzimas do trato gastrointestinal, o que poderia levar ao acúmulo de resíduos potencialmente tóxicos na luz intestinal capazes de alterar a permeabilidade intestinal e afetar o sistema imunológico. Embora o glúten de trigo exerça efeitos no intestino, ainda não há estudos sobre seu papel quanto sua possível interferência na evolução da retocolite ulcerativa. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de uma dieta contendo glúten de trigo em um modelo experimental de colite, bem como avaliar quais são os mecanismos mediados por ele.

Metodologia: Camundongos C57BL/6 saudáveis ou com colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) foram alimentados com: dieta padrão (grupos Controle e Colite), dieta contendo 4,5% de glúten (Controle + Glúten ou Colite + Glúten) ou modificada com farinha de trigo (Controle + Farinha ou Colite + Farinha). A solução de DSS (1,5% p/v) foi utilizada em substituição à água do 7.º ao 15º dia de experimento. Foram realizadas análises de variação ponderal, escore clínico, escore histopatológico, análise indireta do perfil de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos), permeabilidade intestinal, translocação bacteriana, análise do complexo juncional e suas proteínas.

Resultados: A adição de glúten à dieta causou piora do escore clínico, aumento do recrutamento das células efetoras neutrófilos e eosinófilos, aumento da extensão da inflamação na mucosa intestinal, aumento da permeabilidade intestinal, aumento da translocação bacteriana, tanto pela via paracelular quanto transcelular. O mecanismo pelo qual o glúten exacerba a colite parece estar relacionado a alterações na junção de adesão e desmossomos, especialmente à proteína α -E-catenina, cuja consequência foi o comprometimento da localização das proteínas E-caderina, β -catenina e o enfraquecimento dos desmossomos. Também houve maior dano epitelial causado pelo glúten, com alteração das microvilosidades, maior quantidade de vacúolos digestivos e alteração do sistema endossomo/lisossomo.

Conclusão: Nossos resultados mostram que o glúten exerce efeito deletério na colite e seus mecanismos parecem estar relacionados a alterações na junção de adesão, desmossomos, nas microvilosidades e nas vesículas da rota endocítica.

Palavras-chave: glúten, gliadina, colite, junção de adesão, desmossomos, vesículas de transporte

Abstract

Objectives: Studies have shown that gluten is only partially digested by enzymes of gastrointestinal tract, which could lead to the accumulation of potentially toxic intestinal waste that can alter intestinal permeability and affect the immune system. Although wheat gluten exerts effects on the intestine, there are as yet no studies on its role in its possible interference with the evolution of ulcerative colitis. Thus, the objective of this work was to investigate the effects of a diet containing wheat gluten in an experimental model of colitis, as well as to evaluate what are the mechanisms mediated by it.

Methods: C57BL / 6 mice, healthy or with colitis induced by sodium dextran sulfate (DSS) were fed: standard diet (Control and Colitis groups), diet containing 4.5% gluten (Control + Gluten or Colitis + Gluten) or modified with wheat flour (Control + Flour or Colite + Flour). The DSS solution (1.5% w / v) was used instead of water from the 7th to the 15th day of the experiment. Analyzes of weight variation, clinical score, histopathological score, indirect analysis of the inflammatory cell profile (neutrophils, eosinophils and macrophages), intestinal permeability, bacterial translocation, analysis of the junctional complex and their proteins were performed.

Results: Gluten, specifically, caused worsening of the clinical score, increased recruitment of neutrophil and eosinophilic effector cells, increased intestinal mucosal inflammation, increased intestinal permeability, increased bacterial translocation, both by the paracellular and the transcellular pathways. The mechanism by which gluten exacerbated colitis appears to be related to changes in adhesion junction and desmosomes, especially the α -E-catenin protein, which resulted in compromising the localization of E-cadherin, β -catenin proteins and weakening of desmosomes. There was also greater epithelial damage caused by gluten, with alteration of microvilli, a greater amount of digestive vacuoles and alteration of the endosome/lysosome system.

Conclusion: Our results show that gluten specifically exerts a deleterious effect on colitis and its mechanisms seem to be related to changes in the adhesion junction, desmosomes, in microvilli and vesicles of the endocytic route.

Keywords: gluten, gliadin, colitis, adhesion junction, desmosomes, transport vesicles

1. Introdução

O glúten é um complexo proteico composto principalmente por gluteninas e prolaminas encontrados naturalmente na semente de muitos cereais, como cevada, centeio, aveia e trigo. É formado durante o processo de fabricação de produtos à base de farinha desses cereais como pães e bolos, quando as proteínas gliadinas e gluteninas são hidratadas ao se misturarem aos ingredientes líquidos da massa no processo de homogeneização mecânica (Bobbio e Bobbio, 2001). Estudos demonstram que o glúten é parcialmente digerido pelas enzimas do trato gastrointestinal, o que poderia levar ao acúmulo de resíduos potencialmente tóxicos à luz intestinal como a gliadina. A gliadina é a prolamina que compõe o glúten de trigo e é rica em glutamina e prolina (De Angelis *et al.*, 2006). O acúmulo de resíduos resultantes da má digestão do glúten também pode alterar o tempo de trânsito intestinal, inclusive em pessoas saudáveis. Esse fato favorece a multiplicação de bactérias patogênicas em detrimento de bactérias benéficas, levando ao estado de disbiose e consequente alteração da barreira intestinal, aumentando a pré-disposição à infecção e inflamação (Hawrelak e Myers, 2004; De Lorgeril e Salen, 2014; Tovoli *et al.*, 2015).

Um importante mecanismo de proteção contra injúrias intestinais é a barreira intestinal. A junção de oclusão intacta atua como principal barreira à passagem de macromoléculas e antígenos pelo intestino. Logo, a quebra da barreira intestinal pode contribuir para a passagem de microrganismos potencialmente patogênicos e corroborar no surgimento de inflamações intestinais. Há evidências de que a gliadina ativa uma via de sinalização por meio da liberação de um peptídeo intestinal, a zonulina, o que resulta em redução imediata da função de barreira, principalmente em pacientes intolerantes ao glúten, e em menor proporção, em indivíduos saudáveis (Drago *et al.*, 2006). Assim, sugere-se que a gliadina ou seus peptídeos aumentam a permeabilidade intestinal, através da alteração da junção de oclusão. Esse fato leva ao acesso de substâncias do conteúdo intestinal ao espaço submucoso intestinal, via paracelular, alcançando órgãos extraintestinais.

A adesão a uma dieta isenta de glúten é comumente recomendada para pacientes com doença celíaca, intolerância ao glúten ou alergia ao trigo, mas alguns estudos sugerem que a retirada do glúten da dieta também pode representar uma opção na

prevenção ou tratamento de doenças, tais como a artrite reumatoide (Hafström *et al.*, 2001), diabetes *mellitus* tipo 1 (Mojibian *et al.*, 2009), obesidade e resistência à insulina (Soares *et al.*, 2013), doença de Crohn, síndrome do intestino irritável e retocolite ulcerativa (Biesiekierski *et al.*, 2011; Herfarth *et al.*, 2014).

A retocolite ulcerativa (RCU) é um processo inflamatório crônico recidivante, restrito às camadas mucosa e submucosa do intestino grosso e que resulta de um desequilíbrio entre a microbiota intestinal, a integridade e função das células epiteliais intestinais e o sistema imunológico, levando a sintomas como febre, cólicas abdominais, diarreia, desidratação e hemorragias (Abraham, 2015).

Em modelos experimentais, a colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) apresenta manifestações clínicas semelhantes às apresentadas por pacientes com retocolite ulcerativa, mostrando ser um bom modelo para estudo desta doença (Okayasu *et al.*, 1990; Wirtz *et al.*, 2007).

Vários mecanismos têm sido propostos para esclarecer as causas da retocolite, incluindo resposta imune anormal a antígenos dietéticos, tais como o glúten (Hafström *et al.*, 2001; Vieira, Leonel, Sad, Beltrão, *et al.*, 2012; Herfarth *et al.*, 2014). No entanto, embora o glúten de trigo exerça efeitos no trato gastrointestinal, ainda não há estudos sobre seu papel quanto à uma possível interferência na evolução da RCU.

2. Revisão de Literatura

2.1 Glúten de trigo: definição e estrutura química

O glúten é um complexo proteico composto por gluteninas e prolaminas que se encontram naturalmente na semente de muitos cereais, como a cevada, o centeio, a aveia e o trigo, além dos cereais híbridos, como o triticale, ou em produtos derivados desses cereais, como o malte. No trigo, as proteínas representam cerca de 7 a 13% de seu peso total e as principais são a gliadina e glutenina, que juntas representam cerca de 85% das proteínas presentes (proporção de 1:1), além de albuminas e globulinas. As proteínas do glúten podem ser categorizadas de acordo com sua solubilidade, sendo as prolaminas os fragmentos polipeptídicos solúveis em álcool e as gluteninas a fração insolúvel. As prolaminas recebem diferentes denominações, de acordo com o tipo de cereal, sendo a gliadina a prolamina do trigo, a hordeína da cevada, a secalina do centeio e a avenina da aveia (Bobbio e Bobbio, 2001; Shewry *et al.*, 2002; Wieser, 2007).

O glúten é formado durante o processo mecânico de fabricação de produtos à base de farinha de trigo, como pães e bolos, quando as proteínas gliadinas e gluteninas são hidratadas. A ação da água permite que ocorra a mobilidade e agregação das moléculas, pois fornece íons que são fundamentais nas interações covalentes (ligações dissulfeto) e não covalentes (ligações de hidrogênio, iônicas e forças de Van der Waals) entre as proteínas. Essa interação entre as proteínas do glúten e os demais ingredientes líquidos da massa forma uma rede proteica ligada a grânulos de amido, que durante a panificação, retém o CO₂ produzido no processo fermentativo (Bobbio e Bobbio, 2001; Wieser, 2007).

A gliadina, que pertence à classe das prolaminas, é uma proteína de cadeia simples responsável pela consistência e viscosidade da massa e pouco resistente à extensão. Forma ligações intramoleculares dissulfeto e pode ser classificada de acordo com a ordem crescente de massa molecular em α , β , γ e ω -gliadina (15-60 KDa) (Wieser, 2007).

Já a glutenina, pertencente à classe das glutelinas, é uma proteína de cadeia ramificada e é responsável pela extensibilidade da massa. São agregados de proteínas ligadas por ligações intermoleculares dissulfeto devido à presença de cisteína nas

subunidades. Podem ser classificadas basicamente como de baixa ou alta massa molecular (Shewry *et al.*, 2002)

As propriedades das proteínas gliadina e glutenina são geralmente descritas como viscoelasticidade, que é o equilíbrio entre a elasticidade e extensibilidade da massa e a quantidade dessas proteínas é que determina sua qualidade final (Shewry *et al.*, 2002).

2.2 Digestão e imunogenicidade do glúten

Estudos demonstram que o glúten é apenas parcialmente digerido pelas enzimas pepsina, tripsina, elastase e quimiotripsina no trato gastrointestinal, o que poderia levar ao acúmulo de resíduos potencialmente tóxicos no lúmen. Durante a proteólise endoluminal do glúten, pode ocorrer a formação de resíduos ricos em glutamina (38%) e prolina (20%), presentes em peptídeos liberados da gliadina. A glutamina é o substrato preferencial de desaminação pela transglutaminase tecidual (tTG) intestinal. Esta enzima pode catalisar a ligação cruzada da gliadina, formando neoepítomos antigênicos (complexos gliadina-gliadina/gliadina-tTG) que podem iniciar resposta imune, especialmente em indivíduos susceptíveis geneticamente. A prolina confere ao peptídeo uma maior resistência à proteólise gastrointestinal, o que dificulta a efetiva absorção pelo intestino (De Angelis *et al.*, 2006; Mitea *et al.*, 2008).

Sabe-se que o glúten é digerido parcialmente pelas enzimas no trato gastrointestinal e o restante não absorvido pelo intestino delgado segue para o intestino grosso onde também pode exercer efeitos deletérios (Freire *et al.*, 2015). Freire *et al.*, 2015, em um estudo em que animais receberam glúten marcado com radionuclídeo tecnécio 99m ($^{99m}\text{TcGLU}$) por gavagem, observaram que 1h após administração de $^{99m}\text{TcGLU}$, parte do conteúdo ainda estava no estômago, outra parte havia sido absorvida e o restante permanecia na porção final do intestino delgado. Após 2 horas, a fração não absorvida alcançou o íleo e cécum e em 4h e 6h o glúten foi detectado exclusivamente no intestino grosso (cécum e cólon), representando então a fração não digerida ou não absorvida (Figura 1).

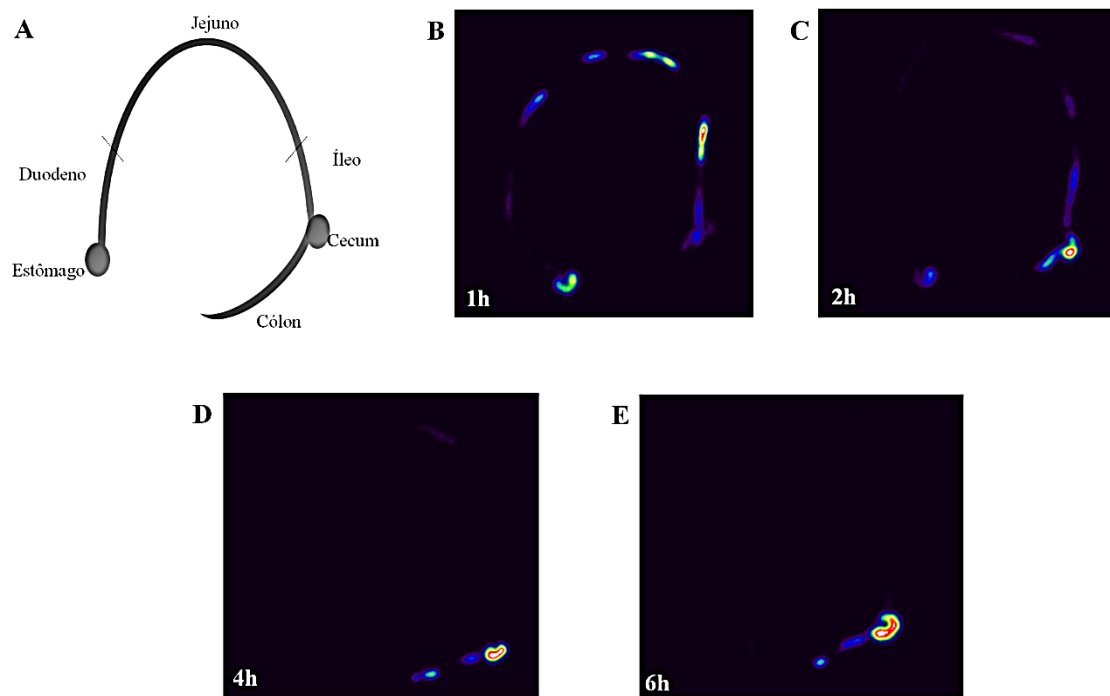


Figura 1. Imagens cintilográficas do trato gastrointestinal obtidas em gama câmara. (A): Figura esquemática representando a disposição do trato gastrointestinal usado para realização das imagens. (B-E): Imagens cintilográficas obtidas em gama câmara (NucleineT^MTH22, Hungria) realizadas 1h (B), 2h (C), 4h (D) e 6h (E) após gavagem de 5,5MBq ^{99m}Tc-GLU (n=2-3). Imagem cedida por Freire *et al.*, *Int J Obes (Lond)*:1-8 (2016).

O acúmulo de resíduos resultantes da má digestão do glúten também pode alterar o tempo de trânsito intestinal, inclusive em pessoas saudáveis, e favorecer a multiplicação de bactérias patogênicas em detrimento de bactérias benéficas, levando ao estado de disbiose e consequente alteração da barreira intestinal (Hawrelak e Myers, 2004; Volta *et al.*, 2013; De Lorgeril e Salen, 2014; Daulatzai, 2015; Tovoli *et al.*, 2015). O influxo de bactérias patogênicas no intestino altera a função da microbiota simbiótica, ou seja, a homeostase intestinal, aumentando a pré-disposição à infecção e inflamação. Esse fato pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças como alergias, obesidade, doença inflamatória intestinal e câncer de cólon. Além disso, a liberação de lipopolissacarídeos (LPS) por bactérias intestinais patogênicas devido à disbiose, afeta o sistema imunológico promovendo a síntese de citocinas pró-inflamatórias podendo resultar em inflamação sistêmica (Daulatzai, 2015).

Se por um lado a má digestão do glúten pode favorecer a disbiose, em contrapartida observa-se que uma dieta isenta de glúten pode acarretar menor ingestão de produtos derivados do trigo e, como consequência, menor consumo de fibras alimentares e polissacarídeos (De Palma *et al.*, 2009; Jackson, 2010). Frutanos são polissacarídeos fermentáveis presentes no trigo e que podem provocar sintomas gastrintestinais em pacientes com síndrome do intestino irritável. Assim, a retirada do glúten reduz também a ingestão de frutanos que interagem com a microbiota intestinal, diminuindo a fermentação e a produção de gases. Outras evidências também indicam que a retirada de FODMAPs (*Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides e Polyols*), carboidratos fermentáveis presentes no trigo, podem sobrepor-se a uma dieta livre de glúten para melhora dos sintomas de pacientes com síndrome do intestino irritável (Biesiekierski *et al.*, 2013).

Entretanto, estudo realizado por Sanz *et al.*, 2010, por meio de análise da microbiota fecal e ingestão dietética de 10 indivíduos, indicou que o número de bactérias intestinais saudáveis diminuiu (*Bifidobacterium, Bifidobacterium Longum e Lactobacillus*), enquanto o número de bactérias patogênicas aumentou (*Escherichia coli e Enterobacteriaceae*) após o seguimento de uma dieta isenta de glúten em paralelo à redução na ingestão de polissacarídeos. Esta evidência sugere uma ruptura do equilíbrio da microbiota intestinal (disbiose), o que pode favorecer o crescimento excessivo de patógenos oportunistas e enfraquecer as defesas do hospedeiro contra infecção e inflamação crônica através de possíveis alterações na imunidade da mucosa (Sanz, 2010). Ainda, uma dieta sem glúten também conduziu a uma redução significativa da produção de citocinas induzida por bactérias (TNF, IL-8, IFN- γ e IL-10) como resultado da redução da carga bacteriana total (De Palma *et al.*, 2009). Logo, embora haja evidências que o glúten possa alterar o equilíbrio da microbiota intestinal, mais estudos ainda são necessários a fim de esclarecer especificamente qual o seu papel na disbiose.

Além da gliadina, outras frações do trigo podem incluir os ATI's (inibidores de amilase-tripsina), uma família de até 17 pequenas proteínas homólogas capazes de formar trêmeros desencadeantes de sintomas de sensibilidade ou alergia (Schuppan e Zevallos, 2015). Em estudo realizado por Junker *et al.*, verificou-se que essas proteínas, altamente resistentes à proteólise intestinal, podem ser reconhecidas como estranhas pelo sistema imunológico e atuar como potentes indutores da resposta imune inata. Esses inibidores

ativam o complexo imune via receptor TLR4 de macrófagos, monócitos e células dendríticas, não apenas *in vitro*, mas também *in vivo* após desafio oral ou sistêmico, com implicações não só para a doença celíaca, mas também para outras doenças inflamatórias intestinais (Junker *et al.*, 2012).

Um recente estudo realizado por Zevallos *et al.*, 2017, caracterizou a atividade biológica de ATI's em vários alimentos e seus efeitos sobre a inflamação intestinal. Neste estudo, cereais que continham glúten tinham altas concentrações de ATI's que ativavam TLR4. Os ATI's ingeridos oralmente são em grande parte resistente às proteases e ao calor, e aumentam o risco de inflamação intestinal por ativação de células mielóides do sistema imune presentes no intestino (Zevallos *et al.*, 2017).

Há 3 tipos de condições clínicas principais relacionadas à ingestão de glúten: a doença celíaca (DC), autoimune e mediada pela resposta imune adaptativa; a alergia ao trigo, mediada por IgE; e a sensibilidade ao glúten não celíaco (SGNC), possivelmente mediada pela resposta imune inata. Independentemente da condição clínica, os mecanismos pelos quais o glúten atua nessas desordens parecem estar relacionados à gliadina (De Giorgio *et al.*, 2016).

A gliadina apresenta ao longo de sua estrutura pelo menos 50 epítomos com potencial citotóxico, imunomodulatório e de alteração de permeabilidade intestinal em seus peptídeos (Figura 2). A estimulação de células do sistema imunológico pela gliadina não se restringe apenas aos pacientes com DC, embora a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-13, IFN- γ , IL-23, IL-1 β e TNF, e consequente resposta inflamatória, sejam exacerbadas nesses pacientes (Lammers *et al.*, 2008; Sapone *et al.*, 2012; De Punder e Pruimboom, 2013).

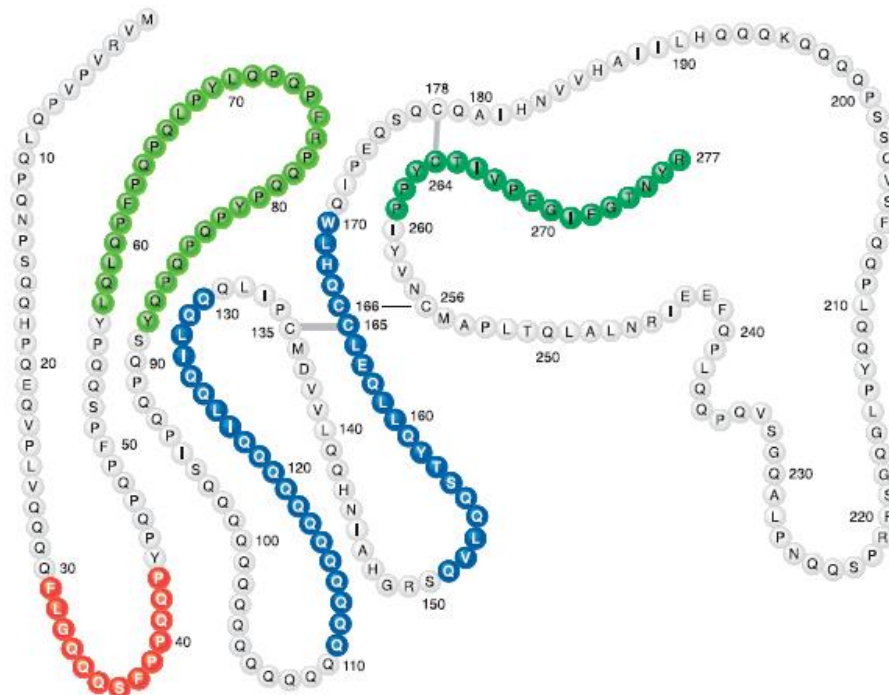


Figura 2. Epítopos da gliadina. Mapeamento da α -gliadina contendo peptídeos relacionados à atividade citotóxica (vermelho), à atividade imunomodulatória (peptídeo 33-mer, em verde claro), à liberação de zonulina e alteração da permeabilidade intestinal (em azul) e à liberação de IL-8 (verde escuro). Figura adaptada de Fasano, A. *Physiol Ver*, 91:151-175 (2011).

Há evidências de que a gliadina ativa uma via de sinalização por meio da liberação de um peptídeo intestinal, a zonulina, o que resulta em redução imediata da função da barreira intestinal, principalmente em pacientes intolerantes ao glúten, e em menores proporções em indivíduos saudáveis (Drago *et al.*, 2006). Em um estudo realizado por Lammers e cols., observou-se que a liberação da zonulina ocorre devido à interação da gliadina com a mucosa intestinal através da ligação ao receptor para quimiocinas CXCR3 (Lammers *et al.*, 2008). A liberação da zonulina para a luz intestinal e sua ligação a receptores nos enterócitos induz a polimerização dos filamentos de actina intracelulares que estão diretamente ligados à junção de oclusão (complexo proteico que possui papel fundamental no controle do transporte paracelular), resultando em alterações na morfologia, como reorganização do citoesqueleto e deslocamento da proteína Zonula Occludens 1 (ZO-1) e quebra da barreira intestinal, possibilitando a passagem da gliadina para o compartimento subepitelial. Assim, sugere-se que a gliadina ou seus peptídeos podem ter acesso ao espaço submucoso intestinal através da alteração da permeabilidade intestinal, podendo alcançar e influenciar outros sistemas do organismo (Drago *et al.*, 2006; Lammers *et al.*, 2008).

Outro estudo, realizado por Sander *et al.*, demonstrou que a gliadina aumenta a permeabilidade entre as células epiteliais intestinais Caco-2 por meio da reorganização dos filamentos de actina e da alteração da expressão de proteínas da junção de oclusão (Sander *et al.*, 2005). Desde então, vários estudos realizados por Fasano *et al.*, dentre outros pesquisadores, mostram que a gliadina se liga ao receptor de quimiocinas CXCR3 em células epiteliais intestinais IEC-6 e Caco-2, murinas e humanas, respectivamente, aumentando a liberação de zonulina. Embora os níveis de zonulina estejam mais aumentados em pacientes com DC, pacientes não-DC também apresentam aumento de zonulina ativado por gliadina, sugerindo que a gliadina pode aumentar a permeabilidade também em pacientes não-DC (Sander *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2006; Lammers *et al.*, 2008; Fasano, 2011; 2012).

Há indícios de que o aumento da permeabilidade intestinal precede o início da DC e não é apenas uma consequência da inflamação intestinal crônica, ou seja, há ativação dos mecanismos de imunidade inata pela gliadina precedentes à ativação da resposta imunitária adaptativa (Sander *et al.*, 2005; Fasano, 2011; 2012; De Punder e Pruimboom, 2013). O mecanismo proposto é que, após a ingestão oral, a gliadina interaja com a mucosa do intestino delgado causando liberação de IL-8 (interleucina 8) pelos enterócitos, levando ao imediato recrutamento de neutrófilos na lâmina própria. Ao mesmo tempo, outros peptídeos da gliadina levam ao aumento da permeabilidade intestinal através da indução da liberação de zonulina, permitindo a translocação paracelular da gliadina e sua posterior interação com macrófagos. Esta interação se dá através da ligação ao peptídeo 33-mer e a outros peptídeos imunomodulatórios, que iniciam a sinalização através de uma via dependente de MyD88, mas independente de TLR4 e TLR2 (receptores do tipo Toll 2 e 4), resultando numa resposta pró-inflamatória do tipo Th1, infiltração de células mononucleares na submucosa e produção de mediadores inflamatórios tais como TNF (fator de necrose tumoral) e IFN- γ (interferon gama). A presença persistente desses mediadores inflamatórios provoca novo aumento da permeabilidade intestinal, sugerindo que a ruptura inicial da barreira intestinal pode ser perpetuada pelo processo inflamatório após o acesso da gliadina à submucosa (Fasano, 2011). Parte deste mecanismo está apresentado na Figura 3.

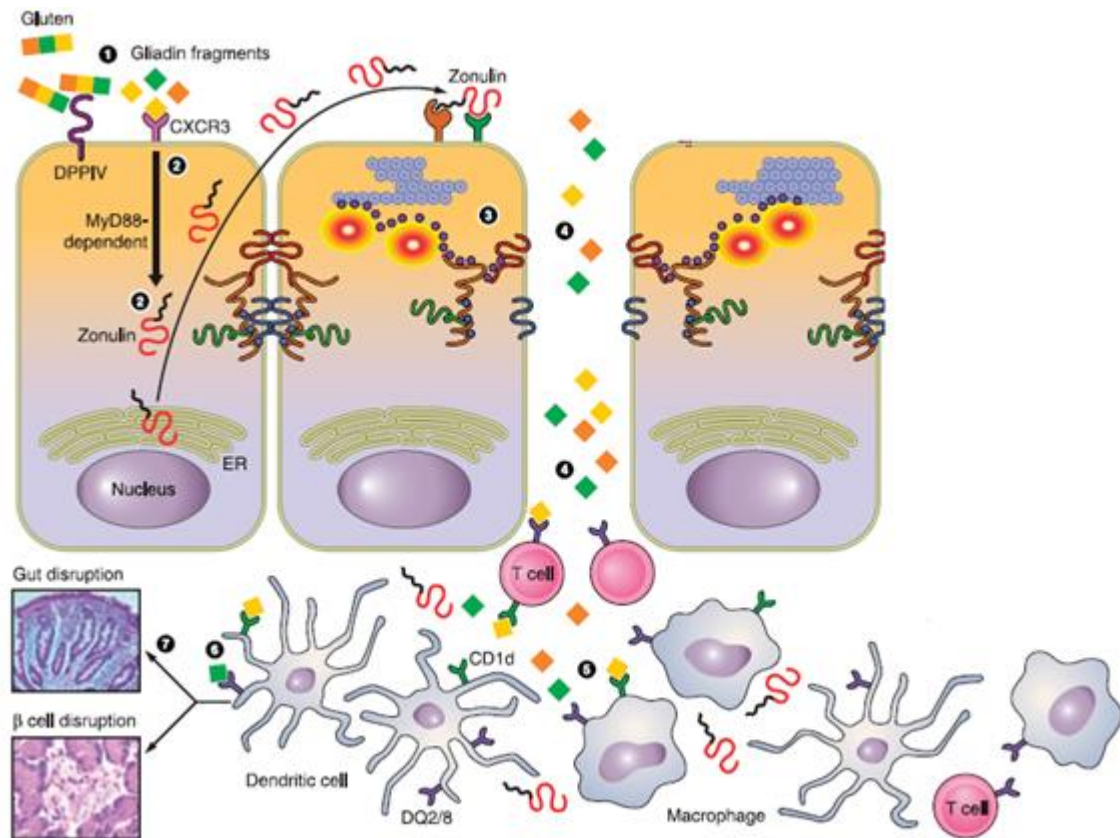


Figura 3: Mecanismos de liberação da zonulina, aumento de permeabilidade intestinal e indução de resposta autoimune por fragmentos de gliadina. Fragmentos de gliadina se ligam ao receptor CXCR3 da célula (1) e, por um mecanismo dependente de MyD88, induzem a liberação de zonulina (2). A zonulina circulante leva a alteração da junção de oclusão no intestino (3). O aumento da permeabilidade intestinal viabiliza a entrada de antígenos (incluindo a gliadina) pela lâmina própria (4) e a ligação em receptores HLA-DQ2/DQ8 em indivíduos geneticamente pré-dispostos (5). Inicia-se a resposta imune adaptativa (6-7). A resposta imune provoca danos na mucosa intestinal com atrofia das microvilosidades. ER (retículo endoplasmático). Figura adaptada de Fasano *et al.*, *A. Physiol Rev.*, 91:151-175 (2011)

No caso de indivíduos geneticamente predispostos, os fragmentos de gliadina se ligam aos receptores HLA DQ2 e DQ8 expressos nas células apresentadoras de antígenos e aumentam a ativação de linfócitos T, promovendo o desenvolvimento de resposta imune adaptativa e processo inflamatório no intestino e pâncreas, causando danos intestinais em pacientes com DC (Sapone *et al.*, 2012). Os enterócitos desses pacientes também passam a expressar maiores níveis de IL-15 (interleucina 15) que aumenta a atividade citotóxica dos linfócitos T citotóxicos (CD8) e aumenta a liberação de IFN- γ pelas células NK (Natural Killers) (Abadie e Jabri, 2014).

Em estudo realizado por Hollon *et al.*, 2015, com o objetivo de estudar se gliadina causa efeitos semelhantes em indivíduos não-celíacos, biópsias intestinais de quatro grupos diferentes foram expostas à gliadina: pacientes celíacos com doença ativa (DCA),

pacientes com doença celíaca em remissão (DCR), pacientes com sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) e os controles não-celíacos (NC). Neste estudo verificou-se que o aumento da permeabilidade intestinal após a exposição à gliadina pode ocorrer em todos os indivíduos, celíacos ou não-celíacos.

2.3 Receptor CXCR3

O glúten é digerido parcialmente pelas enzimas no trato gastrintestinal e dá origem a aminoácidos e proteínas como a gliadina. Para atravessar o epitélio intestinal, a gliadina se liga ao receptor CXCR3, um receptor de quimiocinas da família CXC que se liga a CXCL9, CXCL10 e CXCL11 e que está fortemente expresso na mucosa intestinal de pacientes com DII's, sugerindo que o eixo CXCR3 é importante na patogênese de DII's (Singh *et al.*, 2007; Chami *et al.*, 2014).

Os receptores CXCR3 não são expressos constitutivamente mas são induzidos de forma aguda pelo IFN- γ em células T, nas quais desempenha papel importante em sua função e tráfico, indicando um papel inflamatório de CXCR3. As células epiteliais e endoteliais, bem como uma vasta gama de células linfóides tais como células T de memória, células NK, células B, neutrófilos e monócitos, também expressam CXCR3 (Groom e Luster, 2011; Chami *et al.*, 2014).

Um estudo realizado por Chami *et al.*, investigou o papel do CXCR3 na progressão da colite induzida por 2,5% p/v de sulfato de sódio dextrano (DSS) em camundongos C57BL/6, fêmeas, *knockout* para o gene CXCR3. Neste estudo, houve atenuação da colite e co-relação com menor recrutamento de neutrófilos, bem como com a diminuição da produção de IL-6, TNF e IFN γ , sugerindo que o CXCR3 pode ser um alvo terapêutico para reduzir o influxo de células pró-inflamatórias no cólon inflamado (Chami *et al.*, 2014).

Considerando o importante papel do receptor CXCR3 durante o processo inflamatório na colite, especula-se se a inflamação no cólon não poderia ser exacerbada pela gliadina, já que ambos se ligam ao mesmo receptor. Isto porque já se sabe que a gliadina, ao se ligar à CXCR3, aumenta liberação do peptídeo intestinal zonulina que induz a polimerização dos filamentos de actina que estão diretamente ligados às proteínas de junção de oclusão, aumentando a permeabilidade entre as células intestinais. Além

disso, a gliadina induz a um maior recrutamento de neutrófilos para lâmina própria devido a liberação de IL-8 e à resposta pró-inflamatória do tipo Th1 (com produção de TNF e IFN- γ), comum em pacientes com DII's (Fasano, 2011).

2.4 Epitélio intestinal

Uma das principais características morfológicas do cólon é a existência de criptas em sua arquitetura. As criptas de *Lieberkühn* ou criptas intestinais são invaginações epiteliais na mucosa do intestino e que são responsáveis pela auto-renovação e proliferação celular deste tecido, já que nelas residem as células-tronco intestinais (Standring, 2010).

Seu epitélio de revestimento é cilíndrico simples composto por microvilosidades em sua parte apical. Os microvilos são prolongamentos digitiformes da membrana celular e são sustentadas por citoesqueleto polimerizado por proteína actina. O epitélio conta ainda com células caliciformes sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, o que lhe confere a produção e secreção de muco (Standring, 2010).

A união entre as células epiteliais da mucosa se dá por sistemas de adesões célula-célula as quais suportam boa parte do estresse mecânico gerado. Esse mecanismo é mantido por numerosas proteínas de adesão celular situadas nos pontos de contato entre duas células ou entre uma célula e a matriz extracelular, onde filamentos de actina que formam o citoesqueleto celular partem do citoplasma em direção a cada célula epitelial unindo-se a junções localizadas na membrana plasmáticas (Turner, 2006; Hartsock e Nelson, 2008; Standring, 2010). Essas junções compreendem o **Complexo Juncional** (Figura 4) que controla o tráfico paracelular de moléculas e é composto por três tipos de estruturas de vedação e adesão:

1) Junção de oclusão

O complexo de junção de oclusão (JO) é um conjunto de proteínas que forma uma barreira fisiologicamente ativa em células epiteliais, tanto do intestino delgado quanto do grosso, e que podem alterar a sua permeabilidade com base no ambiente celular. As principais proteínas da JO são as que compõem a família das claudinas, a ZO-1 (Zonula Occludens-1) e ocludina (Poritz *et al.*, 2007; Li, Li, *et al.*, 2015).

As claudinas são proteínas transmembranas divididas em dois grupos, de acordo com o tipo de função: As formadoras de barreira ou diminuição da permeabilidade paracelular (claudinas 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11, e 14), e as formadoras de poros ou que aumentam a permeabilidade paracelular (claudinas 2, 7, 12, e 15) (Das *et al.*, 2012)

A Zonula Occludens-1 (ZO-1) é uma proteína citoplasmática de suporte que está concentrada abaixo da membrana plasmática e que contém múltiplos domínios que unem um conjunto diversificado de proteínas de junção, como as claudinas e ocludinas. Um desses domínios é chamado PDZ (PDZ-1, PDZ-2 e PDZ-3) que exerce papel importante na ancoragem dessas proteínas de membranas aos componentes do citoesqueleto (Shawki e Mccole, 2017).

Já a ocludina é uma fosfoproteína transmembrana com quatro domínios que fazem a ligação do meio extracelular com o meio intracelular. Possui um longo domínio C-terminal citoplasmático e um N-terminal curto. O domínio C-terminal longo interage com proteínas intracelulares das junções de oclusão, como a ZO-1, necessária para a ligação de ocludina ao citoesqueleto de actina. A interação das alças extracelulares da ocludina com as células adjacentes cria uma barreira para macromoléculas, no entanto, pequenos íons conseguem atravessar. Estudos demonstram que há diminuição da expressão tecidual de ocludina em pacientes com DII's, reduzindo a integridade da barreira epitelial e possibilitando a passagem de bactérias e toxinas para o meio interno (Bruewer *et al.*, 2006; Shawki e Mccole, 2017).

Quando a junção de oclusão está intacta, ela atua como principal barreira à passagem de macromoléculas e antígenos. Logo, a quebra da barreira intestinal pode também contribuir para a passagem de antígenos, toxinas e microrganismos potencialmente patogênicos e corroborar no surgimento de inflamações intestinais e doenças sistêmicas (Júnior, 2006).

2) Junção de adesão

Está localizada abaixo da junção de oclusão e ancora as células através de filamentos de actina presentes no citoplasma. Mantém as células ligadas entre si formando um cinturão ao redor delas, unindo-as à várias células vizinhas. É constituída por proteínas da família das caderinas, que se conectam aos filamento de actina mediante proteínas ligadoras como as α e β -cateninas e vinculina (Thiery e Sleeman, 2006).

As caderinas são moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} pertencentes a uma grande famílias de proteínas caderinas, sendo algumas delas identificadas de acordo com a localização de onde são expressas, como a E-caderina (epitélio), N-caderina (músculo cardíaco), P-caderina (trofoblastos e pulmão), M-caderina (mioblastos e músculo esquelético) e R-caderina (células da glia). Possui um domínio extracelular onde interage com outra molécula na célula vizinha e um domínio citoplasmático, onde se liga a actina por meio de proteínas de ancoragem cateninas (α , β e γ), α -actinina e vinculina. Esse complexo de proteínas faz a ligação da caderina à actina e também tem papel importante na regulação da interação e controle da adesividade extracelular, além de serem fundamentais para a morfogênese, estabilidade e polaridade da célula (Bruewer *et al.*, 2006).

3) Desmossomos

Os desmossomos são junções intercelulares constituídas de duas placas circulares, uma em cada célula, compostas pelas proteínas desmogleínas e desmocolinas. Essas proteínas atravessam a membrana plasmática e se associam quando alcançam o espaço intercelular, mantendo as placas desmossômicas firmes e unidas. No interior da células, as desmogleínas e desmocolinas se unem a filamentos de queratina mediante interação com as proteínas desmoplaquinas e placoglobinas, ancorando firmemente o desmossomo em toda a estrutura da célula (Delva *et al.*, 2009).

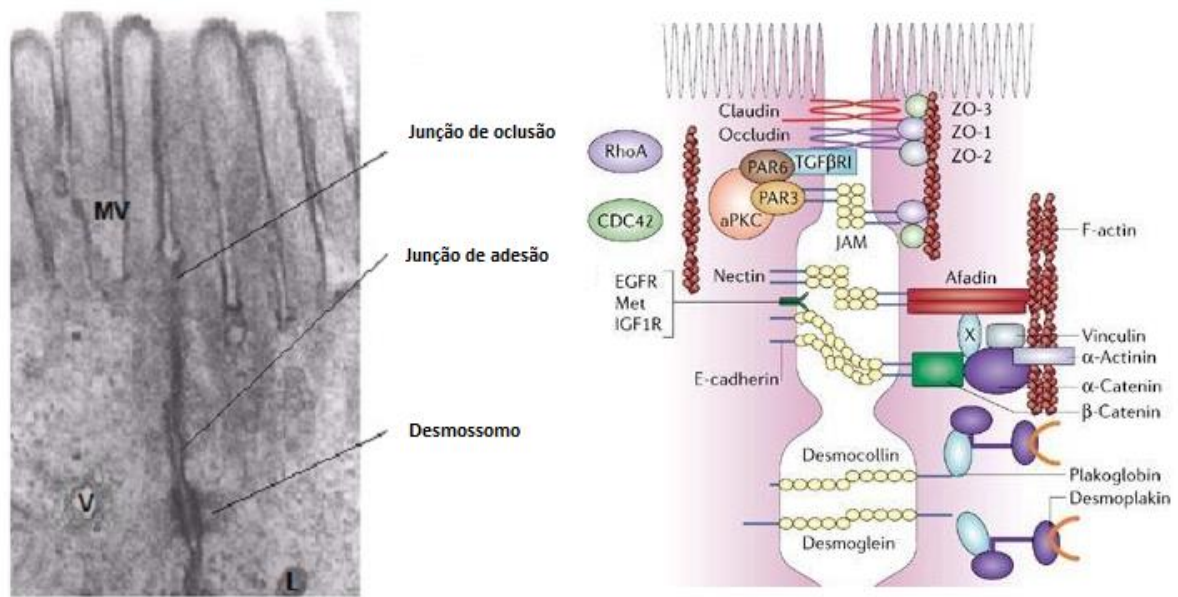


Figura 4. Epitélio intestinal e complexo juncional. (A) Epitélio intestinal por microscopia eletrônica de transmissão. (B) Complexo juncional. Abaixo das microvilosidades, as junções de oclusão (Tight junction) fazem a junção entre as células adjacentes formando uma barreira semipermeável entre o domínio apical e basolateral. As proteínas formadoras dessas junções são claudinas, ocludina e ZO-1, que interagem com os microfilamentos do citoesqueleto (F-actina e Miosina). Mais abaixo se encontram as proteínas das junções de adesão (Adherent junction): E-caderina, α -E-catenina, β -catenina, vinculina e actinina que interagem com F-actina. Desmossomos, que estão localizados abaixo da junção de adesão, são formados por interações entre desmogleína, desmocolina, desmoplaquina, placoglobinas e filamentos de queratina. MV: microvilosidades; V: vacúolos; L: lisossomos; JAM: molécula de adesão junctional (do inglês *Junctional adhesion molecule*); ZO: zonula occludens. Figura adaptada de Thiery, JP. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:2 (2006)

2.5 Transporte e digestão intracelular

Vesículas do sistema endossomo/lisossomo

O tráfego intracelular de moléculas é feito com o auxílio de vesículas do sistema endossomo/lisossomo (Fig. 5). Este sistema origina-se com pequenos vacúolos de endocitose, também conhecidos como vesículas de endocitose ou vacúolos digestivos. Esses vacúolos de endocitose internalizam macromoléculas para o interior da célula basicamente por meio de fagocitose (grandes partículas), pinocitose (gotículas líquidas ou pequenas partículas) ou por endocitose mediada por receptor (quando a partícula endocitada se liga a proteínas receptoras específicas da membrana celular). Há também as cavéolas, estruturas com função endocíticas e exocíticas, que fazem parte do sistema

de transcitose, que consiste no transporte de macromoléculas do interior da célula de um extremo a outro (Standing, 2010; Catelan, 2017).

O sistema endocítico se liga funcionalmente aos lisossomos, estruturas que apresentam membrana externa lipoprotéica e membrana interna revestida por glicoproteínas. Os lisossomos contêm hidrolases ácidas que processam e degradam materiais de origem externa (heterofagia) ou materiais internos que já estejam velhos ou danificados (autofagia) (Matte e Pasqualim, 2016).

As enzimas lisossômicas são produzidas no retículo endoplasmático rugoso, depois passam para o complexo de Golgi, onde são empacotadas e liberadas na forma de vesículas. Enquanto ainda não participam do processo de digestão, os lisossomos recém-formados são chamados de primários. Quando uma partícula de alimento é englobada, os lisossomos se fundem aos vacúolos endocíticos dando origem aos lisossomos secundários ou tardios (Cruvinel *et al.*, 2010; Matte e Pasqualim, 2016).

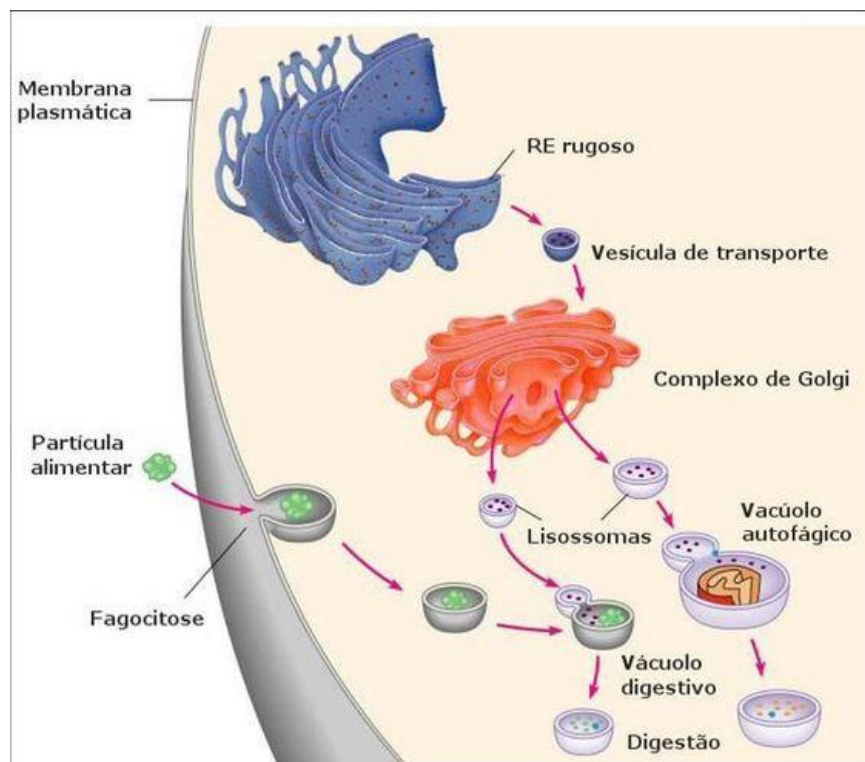


Figura 5. Etapas do transporte e digestão intracelular de moléculas. Substâncias fagocitadas ou estruturas da própria célula são englobadas por vacúolos digestivos ou autófagos, respectivamente, e se fundem aos lisossomos, cujas enzimas foram produzidas pelo retículo endoplasmático rugoso. Adaptado de Salsa, J. Cientic (2004).

2.6 Permeabilidade intestinal

Para interagir com as células do sistema imune, peptídeos de gliadina precisam ultrapassar a barreira intestinal por via paracelular, através do complexo juncional, ou por via transcelular, por meio de endocitose, introduzidas em vesículas (Fig. 6) (Ménard *et al.*, 2010).

Na via paracelular, sob condições fisiológicas, as estruturas do complexo juncional são altamente reguladas e permitem a passagem de íons e moléculas pequenas (<600 Da). No entanto, em condições patológicas, como nas DII's, a permeabilidade paracelular pode estar aumentada favorecendo a passagem de moléculas maiores ao longo da camada epitelial (Ménard *et al.*, 2010).

Já na via de transporte transcelular, em condições fisiológicas, moléculas maiores (> 600 Da), tais como antígenos alimentares e peptídeos, são englobadas pelas células epiteliais por endocitose ou por transcitose em direção à lâmina própria. Durante a endocitose, peptídeos ou proteínas inteiras são englobadas por vacúolos de endocitose, degradadas em lisossomos, completamente ou parcialmente, e liberadas sob a forma de aminoácidos ou produtos de degradação. Durante a transcitose, as moléculas são também englobadas por vacúolos de endocitose, se deslocam através do citoplasma, mas sem passar pelos lisossomos, e se fundem com a membrana citoplasmática onde serão exocitadas (Matte e Pasqualim, 2016).

Células do epitélio intestinal também podem produzir exossomos, que são estruturas vesiculares com características moleculares semelhantes às das vesículas apresentadoras de antígeno e que possuem compartimentos enriquecidos com complexo principal de histocompatibilidade MHC-II (MIIC). Nos exossomos os antígenos, inclusive provenientes da dieta, podem se ligar a MHC-II, se difundir pela membrana por transcitose e interagir com células imunes locais. Desta forma esses antígenos se tornam altamente imunogênicos e bem mais potentes que peptídeos livres (Ménard *et al.*, 2010).

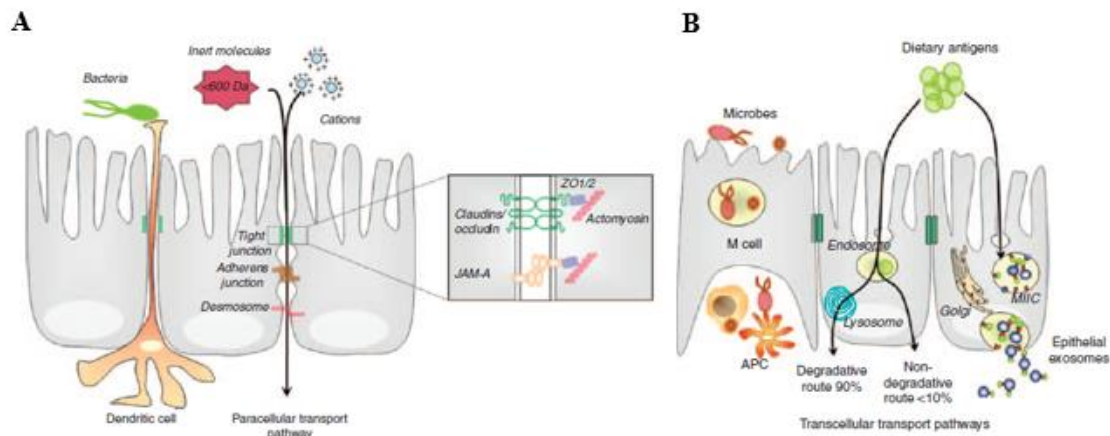


Figura 6. Vias de transporte celular. (A) Transporte paracelular: pequenas moléculas atravessam o complexo juncional (junção de oclusão, junção de adesão e desmosomo). (B) Transporte transcelular: grandes moléculas (>600Da) atravessam o epitélio intestinal em vacúolos endossômicos, onde são 90% degradados, ou em exossomos, que possuem compartimentos enriquecidos com complexo principal de histocompatibilidade MHC-II (MIIC). Figura adaptada de Menard *et al.*, Mucosal (2010).

Em condições fisiológicas a barreira da mucosa intestinal mantém um equilíbrio delicado entre a absorção de nutrientes essenciais, evitando a entrada de conteúdos prejudiciais. Nas DII's, as rupturas de elementos fundamentais da barreira intestinal levam a alterações na permeabilidade. Essas alterações podem levar a translocação bacteriana e exacerbam a resposta inflamatória do sistema imunológico subjacente, resultando posteriormente em danos aos tecidos. O fenótipo epitelial nas DII's ativas é muito semelhante na doença de Crohn e RCU e caracteriza-se por aumento da secreção de cloreto e água, levando à diarreia, aumento da permeabilidade através das rotas transcelulares e paracelulares e aumento da apoptose das células epiteliais (Salim e Soderholm, 2011; Piche, 2014).

2.7 Translocação bacteriana

A translocação bacteriana (TB) corresponde à passagem de moléculas, microrganismos, viáveis ou não, ou de seus produtos tóxicos através da mucosa intestinal até o interior da lâmina própria.

A TB pode acontecer por duas vias: na via paracelular, o comprometimento do complexo de junções celulares possibilitaria a passagem de microrganismos para o fígado, via sistema porta, que então atingiriam a circulação sistêmica e diversos órgãos

extra intestinais (Wiest e Rath, 2003); na via transcelular, microrganismos poderiam ser endocitados pelos enterócitos apicais, seguida de sua internalização por vacúolos citoplasmáticos e liberação para o sistema linfático com migração para os linfonodos mesentéricos e posteriormente para o ducto torácico onde alcançaria o sistema venoso e a circulação sistêmica (Figura 7) (Andrade et al., 2016).

Dentre os mecanismos indutores da TB estão o crescimento bacteriano exacerbado, imunossupressão, atrofia da mucosa e/ou aumento da permeabilidade intestinal. Na clínica, a translocação está relacionada aos processos inflamatórios, obstrução e/ou isquemia intestinal, administração de alimentação intravenosa por um longo período de tempo e às doenças inflamatórias intestinais, como na RCU, por exemplo. Nesses casos, os mecanismos de defesa estão deficientes e favorecem a entrada e sobrevivência de bactérias em sítios extra-intestinais. Em condições fisiológicas, a fagocitose das bactérias translocadas ocorre antes que possam alcançar o fígado, via sistema porta (via paracelular) ou os linfonodos mesentéricos (via transcelular) (Andrade, 2016; Wang *et al.*, 2018).

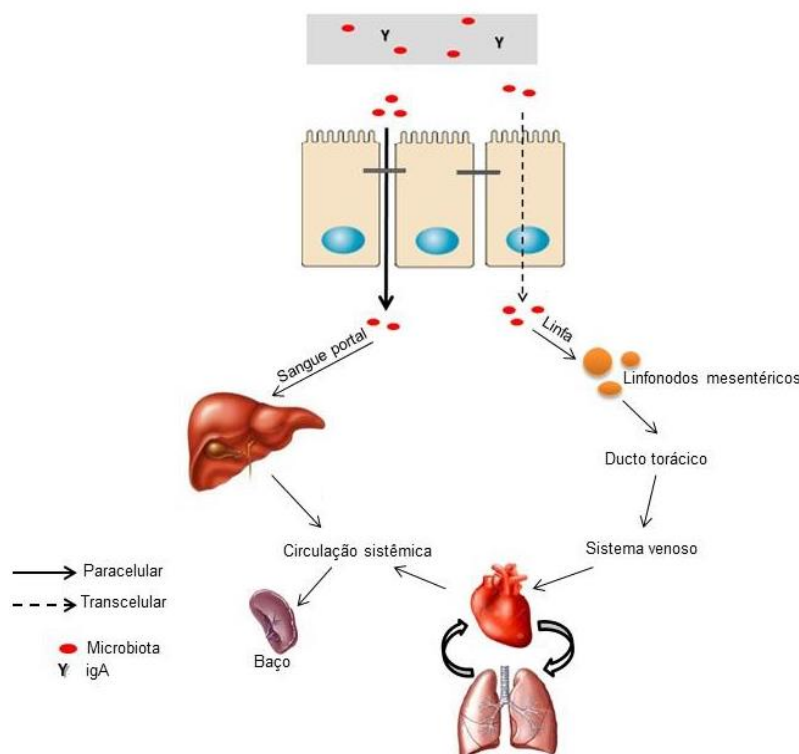


Figura 7. Vias de translocação bacteriana. Em condições patológicas, a fagocitose das bactérias translocadas ocorre através da via paracelular, alcançando o fígado via sangue portal, ou transcelular, alcançando o sistema venoso, via linfonodos mesentéricos e ducto torácico. Imagem cedida por (Andrade, 2016).

2.8 Influência do glúten nas doenças inflamatórias intestinais

A doença celíaca (DC) e as doenças inflamatórias intestinais (DIIs), incluindo a RCU e doença de Crohn, compartilham sintomas comuns e podem ter fatores genéticos que, ao interagirem com fatores ambientais, desencadeiam resposta imunológica descontrolada, provocando inflamação crônica intestinal. A adesão a uma dieta isenta de glúten é comumente recomendada para pacientes com doença celíaca, alergia ao trigo ou SGNC, mas alguns estudos sugerem que a retirada do glúten da dieta também pode representar uma opção na prevenção e/ou tratamento de doenças, tais como as DIIs (Biesiekierski *et al.*, 2011; Herfarth *et al.*, 2014; De Giorgio *et al.*, 2016; Zevallos *et al.*, 2017).

Os primeiros relatos associado DII e glúten, na ausência de doença celíaca, datam de meados da década de 1970 (Cooper *et al.*, 1976). Os primeiros casos clínicos publicados descrevem um pequeno número de mulheres, não celíacas, apresentando sintomas compatíveis com DII de longa data, tais como dor abdominal, desconforto, inchaço, hábito intestinal alterado e fadiga. Com várias opções fracassadas de tratamento, uma experimentação empírica de uma dieta isenta de glúten levou a uma notável melhora dos sintomas clínicos, com subsequente recaída após a sua reintrodução na dieta.

Mais recentemente (2012), através de um consenso, nova nomenclatura para condição clínica denominada sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) foi definida com base nos sintomas relacionados ao glúten para classificar os pacientes que apresentam os mesmos sintomas de DC, mas que os mecanismos alérgicos e autoimunes da DC tenham sido excluídos e que apresentam histopatologia duodenal normal (Sapone *et al.*, 2012). No entanto, há indícios de que outros componentes do trigo, como FODMAPs e ATI's (inibidores de tripsina e α -amilase), sejam causadores dos sintomas em pacientes com SGNC (Biesiekierski *et al.*, 2013; Fasano *et al.*, 2015). Ainda assim, pacientes com DII, não celíacos, não alérgicos ao trigo e que também não se enquadram no diagnóstico de SGNC, descrevem substancial melhora de seus sintomas com a retirada do glúten da dieta (Herfarth *et al.*, 2014; Aziz, Hadjivassiliou, *et al.*, 2015).

Retocolite Ulcerativa

A retocolite ulcerativa (RCU) é uma doença inflamatória intestinal (DII) crônica recidivante, restrita às camadas mucosa e submucosa do intestino grosso, que geralmente tem início no reto e se estende ao longo do cólon na direção cranial, podendo comprometer todo o cólon ou parte deste (Marchesi *et al.*, 2007). Seu processo inflamatório é resultado de um desequilíbrio entre a microbiota intestinal, a integridade e função das células epiteliais intestinais e o sistema imunológico, levando a sintomas como febre, cólicas abdominais, diarreia, desidratação e hemorragias que podem persistir por dias a meses, antes de regredir (Abraham, 2015). Estudos anteriores também já demonstraram que alterações nas proteínas da junção de oclusão podem ser uma das causas das alterações da barreira epitelial na RCU (Schmitz *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2014; Li, Li, *et al.*, 2015). Entretanto, nenhum estudo avaliou se o glúten, especificamente, poderia aumentar a permeabilidade dessas junções no cólon e contribuir para piora do processo inflamatório na RCU.

Uma pesquisa transversal dentro da coorte *CCFA Partners (The Crohn's & Colitis Foundation of America - CCFA)*, realizada via Internet, envolvendo 1.647 pacientes com DII, incluindo RCU, foi realizada para se avaliar a experiência desses pacientes ao seguirem uma dieta isenta de glúten (DIG), especialmente em relação a melhora dos sintomas. Desses, 4,9% tiveram um diagnóstico auto-referido de SGNC e 0,6% com DC; 314 (19,1%) relataram uso anterior ou atual de uma DIG, sendo que 206 (65,6%) destes descreveram uma melhora em pelo menos um dos sintomas intestinais. Para os pacientes que ainda seguiam uma DIG, a adesão foi considerada excelente (41,5%), média (34,1%) e baixa (24,4%). Ressalta-se que a prevalência de uma DIG entre os indivíduos sem DC nos Estados Unidos atual é de 0,5%. A alta prevalência (19,1%) de uma DIG na coorte desses pacientes sugere um papel potencial desta dieta na gestão terapêutica adjuvante de subgrupos de pacientes com DII (Herfarth *et al.*, 2014).

Recente estudo realizado por Limketkai *et al.*, avaliou a prevalência de sensibilidade ao glúten na doença inflamatória intestinal e seus fatores associados. Dos 102 pacientes com DII, 46 tinham retocolite ulcerativa, sendo que desses, 27,3% relataram sensibilidade ao glúten. Os sintomas comuns incluíram fadiga, dor abdominal, diarreia, inchaço e hematoquesia. Ao avaliar os fatores relacionados às DII's,

sensibilidade ao glúten foi associada à crises recentes, estenose em pacientes com doença de Crohn e manifestações dermatológicas (Limketkai *et al.*, 2017).

Embora alguns estudos demonstrem associação do glúten à piora de sintomas nas DII's, maior aprofundamento da investigação sobre os possíveis mecanismos mediados por ele no agravamento da inflamação intestinal, especialmente na RCU, ainda é necessário (Herfarth *et al.*, 2014; Aziz, Branchi, *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2015).

2.9 Colite experimental induzida por DSS

Em modelos experimentais, a colite induzida por DSS apresenta manifestações clínicas semelhantes às apresentadas por pacientes com RCU, como perda de peso, dor abdominal, diarreia sanguinolenta, encurtamento do cólon, altas taxas de apoptose celular, alteração de células e marcadores inflamatórios, tanto *in situ* quanto plasmáticos, mostrando ser um bom modelo para estudo desta doença (Okayasu *et al.*, 1990; Wirtz *et al.*, 2007).

Embora o mecanismo de indução da colite pelo polímero de DSS ainda não esteja completamente compreendido, sua administração na água potável de camundongos parece ser diretamente tóxico para células epiteliais das criptas basais do cólon, causando ulcerações e infiltrações de granulócitos e afetando a integridade da barreira mucosa (Poritz *et al.*, 2007; Wirtz *et al.*, 2007). O modelo com duração da administração de DSS por 7 dias é um processo agudo, particularmente útil para estudar a contribuição de mecanismos imunes inatos da colite. Para camundongos C57BL/6, uma concentração de DSS de 2% (p/v) ou mais em água potável, durante 7 dias, induz forte colite (Wirtz *et al.*, 2007). No entanto, baseado neste modelo, protocolo utilizando a concentração de 1,5% (p/v) pelo mesmo período de tempo demonstrou ser eficaz para indução de colite com moderada inflamação e baixas taxas de mortalidade (Andrade *et al.*, 2015).

A avaliação de parâmetros biológicos é importante para se caracterizar o desenvolvimento e a progressão da colite induzida por DSS e é comumente realizada a fim de se certificar de que a dose e o tempo de tratamento foram suficientes e que o modelo experimental está adequado (Wirtz *et al.*, 2007). Em comparação aos animais saudáveis, é esperado que animais com colite induzida por DSS apresentem menor ganho

ou perda de peso, piora do escore clínico, alterações histopatológicas importantes como perda da integridade da mucosa e depleção de células caliciformes e maiores atividades das enzimas N-acetilglicosaminidase (NAG), mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), importantes indicadores da infiltração de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, respectivamente (Vieira, Leonel, Sad, Beltrao, *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2015).

3. Justificativa

Vários mecanismos têm sido propostos para esclarecer as causas da retocolite ulcerativa (RCU), incluindo resposta inflamatória inapropriada à patógenos, autoimunidade e resposta imune anormal a antígenos dietéticos, como o glúten, por exemplo (Biesiekierski *et al.*, 2011; Herfarth *et al.*, 2014; Abraham, 2015).

As doenças inflamatórias intestinais (DII) podem surgir em qualquer fase da vida, mas normalmente surgem entre 15 e 35 anos, com maior incidência na população de origem caucasiana (Pallis *et al.*, 2004; Farrukh e Mayberry, 2014). Estudos epidemiológicos mostram aumento da incidência de RCU, inclusive no Brasil, e que há forte influência de fatores ambientais, incluindo a exposição ao cigarro, dietas inadequadas, uso de contraceptivos orais e agentes anti-inflamatórios não esteroidais (Danese e Fiocchi, 2006; Farrukh e Mayberry, 2014). Estudo realizado por Victoria *et al.*, na região oeste do estado de São Paulo, demonstrou que no período de 1986 a 1990 a incidência de RCU era de 0,74 casos/100.000 habitantes e em 2005 aumentou para 4,48 casos/100.000 habitantes (Victoria *et al.*, 2009). Embora a incidência ainda seja considerada baixa, espera-se um grande aumento de casos de DII nos próximos 20 anos (Farrukh e Mayberry, 2014). Logo, é necessário que haja avanços no sentido de se desenvolverem estratégias para se obter uma abordagem terapêutica mais segura e eficiente quanto ao tratamento de pacientes com RCU.

Embora o glúten de trigo exerça efeitos no trato gastrointestinal, ainda não há estudos sobre sua possível interferência na gênese ou evolução da retocolite ulcerativa.

A nossa hipótese é que o glúten tenha efeitos negativos na colite, causando aumento dos aspectos relacionados à inflamação, danos à mucosa e enfraquecimento do complexo juncional.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do glúten de trigo em modelo de colite experimental induzida por DSS em camundongos C57BL/6, determinando os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a intensidade da colite em animais C57BL/6 tratados com dieta padrão ou modificada com glúten, através de sinais clínico-histológicos;
- Avaliar a ação do glúten na permeabilidade da mucosa intestinal após a indução da colite;
- Avaliar a interferência do glúten na translocação bacteriana;
- Avaliar as mudanças no perfil imunológico típico da colite induzida por DSS secundárias à administração de glúten em animais C57BL/6;
- Avaliar a ação do glúten na mucosa colônica durante a indução da colite em animais C57BL/6.
- Comparar os grupos estudados (Controle e Controle + Glúten; Colite e Colite + Glúten), à dois outros grupos alimentados com dieta contendo farinha de trigo: Controle + Farinha e Colite + Farinha, a fim de se avaliar se os resultados encontrados estarão relacionados à ingestão de glúten ou se há influência de outros componentes presentes na farinha de trigo, além do glúten.

5. Materiais e Métodos

5.1 Animais e grupos experimentais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) em agosto de 2015: n° do protocolo 253/2015.

Foram utilizados camundongos fêmeas, com 8-10 semanas de idade, obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO) e mantidos no Biotério Ênio Cardillo Vieira, do ICB/UFMG. Os animais foram inicialmente divididos em seis grupos:

- **Grupo Controle** – dieta padrão sem glúten (AIN-93M) e sem indução de colite;
- **Grupo Controle + Glúten** – dieta padrão contendo glúten e sem indução de colite;
- **Grupo Controle + Farinha** – dieta padrão contendo farinha de trigo e sem indução de colite;
- **Grupo Colite** – dieta padrão e administração de DSS para indução de colite;
- **Grupo Colite + Glúten** – dieta padrão contendo glúten e administração de DSS para indução de colite.
- **Grupo Colite + Farinha** – dieta padrão contendo farinha de trigo e administração de DSS para indução de colite;

5.2 Preparo das dietas

As dietas padrão para camundongos AIN-93M dadas aos grupos Controle e Colite não contém glúten. Essas dietas foram modificadas pela introdução de glúten de trigo 4,5% (Soares *et al.*, 2013; Freire *et al.*, 2015) (Grupos Controle + Glúten e Colite + Glúten) ou farinha de trigo (Grupos Controle + Farinha e Colite + Farinha). A dieta contendo farinha de trigo foi elaborada com base na dieta padrão, com substituição do amido de milho pela farinha de trigo. O conteúdo de 4,5% de glúten vital, foi escolhido por corresponder à quantidade estimada de glúten caso a fécula de milho fosse substituída por farinha de trigo. As composições das dietas são mostradas na Tabela 1 e 2.

Tabela 1. Composição das dietas ofertadas aos animais, baseadas em 1 kg de dieta padrão (AIN-93M) controle ou modificada com Farinha de trigo ou 4,5% de Glúten

INGREDIENTES	AIN-93M (g)	AIN-93M com Farinha de trigo (g)	AIN-93M com Glúten (g)
Amido de milho ¹	465,7	-	465,7
Glúten de trigo ²	-	-	45,0*
Farinha de trigo ³	-	459,0	-
Caseína ⁴	140,0	96	106,0
Sacarose	100,0	169	93,0
Óleo de soja ⁵	40,0	33,9	40,0
Maltodextrina	155,0	155,0	155,0
Celulose	50,0	50,0	50,0
Mix de minerais ⁶	35,0	35,0	35,0
BHT	0,008	0,008	0,008
Mix de vitaminas ⁶	10,0	10,0	10,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Metionina	1,8	1,8	1,8

¹Milhena, Emifor Indústria de Alimentos S.A.; ²Glúten Vital Granotec; ³Vilma tradicional; ⁴Proquimios; ⁵Liza, Cardill Agrícola S.A.; ⁶Rhoster, Indústria e Comércio LTDA. * Considerou-se para o cálculo, para uma dieta de 1 kg, a estimativa de 45 g de glúten (4,5%).

Tabela 2. Distribuição energética (% do valor calórico total) e densidade calórica das dietas padrão (AIN-93M) controle ou modificada com Farinha de trigo ou 4,5% de Glúten

INGREDIENTES	AIN-93M (g)	AIN-93M com Farinha de trigo (g)	AIN-93M com Glúten (g)
% Carboidrato*	74,20	74,16	74,25
% Proteína*	15,78	15,80	15,77
% Gordura total*	10,02	10,04	9,98
Calorias/grama	2,76	2,76	2,76

*% de calorias totais

Os animais passaram por um período de 10 dias de adaptação à dieta AIN-93M. Após este período, iniciou-se o experimento (T0: tempo 0), que teve duração de 15 dias, sendo a dieta e água disponibilizadas *ad libitum*. O DSS (1,5% p/v), para indução da colite, foi introduzido no 7.º dia (T1: tempo 1) e a solução com este composto foi oferecida até o 15º dia (T2: tempo 2), em garrafas-bebedouro através de um bico com gotejamento automático. O desenho experimental está representado na Figura 8.

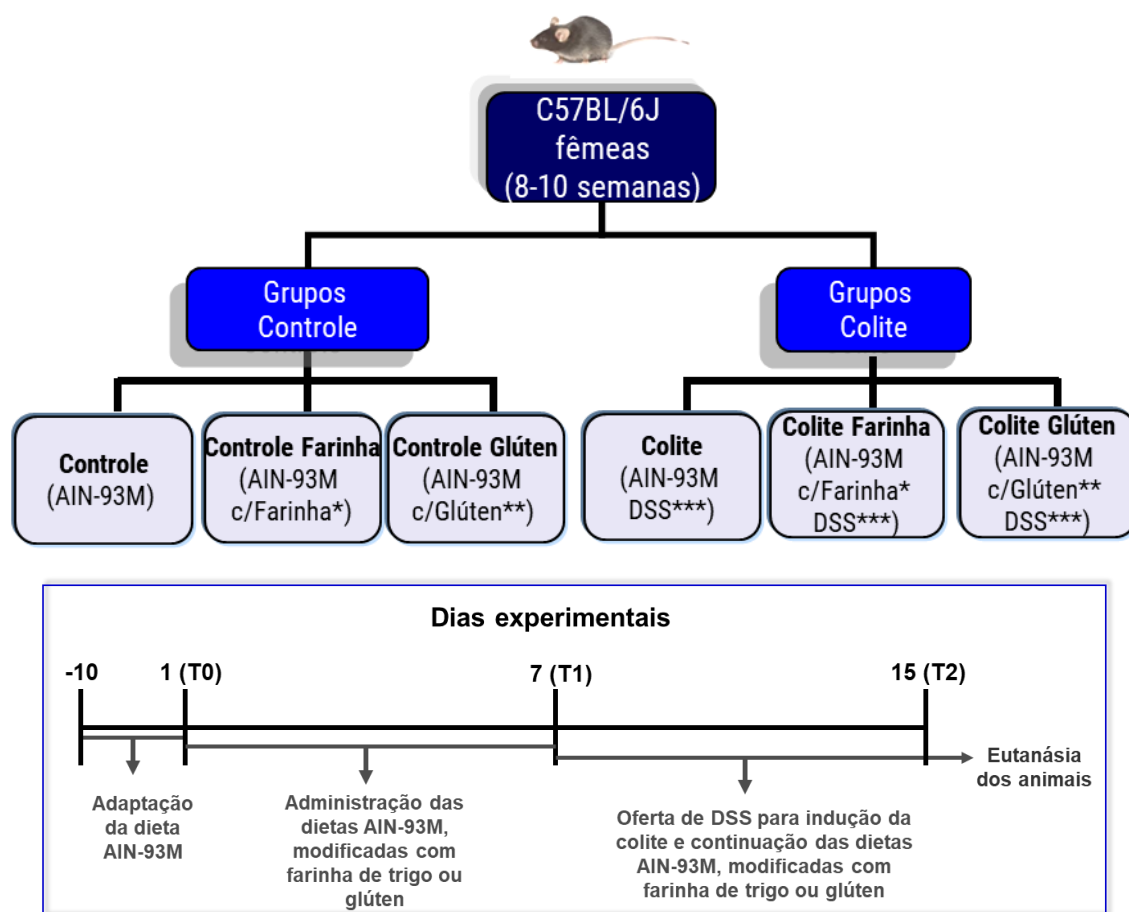


Figura 8. Desenho experimental: *Farinha de trigo: 45,9%p/p (em substituição ao amido da dieta padrão AIN-93M); **Glúten: 4,5% Glúten Vital Granotec® p/p (Soares et al, 2013; Freire et al, 2016; *DSS: Sulfato de sódio dextrano; 1,5%p/v (Wirtz et al, 2007; Okayasu et al, 1990)

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com solução de cetamina (70mg/kg) e xilazina (15mg/kg), conforme preconizado pelo CEUA/UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG), e eutanasiados por exsanguinação e deslocamento cervical para coleta de sangue e órgãos para análises.

5.3 Verificação do consumo hídrico e dietético

O consumo hídrico foi mensurado por meio da diferença em mL entre a oferta e sobra, medidos em béquer graduado. Para a quantificação do consumo alimentar, as dietas ofertadas foram pesadas semanalmente em balança semi-analítica. O restante de dieta ofertada foi quantificado pela soma da sobra. A diferença entre dieta ofertada e o restante não consumido forneceu o consumo semanal de dieta. O valor obtido foi, então, dividido pelo número de animais por gaiolas. O número de animais por grupo variou entre 3 e 5. Considerando que as dietas são isocalóricas, para se obter a ingestão calórica, multiplicou-se o consumo de ração em gramas/animal por 2,76 kcal.

5.4 Avaliação da variação ponderal

Os animais foram separados homogeneamente de acordo com peso inicial ($p > 0,05$) e pesados semanalmente, com balança semi-analítica, para acompanhamento da evolução ponderal.

5.5 Escore clínico

O escore clínico foi feito através da análise de dois parâmetros: consistência das fezes, realizado visualmente, e pela presença de sangue avaliada por meio de cartelas para detecção, a partir do 2.º dia após a introdução do DSS (*INLAB, Diagnostica São Paulo, BR*). O escore total foi obtido através da soma dos dois parâmetros observados, conforme pontuação descrita por Wirtz *et al.* na Tabela 3 (Wirtz *et al.*, 2007):

Tabela 3. Sistema de pontuação para análise comparativa de consistência das fezes e hemorragia intestinal

Escore	Consistência das fezes	Sangue
0	Normal	Negativo para sangue oculto
1	Mole, mas ainda formada	Positivo para sangue oculto
2	Muito mole	Traços de sangue visíveis nas fezes
3	Diarreia	Sangramento retal

Escore clínico intestinal proposto por Wirtz *et al.*, 2007.

5.6 Análise histológica

O cólon inteiro usado para análise das condições histológicas foi retirado, medido e enrolado da porção distal para proximal formando um rocambole, e colocado imediatamente em solução de Bouin saturada para fixação, depois imerso em formol tamponado por 2 semanas e posterior inclusão em Paraplast. Após a inclusão os cortes de 8µm foram corados com hematoxilina e eosina.

Os aspectos morfológicos examinados foram: depleção de células caliciformes, presença de áreas com erosão ou ulceração na mucosa (integridade morfológica da mucosa), presença de infiltrado inflamatório na mucosa e na submucosa e edema na submucosa. Essa análise foi realizada nas áreas mais comprometidas do cólon de cada animal. Para a avaliação da extensão total comprometida, todo o fragmento intestinal foi analisado. Para tanto, filmou-se toda a extensão do cólon e, posteriormente, as imagens estáticas foram gravadas de cada porção. Acompanhando a muscular da mucosa e, com o uso do programa imageJ, mediu-se a extensão da porção comprometida ou não. A Figura 9 ilustra essa análise. As linhas laranjas representam regiões com padrão morfológico comprometido. As linhas verdes representam as regiões com padrão morfológico não comprometido. No total, cerca de 10 mm de cólon foram emblocados, visualizados em cada lâmina histológica e medidos.

A observação dos cortes foi feita por patologista, de forma cega, em microscópio de luz e a análise semiquantitativa foi baseada no sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer (Macpherson e Pfeiffer, 1978), adaptado por Costa, 2016 (Costa, 2016). A pontuação variou de zero (sem lesões) a 3 (lesões graves). Os resultados são apresentados como a soma da pontuação obtida para cada parâmetro (0-12), considerando:

- **Grau 0 – sem lesões:** achados histológicos normais;
- **Grau 1 – lesões leves:** perda da arquitetura das criptas, baixo grau de infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal;
- **Grau 2 – lesões moderadas:** necrose das criptas, moderado infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal;
- **Grau 3 – lesões graves:** redução de células caliciformes, células vacuolizadas, necrose de criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema

na camada mucosa e submucosa e camada muscular com edema, vacuolização e infiltrado inflamatório.

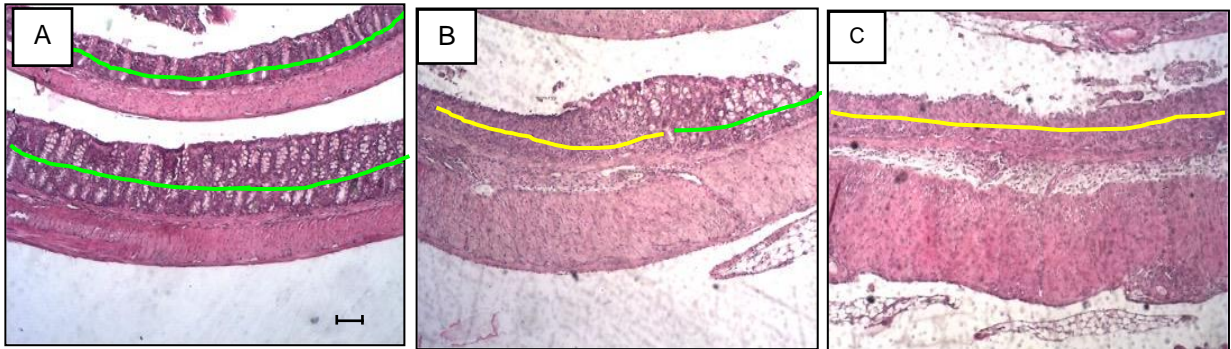


Figura 9. Análise histológica do cólon. Regiões com padrão morfológico não comprometido (linha verde) e comprometido (linha amarela)

5.7 Perfil de células do sistema imunológico do cólon

Análise Indireta de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no Cólon

Foram medidas as atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO), peroxidase de eosinófilos (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG), presentes em neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, respectivamente (Werner e Szelenyi, 1992). Para isso, o cólon foi limpo com PBS 1x, medido com régua milimetrada, pesado em balança analítica e separado em duas partes, uma para análise indireta da presença de macrófago e neutrófilo (40mg) e outra para análise indireta da presença de eosinófilo (20mg). Os resultados foram normalizados por concentração de proteína pelo método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Para quantificação da enzima NAG, as amostras foram inicialmente pesadas e adicionou-se Triton X-100 (0,1%; Sigma) e centrifugou-se por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL de sobrenadante (duplicata) foram adicionados em uma placa de 96 poços, juntamente com 100 µL de substrato para NAG (*p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina - Sigma) em tampão citrato / fosfato. Após a incubação a 37°C por 5 minutos, 100 µL de tampão de glicina a 0,2 M foram usados para interromper a reação. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 400nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). O resultado foi expresso em concentração de NAG por mg de proteína.

Para quantificação de MPO, as amostras foram homogeneizadas em 760µL de tampão fosfato e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado em 600µL de salina 0,2% e 600µL de salina 1,6% acrescida de 5% de glicose e centrifugado novamente a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado foi ressuspensionado em 760µL de HETAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio) 0,5% diluído em tampão fosfato. As amostras foram então homogeneizadas e o homogenato foi congelado e descongelado por 3 vezes em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, adicionou-se 25µL das amostras diluídas (1:3) a uma placa de 96 poços. Às amostras, adicionou-se 25µL de substrato para a mieloperoxidase, TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina – Sigma) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e procedeu-se à incubação a 37°C por 5 minutos. Após este tempo, adicionou-se 100µL de H₂O₂ a 0,002% e novamente incubou-se a 37°C por 5 minutos. Para interromper a reação acrescentou-se 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450nm. O resultado foi expresso em concentração de MPO por mg de proteína.

Para quantificação da enzima EPO, as amostras foram pesadas, homogeneizadas em 380µL de PBS 1x e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Foram adicionados 300µL de solução salina 0,2% e 300µL de solução salina 1,6%, acrescida de 5% de glicose e as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensionado em 380µL de HETAB 0,5%, diluído em PBS 1x. Em seguida as amostras foram congeladas e descongeladas, por 3 vezes, em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático. Para isso, adicionou-se 75µL das amostras a uma placa de 96 poços. Às amostras, acrescentou-se 75µL do cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma) diluído em tampão Tris-HCl a 0,075mM acrescido H₂O₂ a 6,6 mM e procedeu-se à incubação a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Então, interrompeu-se a reação com adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492nm. O resultado foi expresso em concentração de EPO por mg de proteína

5.8 Avaliação da permeabilidade intestinal

Para avaliação da permeabilidade da mucosa intestinal, no dia da eutanásia os animais receberam por gavagem 100µL de solução com fármaco ácido dietilenoaminopentacético (DTPA) marcado com 18,5 MBq ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc) sob a forma de pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄), obtido por gerador de ⁹⁹molibdênio/^{99m}tecnécio (IPEN/CNEM, São Paulo, Brasil). Quatro horas após a gavagem, os animais foram anestesiados para exsanguinação pelo plexo axilar e o sangue foi retirado e submetido à determinação da radiação por meio de contador de radiação gama (Wallac Wizard Gamma couter, PerkinElmer, Waltham, USA). Os resultados foram comparados com o padrão de dose e o percentual de dose da radiação encontrada por g de sangue foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose/g sangue} = (\text{CPM/g} \times 100) / \text{CPM do padrão da dose}$$

CPM = contagem por minuto

5.9 Avaliação da Translocação Bacteriana

O cultivo, preparação e marcação da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi realizado conforme descrito por Andrade (2016). Os animais receberam, por gavagem, 0,2 mL de suspensão contendo 10⁸/UFC de ^{99m}Tc - *E. coli*. Após 30 minutos e 2 horas, os animais foram anestesiados e em seguida, colocados em decúbito dorsal sob a gama câmara (NuclideTM TH 22, Hungria). Utilizou-se janela de 20% centrada em 140keV e colimador de baixa energia foi utilizado para direcionar os raios. As imagens foram obtidas durante 5 minutos e armazenadas em uma matriz 256 x 256 pixels (Andrade, 2013).

Após realização das imagens (2 horas após gavagem) o sangue foi coletado da veia cava inferior e acondicionado em tubos para a determinação da radiação. Após a coleta do sangue, os NLM, fígado, baço e pulmões foram coletados e pesados para a determinação da radioatividade em contador de radiação gama (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3). Este mesmo procedimento também foi utilizado para investigar a translocação bacteriana após 4 horas de gavagem com ^{99m}Tc - *E. coli*. Neste caso, utilizou-se apenas 0,1 mL de suspensão contendo 10⁸/UFC de ^{99m}Tc - *E. coli*, quantidade

essa suficiente para determinação da radioatividade em contador de radiação gama. Os resultados foram expressos em contagem por minuto por 1g de tecido.

5.10 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As seções de cólon (2mm) foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato durante 6 horas. Após a fixação e o processamento, foram utilizadas seções (150nm) para selecionar a área de análise e, posteriormente, foram feitos cortes ultrafinos (60nm) em ultra micrótomo (Ultra Microtome Sorvall - MT-B - Ivan Sorvall, Inc). Estas seções foram colocadas em uma tela de cobre (200 ou 300 mesh), contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e levados ao MET (microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin EIF - 120 kV) para obter a análise e as imagens. Cerca de 5 imagens de cada animal foram coletadas para a medição da largura das junções de oclusão e de adesão e dos desmosomas, considerando a membrana delimitante de cada junção como ponto inicial e final. A ampliação da imagem foi de 26.500x (500nm) ou 43.000x (200nm). O processamento e a contrastação dos tecidos foram realizados pelo Centro de Aquisição e Processamento de Imagem (CAPI-ICB / UFMG) e a captura das imagens foi realizada por técnicos do Centro de Microscopia da UFMG. A análise das imagens foi realizada de forma cega e randomizada por um especialista em microscopia eletrônica com o auxílio do software ImageJ. O número de microvilos foi contado e dividido pelo comprimento do tecido (nm). O número de vesículas do sistema endossomo/lisossomo foi dividido pela área do tecido (nm²). A largura das junções e diâmetro das vesículas dos sistema endossomo/lisossomo, considerou a membrana delimitante de cada uma como ponto inicial e final.

5.11 Western Blot

As células do epitélio colônico foram separadas da camada muscular (por meio de raspagem da face interna do cólon) e foram lisadas em tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de *cocktail* de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS, pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol)

e aquecidas a 100 °C por 5 minutos, para desnaturação das proteínas. Para separação, foram aplicados 20µg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfato-poliacrilamida) a 12,5%. Após serem separadas no gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45µm. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (solução de albumina (3%) e Tween (0,1%) em TBS). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário específico, diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-β-catenina (monoclonal feito em coelho; Sigma-aldrich, EUA) e anti-E-caderina (monoclonal feito em camundongo; BD Biosciences, EUA). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0.3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com os anticorpos secundários anti-rabbit IgG-CFL 647 (sc-362291, Santa Cruz Biotecnologia) e anti-mouse IgG-FITC (sc-358916, Santa Cruz Biotecnologia) diluídos conforme indicação feita pelos fabricantes. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As membranas foram escaneadas (aparelho Typhoon™ FLA 9000) e a intensidade das bandas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ.

5.12 Imunofluorescência

As proteínas de junção de adesão E-Caderina, β-Catenina e de α-E-Catenina foram analisadas por imunofluorescência. Simplificadamente, o procedimento consistiu em fixar os cortes (6µm) com acetona por 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavar as lâminas com PBS, foi realizado a permeabilização e bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA a 4% em PBS 1x), por 1h à temperatura ambiente. Procedeu-se, então a incubação com os anticorpos primários (*overnight* a 4°C). Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-β-catenina (monoclonal feito em coelho; Sigma-aldrich, EUA), anti-α-E-catenina (policlonal feito em coelho; Cell Signaling, EUA) e anti-E-caderina (monoclonal feito em camundongo; BD Biosciences, EUA), diluídos conforme indicação feita pelos fabricantes.

No dia seguinte, após lavar as lâminas, foi aplicado os anticorpos secundários anti-mouse IgG-FITC (sc-358916, Santa Cruz Biotecnologia) e anti-rabbit IgG-CFL 647 (sc-

362291, Santa Cruz Biotecnologia), diluídos conforme indicação feita pelos fabricantes e incubados por 2h, no escuro à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência NIKON do Centro de Aquisição de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), nos aumentos de 20 e 100x, e a intensidade de fluorescência foi analisada com o auxílio do software analisador de imagens Image-J.

5.13 Análise da expressão gênica por qPCR

Para a análise da amplificação do mRNA dos genes de α -E-Catenina, vinculina e do receptor de quimiocina CXCR3, fragmentos de cólon foram retirados do animal, pesados, imediatamente colocados em tubo eppendorf livre de RNase e congelados em nitrogênio líquido antes de serem armazenados a -80°C . Posteriormente, os tecidos foram submetidos às etapas seguintes:

Extração do RNA

Para extração do RNA do grupo Controle, 20 a 25mg de cólon foram homogeneizados com 1mL de trizol (Trizol Reagent, Invitrogen cod. n.º15596). Após a homogeneização, o tecido foi centrifugado a 13.000rpm, 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 200 μL de clorofórmio e os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos, incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e novamente centrifugados a 13.000rpm, 4°C por 15 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo contendo 500 μL de isopropanol e misturadas por inversão durante um minuto. Em seguida, os tubos foram incubados a -70°C por 90 minutos, para precipitação do RNA. As amostras foram, então, centrifugadas a 13.000rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado lavado com 1mL de etanol 75%. Após centrifugação por 10 minutos sob as mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem e centrifugação repetidos.

Novamente desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi seco em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Depois de seco, o pellet foi ressuspensão em água e incubado em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Espectrofotômetro foi utilizado para determinação da concentração (ng/ μL) e da pureza do RNA (por meio da razão 260/280)

(Spectrophotometer ND-1000). Todos os materiais utilizados, incluindo microtubos, ponteiras e água foram livres de RNase e DNase.

Para amostras de cólon dos grupos Colite foram utilizados kits de purificação *NucleoSpin® RNA Clean-up* (Macherey-Nagel, CA. Cod.n.º 740948.10) conforme indicações pelo fabricante.

Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA, o RNA extraído anteriormente foi diluído para a concentração 0,2 µg/µL em água livre de RNase e DNase. Para 10 µL de RNA a 0,2 µg/µL foi adicionado 1 µL de Oligo dT 50 uM e 2,5 µL de água livre de RNase e DNase. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados no termociclador a 72°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado à mistura 6,5 µL do segundo mix, composto de 4 µL de MMLV 5x tampão, 1 µL de MMLV RT (200 U/amostra), 1 µL de dNTPs 10 mM, 0,2 µL de RNasin e 0,5 µL de água livre de RNase e DNase. Os tubos foram mantidos no termociclador a 42°C por 3 horas e em seguida a 72°C por 15 minutos, sendo então armazenados a -20°C para posterior uso para reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR).

Amplificação do cDNA por PCR quantitativa (qPCR)

O cDNA sintetizado foi amplificado pela técnica de qPCR, utilizando primers específicos. As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5µL foram adicionados à 7,5µL do mix em placa de 96 poços específica para qPCR. O mix foi composto de 0,75µL de primer forward, 0,75µL de primer reverse, 1µL de água e 5µL de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems Cód. n.º4367659).

A análise foi feita em máquina específica (ABiPrism – 7900HT Sequence Detection System) e analisados por meio do programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$). A curva de dissociação indicou que um único produto de amplificação foi obtido em cada reação. A tabela 4 mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado:

Tabela 4. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no cólon

Gene	NM	Sequência foward	Sequência reverse
GAPDH	008084.3	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGCCCAAATCCGTCCACACCGA
α -E-Catenina	009818.1	TCTGAGTAGGCTGAAGTGCC	CAGCATCACAACACACGAGC
Vinculina	009502.4	TCAGATGAGGTGACTCGGTTGG	GGGTGCTTATGGTTGGGATTGG
CXCR3	009910.3	AATGCCACCCATTGCCAGTAC	AGCAGTAGGCCATGACCAGAAG

5.14 Métodos estatísticos de tratamento dos dados

O cálculo amostral foi realizado baseado nos resultados obtidos no estudo aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) (223/2008 - Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano), considerando-se 80% para o poder do teste e 5% para o nível de significância ($p < 0,05$).

Os resultados foram avaliados, quanto à distribuição normal, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs. Os dados que assumiram distribuição normal foram submetidos ao teste ANOVA one-way ou two-way, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente, para análises com mais de dois grupos, ou teste T de Student para comparação entre dois grupos. Os dados que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de ANOVA Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunns, para análises com mais de dois grupos, ou teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Para a análise de co-localização entre as proteínas E-caderina e β -catenina, foi utilizado o coeficiente de co-relação de Pearson (r) e, posteriormente, o teste ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego California - USA).

6- Resultados

6.1 Consumo alimentar, ingestão hídrica e peso corporal

Consumo alimentar e ingestão hídrica

O consumo alimentar semanal foi avaliado por meio da ingestão calórica em cada grupo durante o período experimental. Não foi encontrada diferença na ingestão calórica entre os grupos Controle e Colite, com ou sem glúten ou farinha de trigo (Figura 10).

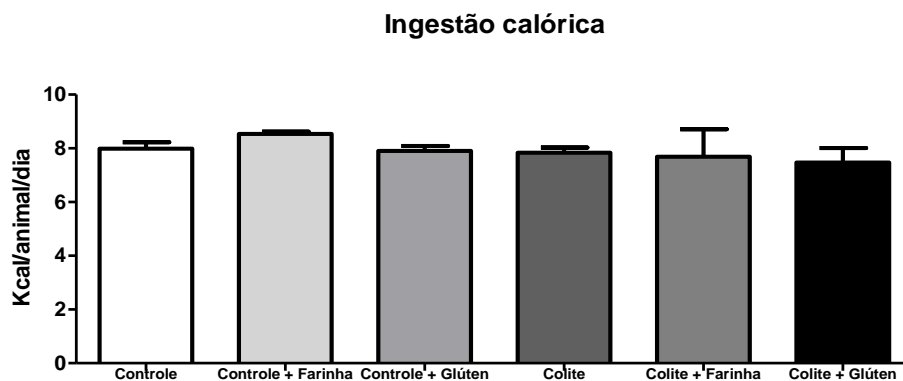


Figura 10. Ingestão calórica durante o experimento. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; grupo Controle + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten; grupo Controle + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como mediana \pm intervalo interquartil, em kcal/animal/dia (n= 06/06/06//06/06/06). Teste: Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns.

Quanto à ingestão hídrica, não houve diferenças quanto ao consumo, indicando que a ingestão de DSS foi similar entre os grupos experimentais (Figura 11).

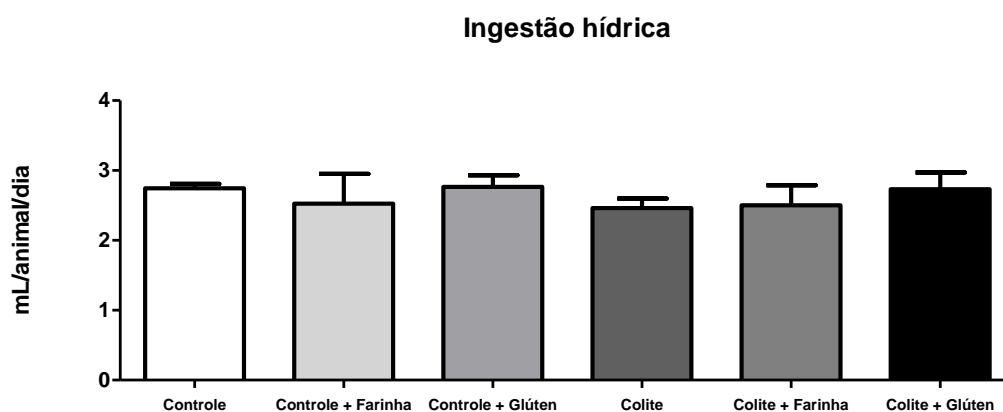


Figura 11. Ingestão hídrica durante o experimento. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; grupo Controle + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten; grupo Controle + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como mediana \pm intervalo interquartil, em mL/dia/animal (n= 06/06/06//06/06/06). Teste: Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's.

Peso corporal

No início do experimento todos os grupos apresentaram médias de peso semelhantes (Figura 12A). No entanto, após a introdução do DSS, os animais dos grupos Colite perderam peso em relação aos grupos Controle. A perda de peso já era esperada, ao menos no grupo Colite, pois é um dos sinais encontrados na colite experimental induzida por DSS. Porém, observa-se que o grupo Colite + Glúten e o grupo Colite + Farinha apresentaram o mesmo padrão de diminuição de ganho de peso que o grupo Colite (Figura 12 B).

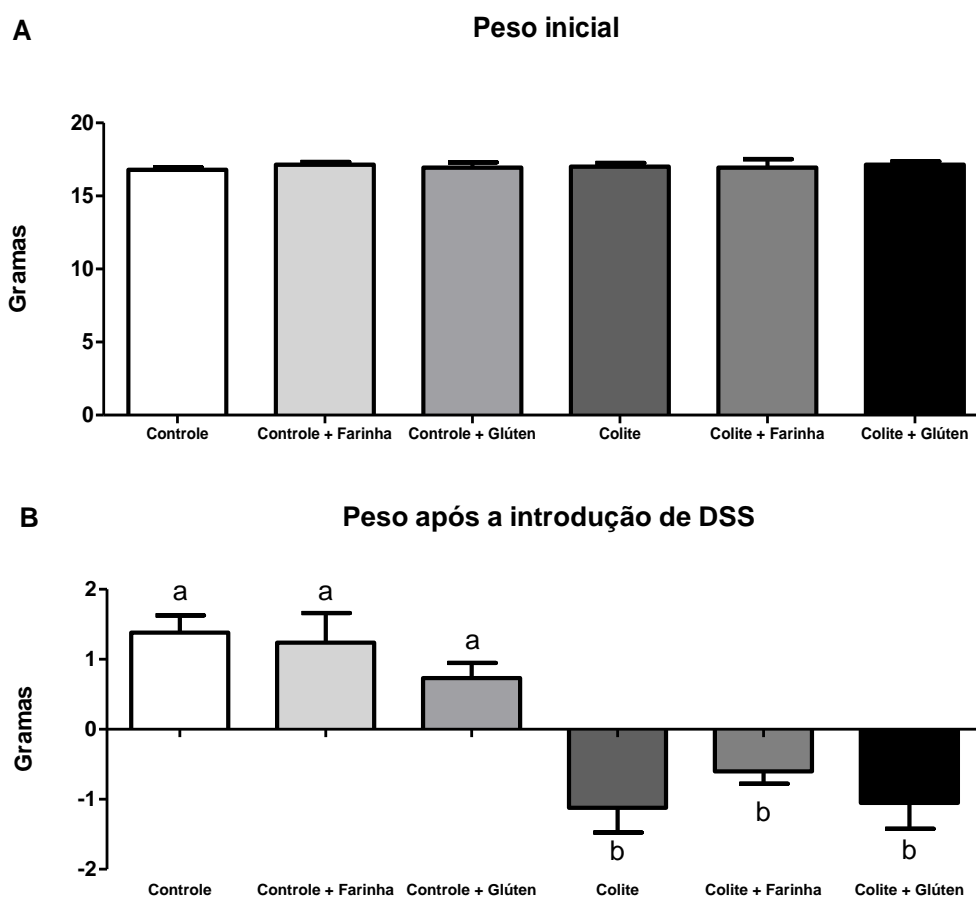


Figura 12. Avaliação ponderal. A) Peso inicial. B) Peso corporal dos animais após a introdução do DSS. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; grupo Controle + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten; grupo Controle + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como média \pm Erro padrão, em gramas (n= 06/06/06//06/06/06). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

6.2 Escore clínico

Em relação ao escore clínico, que considera a soma dos escores dos parâmetros de consistência das fezes e presença de sangue, observou-se que a ingestão de glúten piorou os

sinais clínicos da colite, com piora do escore total a partir do 2.º dia e que se manteve até o 7.º e último dia de administração do DSS (1,5% p/v) em relação aos grupos Controle e Colite. Houve piora do escore para o grupo Colite + Glúten em relação ao grupo Colite + Farinha a partir do 6.º dia (Figura 13 A-C). Além disso, animais do grupo Colite + Glúten foi o único que apresentou sangramento anal visível. Provavelmente devido aos efeitos protetores do ferro e ácido fólico adicionados à farinha comercial utilizada, o grupo Colite + Farinha não apresentou piora como o grupo Colite + Glúten, apresentando valores de escore intermediário (consistência das fezes) ou similares (Escore clínico total ou sangue nas fezes) ao grupo Colite.

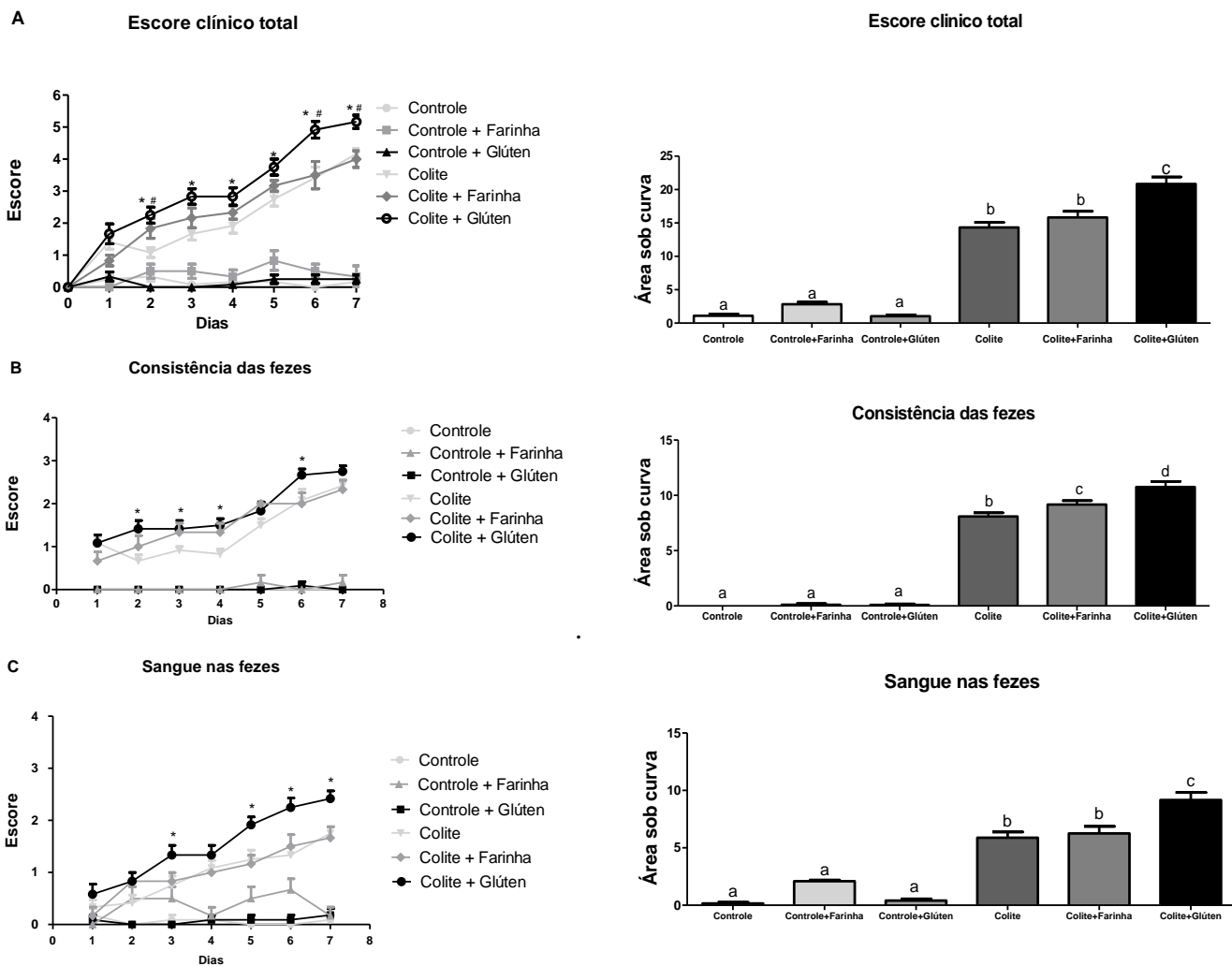


Figura 13. Escore clínico. A) Escore clínico total. B) Escore de consistência das fezes. C) Escore de sangue nas fezes. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; grupo Controle + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten; grupo Controle + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como escore total (n= 06/06/06//06/06/06). Teste: Two-way Anova e pós-teste de Bonferroni.*p<0,05 para grupos Controle x grupos Colite e grupos Colite + Glúten x grupo Colite; #p<0,005 para grupos Colite + Glúten x Colite + Farinha. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

6.3 Comprimento do cólon

O comprimento do cólon foi menor em todos os grupos Colite em relação aos grupos Controle. Apesar de não ter sido observado piora neste parâmetro pelas dietas modificadas com Glúten ou Farinha de trigo, este resultado era esperado no grupo Colite, já que a diminuição do comprimento do cólon é um dos sinais da colite experimental induzida por DSS (Figura 14).

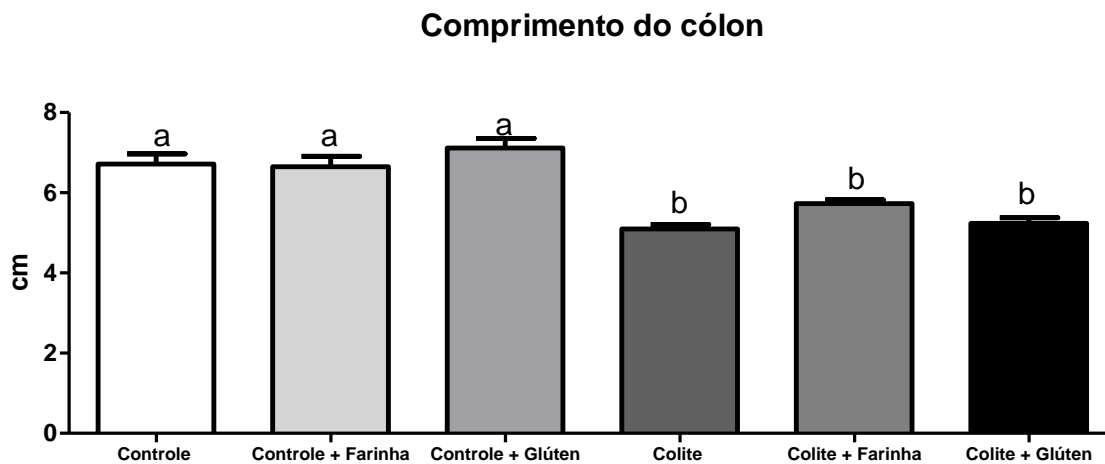


Figura 14. Comprimento do cólon. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; grupo Controle + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten; grupo Controle + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Farinha: dieta AIN-93M com farinha de trigo e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como média \pm Erro padrão, em cm (n=06/06/06//06/06/06). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Os resultados acima confirmam a indução da colite experimental nos grupos com DSS. Entretanto, a piora do escore clínico, incluindo a presença de sangue anal visível no grupo Colite + Glúten indica que a ingestão do glúten é fator agravante da colite induzida.

Nota-se também que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos Controle, Controle+Farinha e Controle+Glúten e nem entre o grupo Colite + Farinha em relação ao grupo Colite. Considerando essas igualdades, os experimentos seguintes foram realizados com 3 grupos experimentais: **Controle, Colite e Colite + Glúten.**

6.4 Análise histopatológica

O grupo Controle apresentou integridade morfológica da mucosa, ou seja, com camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa íntegras. A camada mucosa de todas as amostras apresentou-se com células caliciformes e ausência de abscessos nas criptas.

Os grupos Colite e Colite + Glúten apresentaram mucosa com erosão da camada epitelial, depleção de células caliciformes e áreas com infiltrado inflamatório de grave intensidade. De menor intensidade e de forma irregular, algumas criptas apresentaram abscessos. A colite também foi marcada pela presença de edema e infiltrado na região da submucosa, de intensidade moderada a grave. Esse quadro culminou em perda da arquitetura da mucosa nessas áreas. Embora tenha havido diferença entre os grupos Colite em relação aos grupos Controle, não houve diferença significativa quanto aos escores histopatológicos total e individuais entre os grupos Colite e Colite + Glúten (Figura 15).

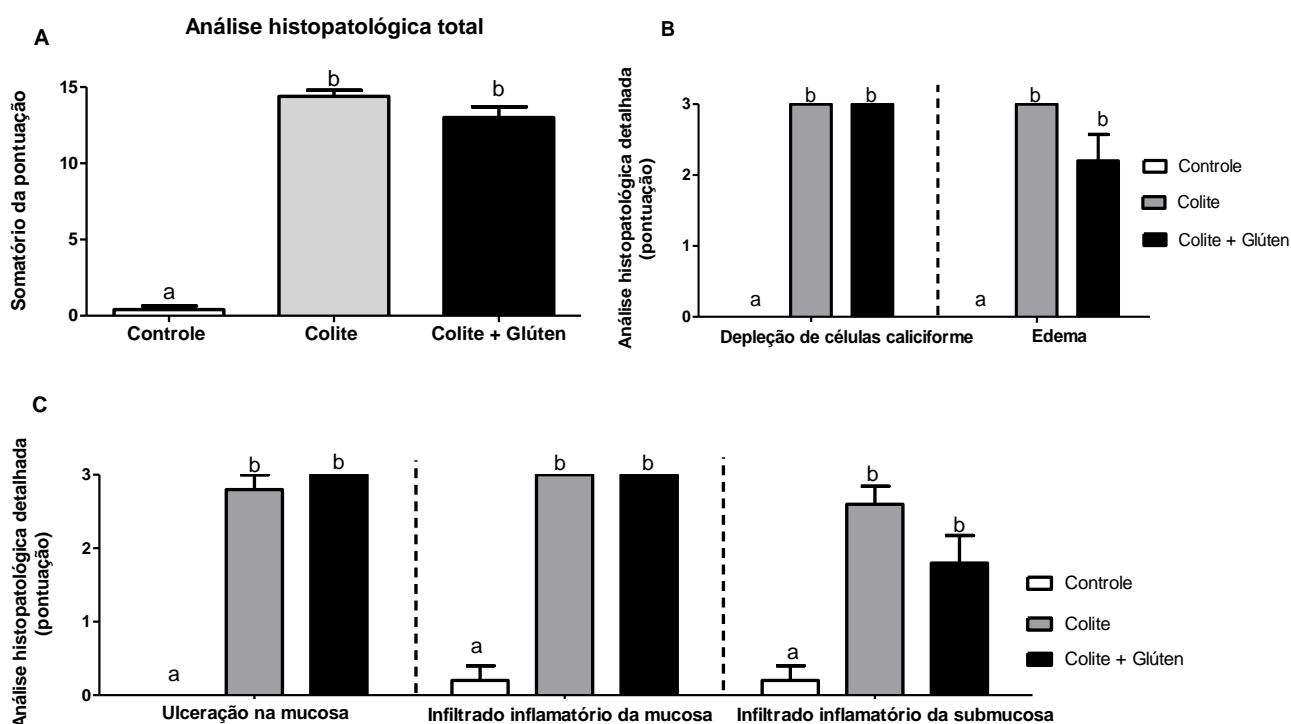


Figura 15. Análise histopatológica do cólon. Análise histopatológica total (A), Depleção de células caliciformes e Edema(B), Ulceração na mucosa, infiltrado inflamatório da mucosa e da submucosa (C). Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como média ± Erro padrão, (n= 5/5/5). One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Nas regiões comprometidas, a intensidade de lesão foi semelhante. A Figura 16 é a fotomicrografia do cólon, corado com HE que representa os aspectos morfológicos do cólon e as regiões comprometidas.

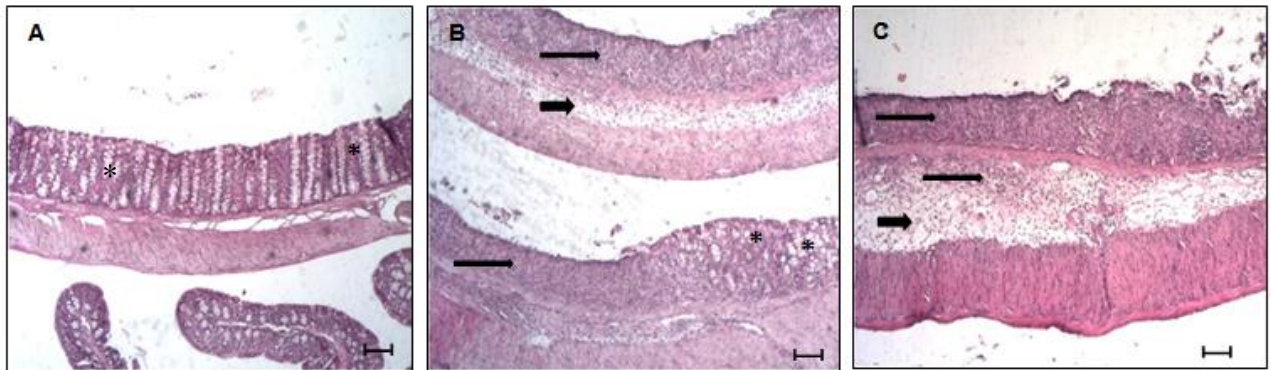


Figura 16. Aspecto morfológico do cólon. Quadro A: Grupo Controle, dieta AIN-93M e sem indução de colite, observa-se integridade morfológica da mucosa, ausência de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa ou edema na submucosa e presença de muitas células caliciformes (asteriscos); Quadro B: Grupo Colite, AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v) e quadro C: grupo Colite + Glúten: AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v), observa-se ulcerações na mucosa, com presença de infiltrado inflamatório tanto na mucosa quanto na submucosa (setas longas) e regiões de edema na submucosa (setas curtas) e poucas células caliciformes (asteriscos). A barra representa uma escala de 100 μ m.

Embora a intensidade da lesão tenha sido semelhante, o grupo Colite + Glúten apresentou maior extensão de comprometimento, quando comparado ao grupo Colite (Figura 17).

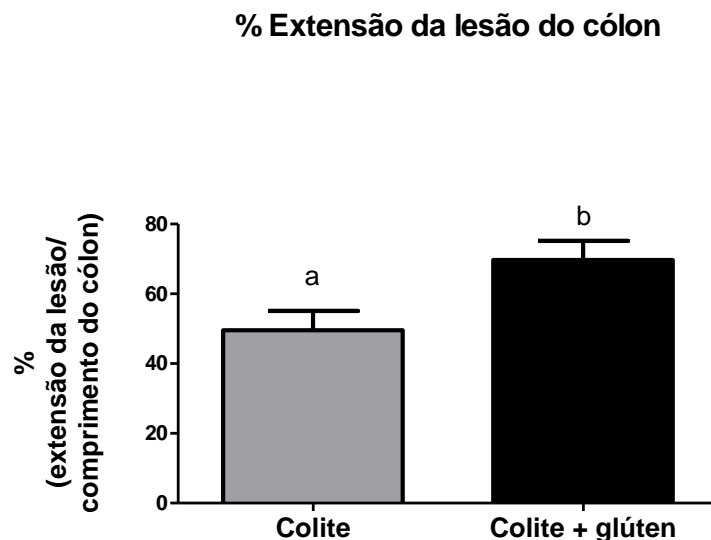


Figura 17. Extensão da lesão do cólon (% de colón lesado em relação ao comprimento total). Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como média \pm Erro padrão, (n= 5/5). Teste: t de Student. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

6.5 Perfil de células do sistema imunológico

O próximo passo foi avaliar se houve alteração do infiltrado de células inflamatórias ao longo de toda extensão do cólon. Para avaliação desse infiltrado, foram realizadas análises indiretas do infiltrado de neutrófilos, e eosinófilos e macrófagos.

Análise indireta de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos

Ao analisar a presença de neutrófilos no cólon pela quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), observa-se maior presença de neutrófilos nos grupos Colite em relação ao grupo Controle, característica marcante na colite que indica a presença de infiltração dessas células na mucosa. Ainda, foi possível observar maior atividade desta enzima no grupo Colite + Glúten em relação ao grupo Colite, o que sugere uma possível atuação do glúten na ativação de neutrófilos, células predominantes em tecidos inflamados (Figura 18A).

Na análise indireta da presença de eosinófilos do cólon pela quantificação da atividade da enzima peroxidase de eosinófilos, percebe-se um aumento destas células no grupo Colite + Glúten em relação ao grupo Colite, o que demonstra um grande potencial alergênico do glúten, o que pode agravar a inflamação na colite (Figura 18B).

Em relação a análise indireta de macrófagos por meio da enzima NAG, não houve diferença entre os grupos (Figura 18C). Possivelmente isso deve-se a baixa intensidade da colite que foi induzida com a administração de 1,5% p/v de DSS. Neste caso, o glúten não foi capaz de aumentar o infiltrado de macrófagos durante o processo inflamatório.

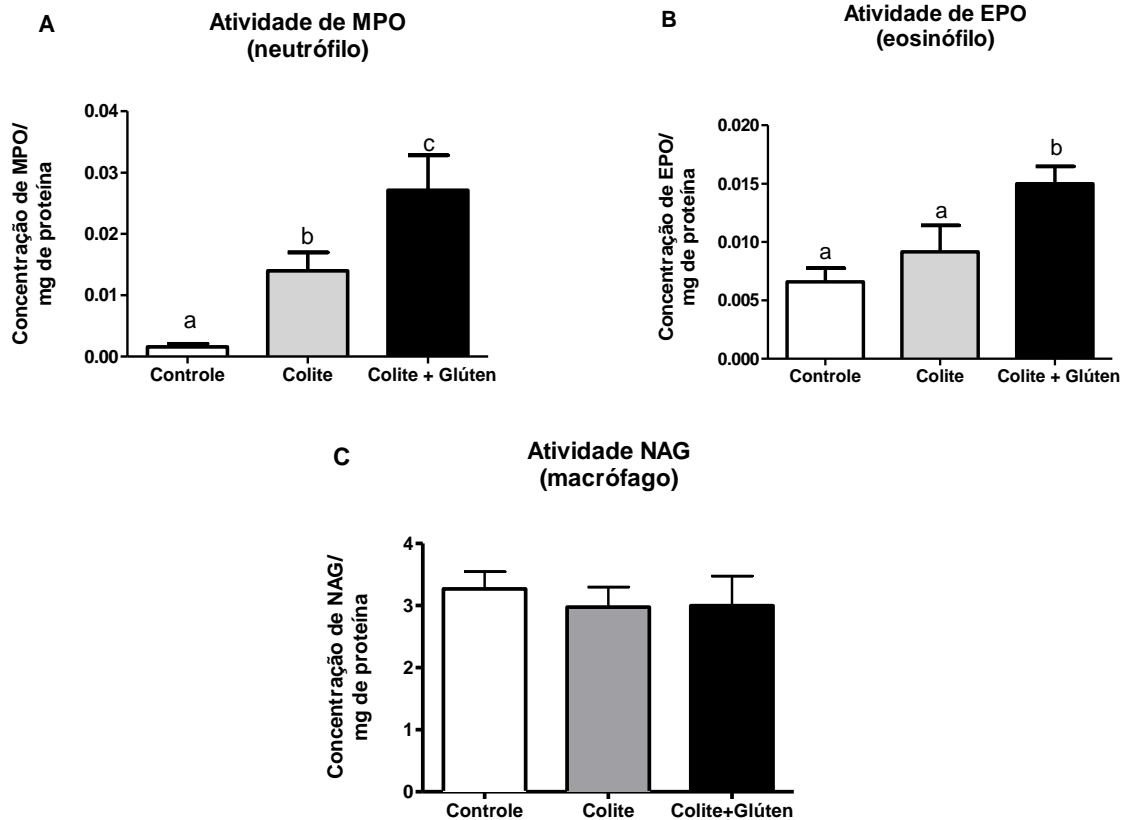


Figura 18. Análise do perfil inflamatório de células inflamatórias do cólon: A. Atividade de MPO (n=06/06/06); B. Atividade de EPO (n= 05/06/06). C. Atividade de NAG (n=04/05/05). Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-Keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

Associado aos demais resultados de piora do escore clínico e o maior percentual da extensão do cólon lesado, o aumento do número de neutrófilos e eosinófilos indica que o glúten tem ação potencializadora da inflamação na colite.

O próximo passo foi investigar se a piora da inflamação causada pelo glúten pode alterar a permeabilidade intestinal, levando à aumento da translocação bacteriana na colite.

6.6 Permeabilidade intestinal

Os resultados mostram aumento da permeabilidade intestinal decorrente da indução da colite experimental e que houve efeito deletério do glúten, com aumento da permeabilidade no grupo Colite + Glúten em relação ao grupo Colite (Figura 19).

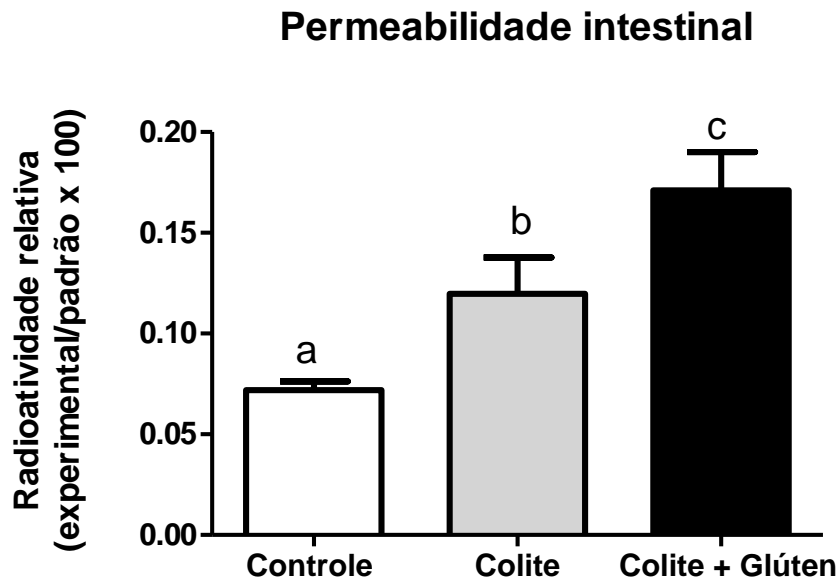


Figura 19. Determinação da permeabilidade intestinal usando DTPA marcado com Tecnécio. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como média \pm Erro padrão, em porcentagem de dose encontrada no sangue (n= 08/09/09). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

6.7. Translocação bacteriana

O tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) apresenta características semelhantes ao íon iodeto e são captados pela tireóide (Figura 20A) aumentando os níveis de radioatividade neste órgão (Berthol *et al.*, 2003). Nas imagens, observa-se que não houve ligação de tecnécio livre à tireóide, garantindo que a marcação do glúten ingerido pelos animais foi estável. Desta forma, imagens cintilográficas foram obtidas 45 minutos (Figura 20B-D) e 2 horas (Figura 20B1-D1) após a administração de ^{99m}Tc -E coli por gavagem e mostraram acúmulo de radioatividade na região abdominal. Porém, no grupo Colite + Glúten observou-se um padrão de dispersão da radiação diferente quando comparado aos grupos Controle e Colite.

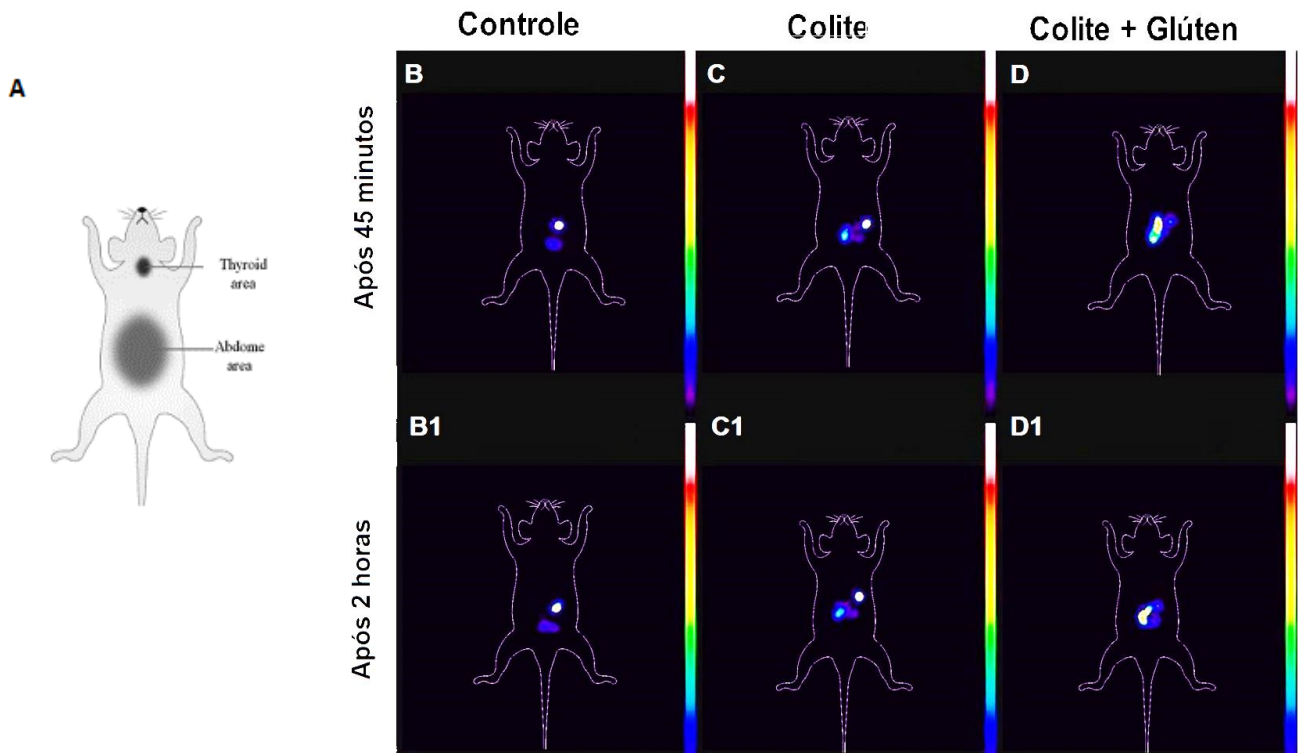


Figura 20. Determinação da translocação bacteriana usando ^{99m}Tc -*Escherichia coli*. A. Figura esquemática representando a disposição do animal vivo usado para realização das imagens. B-D. Imagens cintilográficas obtidas em gama câmara realizadas em 45 minutos (B, C, D) e 2 horas (B1, C1, D1) após gavagem de ^{99m}Tc -*E. coli*. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). N=03/03/03.

Para analisarmos melhor qual a cinética de translocação bacteriana, as bactérias marcadas foram quantificadas 2 horas e 4 horas após a gavagem de solução de ^{99m}Tc -*E. coli*. Observa-se na contagem de radiação que, 2 horas após a gavagem, houve aumento significativo da translocação bacteriana total no grupo Colite+Glúten comparado aos demais (Figura 21A). Ainda, maiores quantidades de bactérias foram encontradas no fígado e pulmão (Figura 21D;F). No experimento de 4 horas após a gavagem de solução de ^{99m}Tc -*E. coli*, observa-se ainda maior translocação bacteriana total no grupo Colite + Glúten. Nesse tempo, os níveis sanguíneos estão menores, mas as concentrações em outros tecidos como linfonodo mesentérico, fígado, baço e pulmão estão maiores, quando comparado ao grupo Controle e ao grupo Colite (Figura 21C-F).

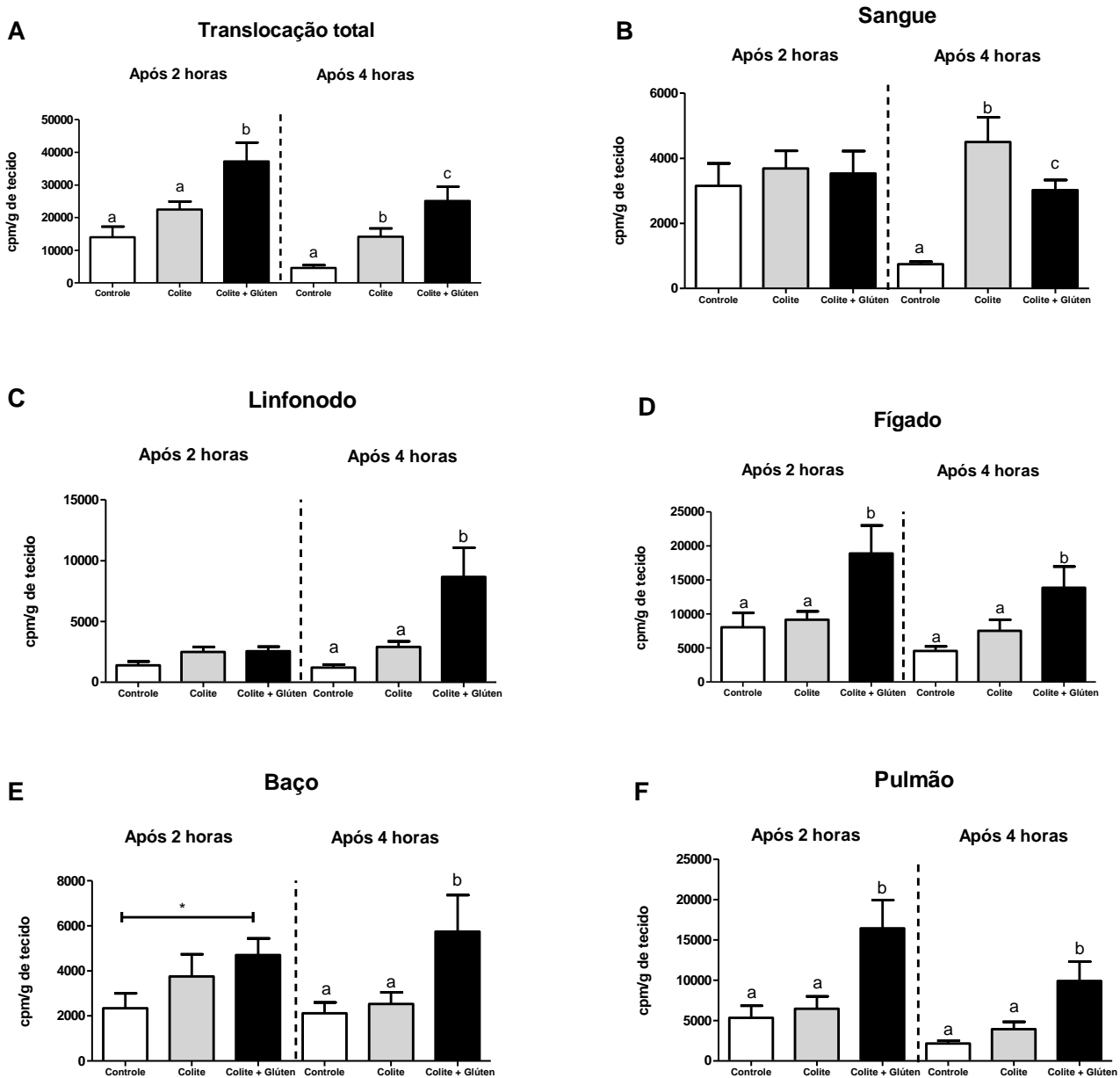


Figura 21. Determinação da translocação bacteriana e da concentração ^{99m}Tc -*Escherichia coli*. **A:** Concentração de ^{99m}Tc -*E.coli* encontrada considerando a concentração em todos os órgãos (n=10/9/11), **B:** sangue (n= 10/10/10), **C:** linfonodo mesentérico (n=10/10/10), **D:** fígado (n=10/9/10), **E:** baço (10/8/9) e **F:** pulmão (n=9/7/8). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-Keuls,. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v. Resultados expressos como média e Erro padrão; *P<0,05 Teste t Student.

6.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Os resultados de permeabilidade foram confirmados por microscopia eletrônica de transmissão que mostrou fragilidade das junções de oclusão de ambos os grupos Colite (Figura 22A-C). No entanto, ao analisarmos as junções de adesão e os desmossomos observamos aumento do espaço entre as células somente no grupo Colite + Glúten, o que pode ter sido a causa do aumento da permeabilidade intestinal pela via paracelular (Figura 22D-I). Os dados sobre as medidas das distâncias entre essas junções foram confirmados estatisticamente.

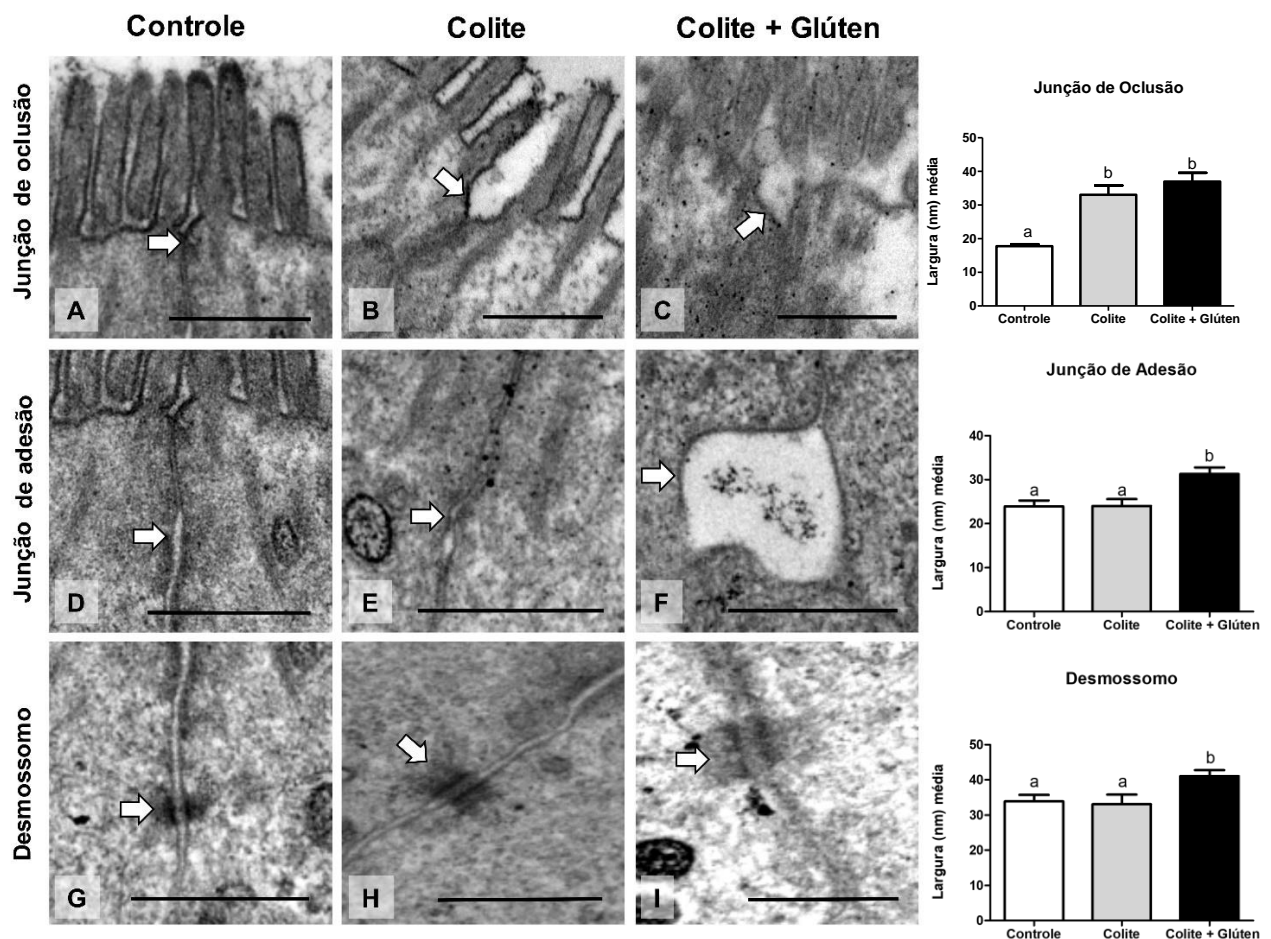


Figura 22. Determinação da distância entre as células epiteliais do cólon. A-C. Junção de oclusão, observa-se proximidade das membranas da junção no grupo Controle (A) e distanciamento das membranas nos grupos Colite e Colite+Glúten (B e C); D-F, Junção de adesão, observa-se proximidade das membranas da junção nos grupos Controle e Colite (D e E) e distanciamento das membranas no grupo Colite+Glúten. (F); G-I. Desmossomos, observa-se proximidade das membranas do desmossomo nos grupos Controle e Colite (G e H) e distanciamento das membranas no grupo Colite+Glúten. (I). Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); Resultados expressos como média ± Erro padrão (animais n= 04/04/05; imagens n=20/20/25). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$. A barra representa uma escala de 500nm.

O número e comprimento dos microvilos presentes nas criptas foram também analisados. O número de microvilos (por nm de tecido) no grupo Colite+Glúten foi menor do que o grupo Colite que, por sua vez, foi menor que os grupos Controle. Já o comprimento dos microvilos foi menor no grupo Colite+Glúten em relação ao grupo colite, esse último sem apresentar diferenças estatísticas em relação ao grupo controle (Figura 23).

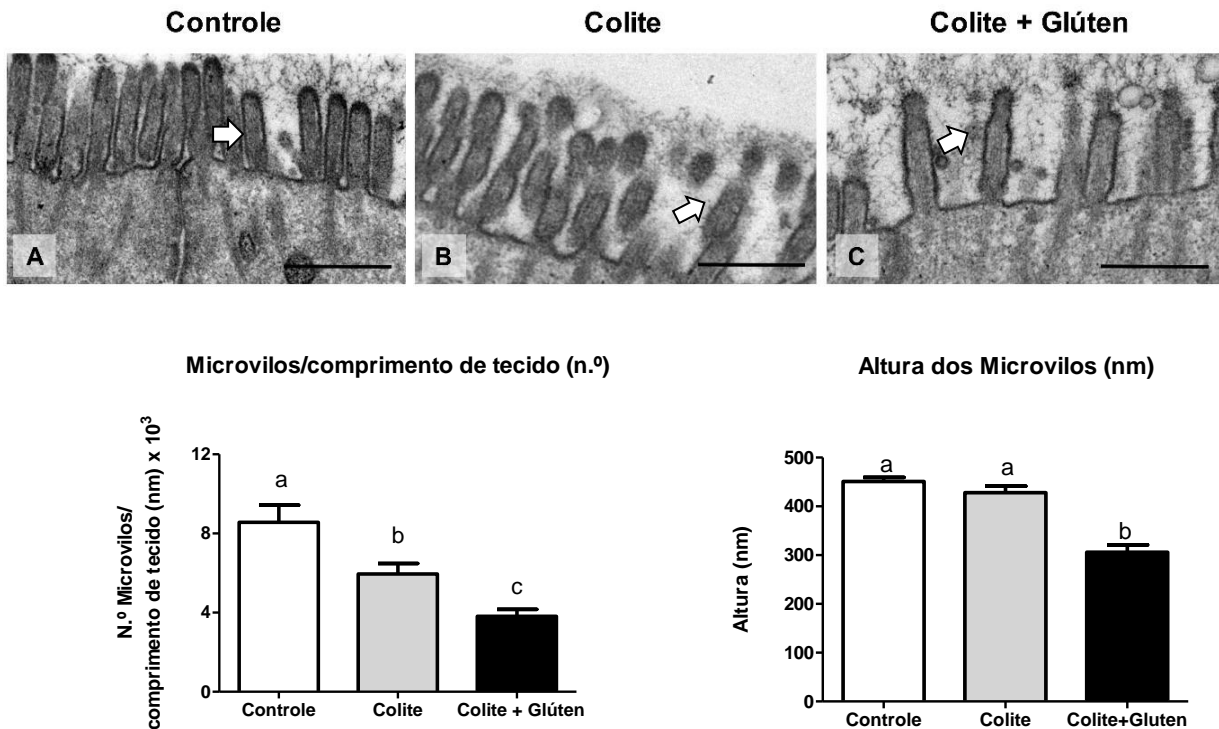


Figura 23. Microvilosidades do cólon. A. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite, observa-se integridade dos microvilos; B. Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v), observa-se redução do número de microvilos/comprimento de tecido; C. grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v), observa-se redução da altura e do número de microvilos/comprimento de tecido. Resultados expressos como média \pm Erro padrão (animais N= 04/04/05; imagens N=20/20/25). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$. A barra representa uma escala de 500nm.

Foi também observado um número de vacúolos maior no grupo Colite+Glúten (Figura 24A-C) e, embora haja menor número de vesículas do sistema endossomo/lisossomo no citoplasma, houve aumento do diâmetro dessas estruturas. (Figura 24D-F)

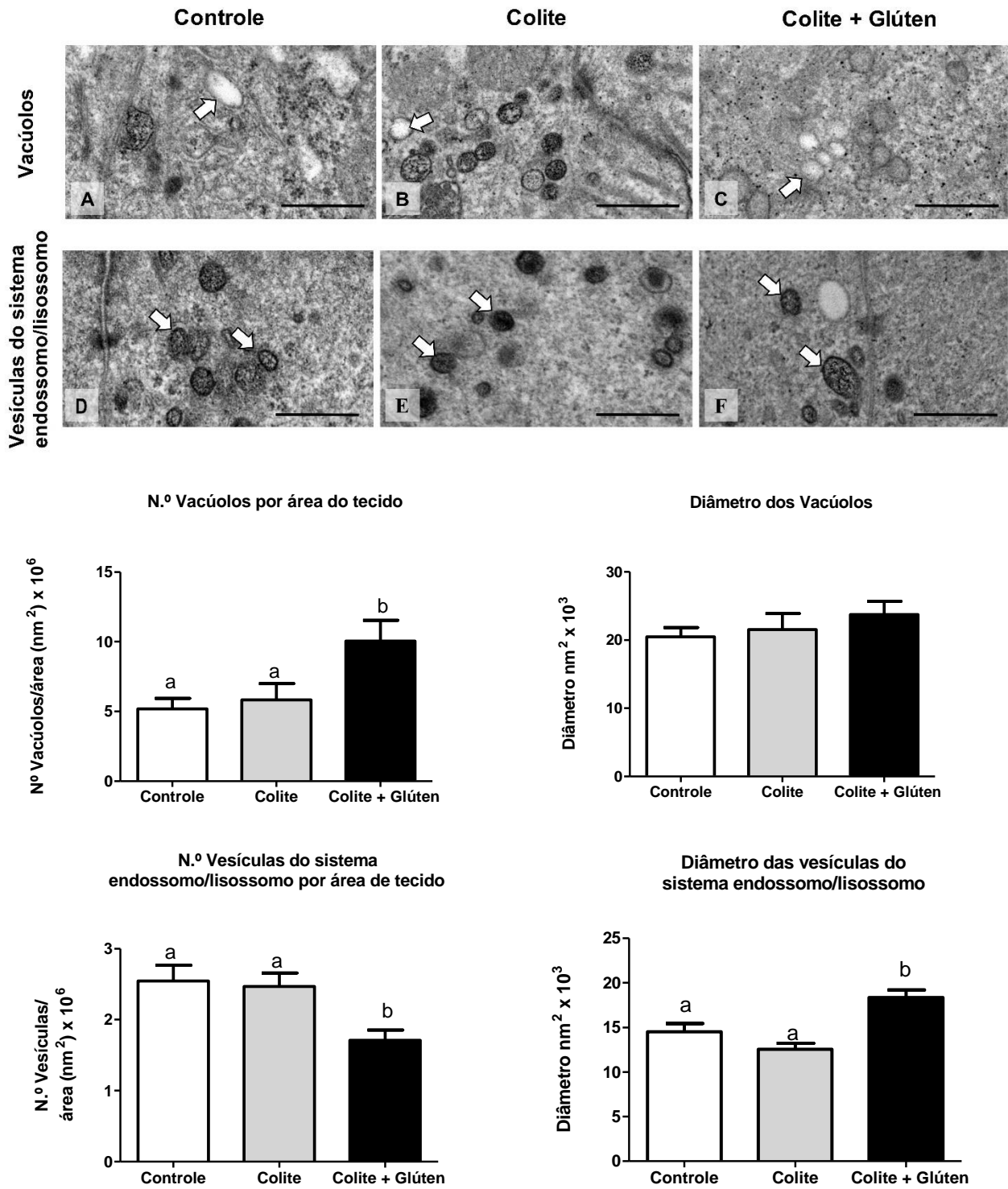


Figura 24. Estruturas citoplasmáticas do cólon. A-C. Número e diâmetro de vacúolos: números semelhantes nos grupos Controle (A) e Colite (B) e aumentados no grupo Colite+Glúten (C), diâmetro dos vacúolos semelhante para todos os grupos (A-C). D-F. Número e diâmetro de vesículas do sistema endossomo/lisossomo: números semelhantes nos grupos Controle (D) e Colite (E) e reduzidos no grupo Colite+Glúten (F), diâmetro das vesículas semelhante nos grupos Controle e Colite (D e E) e aumentado no grupo Colite+Glúten (F). Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); Resultados expressos como média ± Erro padrão (animais N= 05/05/05; imagens N~20/20/20). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05. A barra representa uma escala de 500nm.

6.9 Western Blot

Pela análise de Western blot, a expressão da proteína de junção de oclusão ocludina foi menor nos grupos Colite em relação ao grupo Controle, porém, não houve diferença em relação a esta proteína entre os grupos Colite e Colite+Glúten, o que reforça o resultado de MET encontrado anteriormente (Figura 25A). Ainda, a expressão da proteína de junção de adesão E-Caderina foi menor em ambos os grupos Colite em relação ao grupo Controle (Figura 25B), sugerindo que o aumento do espaço entre a junção de adesão observado no grupo Colite+Glúten não está associado à redução da expressão dessas proteínas.

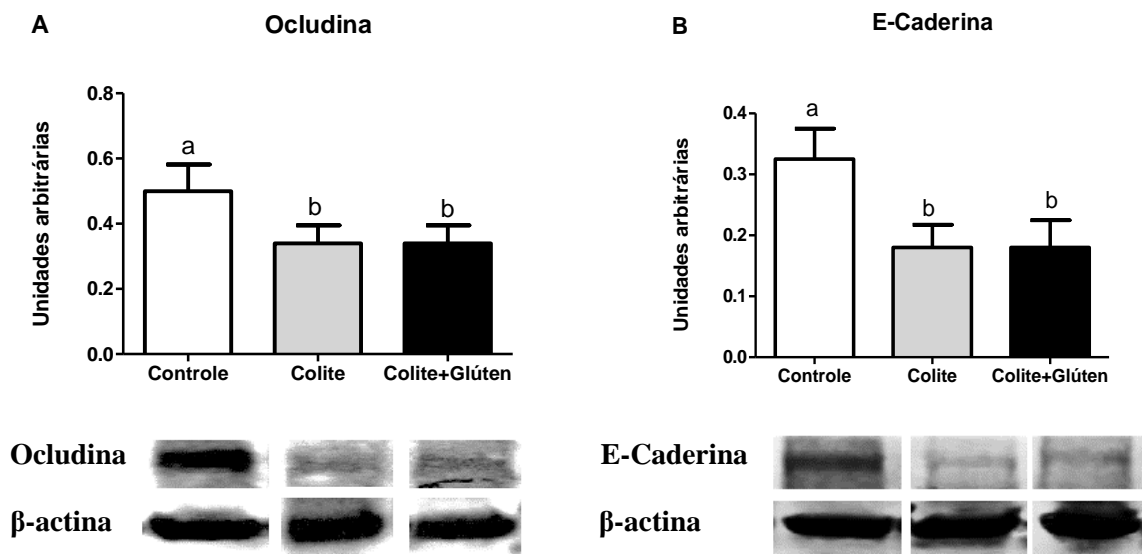


Figura 25. Proteínas do complexo juncional. A Ocludina. B. E-Caderina. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); Resultados expressos como média \pm Erro padrão (n=04/05/05). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

6.10 Imunofluorescência

Embora as proteínas de junção de adesão E-caderina e β -Catenina estejam expressas de forma similar nos grupos Colite, havia ainda a possibilidade de que elas estivessem deslocadas de seu local habitual em relação às outras proteínas. O próximo passo foi analisar as proteínas de junção de adesão E-Caderina, β -Catenina e também de α -E-Catenina presentes no epitélio do cólon por imunofluorescência.

A menor expressão da proteína E-Caderina nos grupos Colite e Colite+Glúten em relação ao grupo Controle foi confirmado por imunofluorescência. Além disso, observamos menor expressão de β -Catenina em ambos os grupos Colite. Embora a expressão dessas proteínas seja similar nos grupos Colite, observa-se que elas se encontram menos co-localizadas no grupo Colite+Glúten (Figura 26). Ainda, observamos uma menor expressão da proteína α -E-Catenina apenas no grupo Colite+Glúten. (Figura 27). Os dados referentes à intensidade de fluorescência que corroboram estatisticamente a expressão e co-localização das proteínas estão representados na Figura 28.

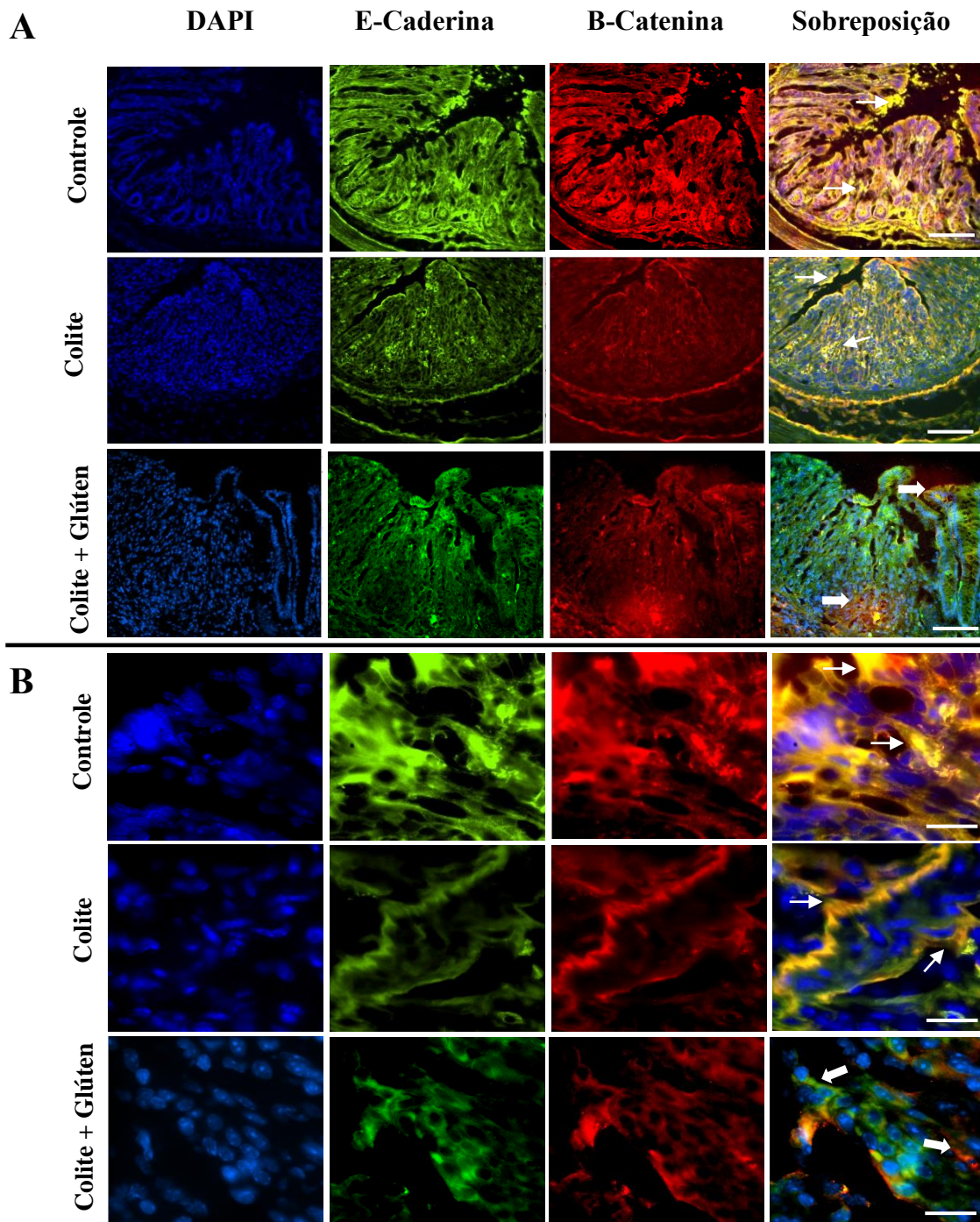


Figura 26. Expressão de proteínas de junção de adesão por imunofluorescência: E-Caderina (em verde) e β -Catenina (em vermelho). Observa-se diminuição da expressão das proteínas nos grupos Colite e Colite+Glúten. As setas finas indicam co-localização normal das proteínas nos grupos Controle e Colite e as setas grossas indicam perda da co-localização das proteínas no grupo Colite+Glúten. (A) A barra representa uma escala de 100 μ m. (B) A barra representa uma escala de 20 μ m. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); Resultados expressos como média \pm Erro padrão (animais N= 04/05/05; imagens N=16/20/20).

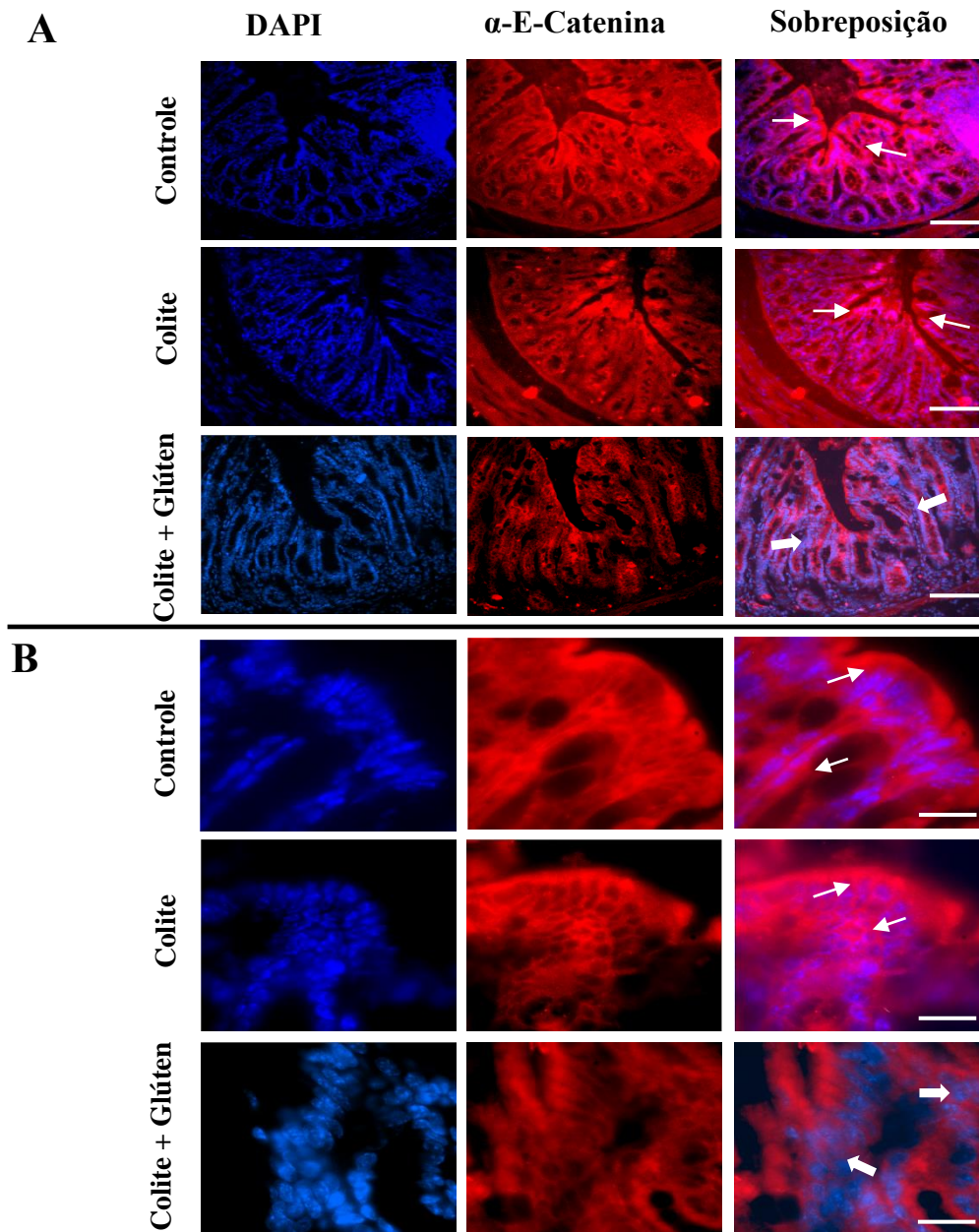


Figura 27. Proteínas de junção de adesão por imunofluorescência: α -E-Catenina (em vermelho). As setas finas indicam expressão normal da proteína nos grupos Controle e Colite e as setas grossas indicam a diminuição da expressão da proteína no grupo Colite+Glúten. (A) A barra representa uma escala de 100 μ m. (B) A barra representa uma escala de 20 μ m. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); Resultados expressos como média \pm Erro padrão (animais n= 04/05/05; imagens N=16/20/20).

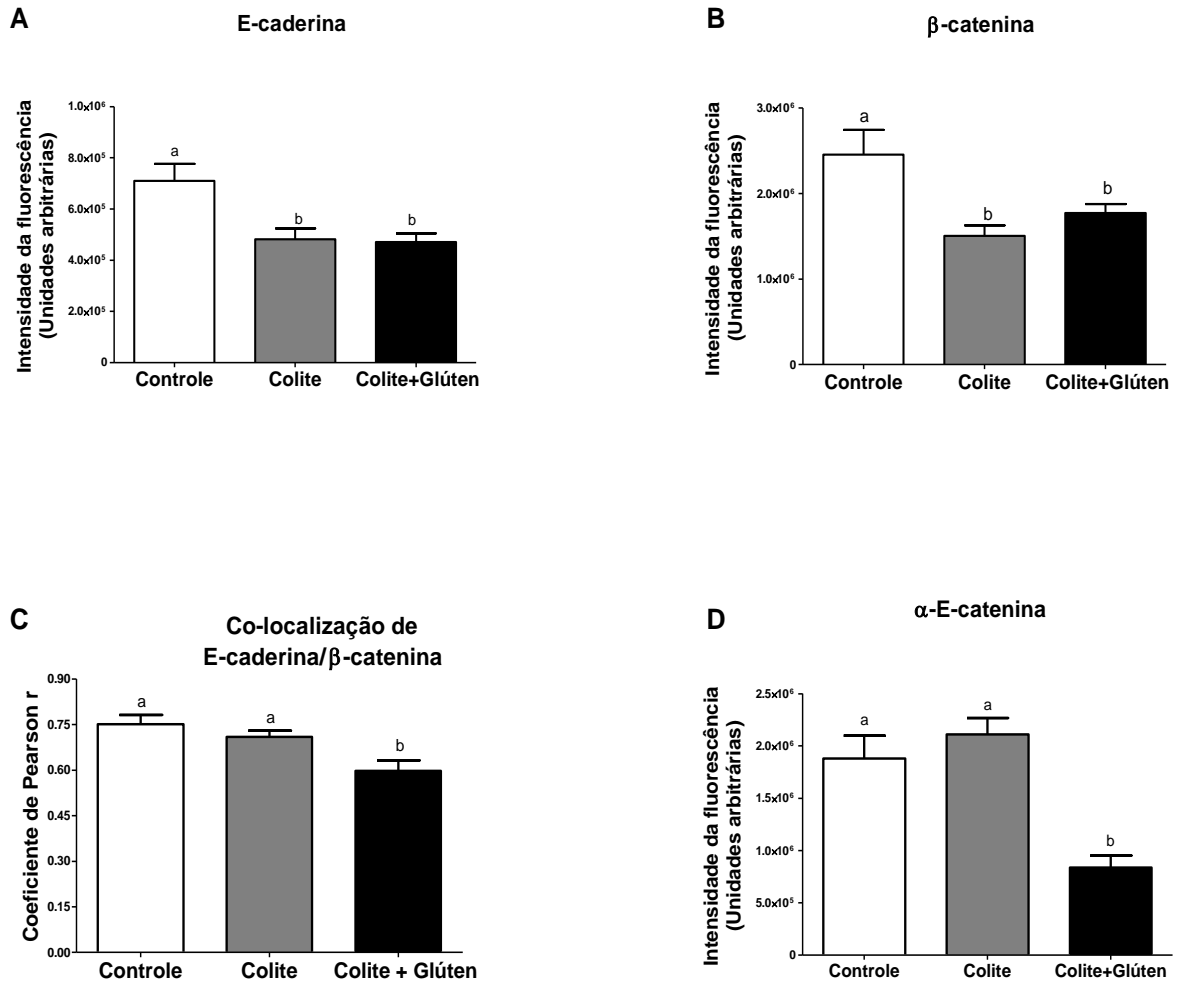


Figura 28. Quantificação da expressão das proteínas de junção de adesão por imunofluorescência. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; grupo Controle + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); Resultados expressos como média ± Erro padrão (animais n= 04/05/05; imagens n=16/20/20). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, p<0,05.

6.11 Análise da expressão gênica

A diminuição da expressão gênica da proteína α -E-Catenina foi confirmado por qPCR (Figura 29A). A expressão gênica da proteína vinculina, que faz ligação entre a α -E-Catenina e os filamentos de actina, esteve reduzida em ambos os grupos Colite em relação ao grupo Controle, o que sugere que o aumento da distância entre a junção de adesão no grupo Colite+Glúten esteja primariamente relacionado à redução da expressão de α -E-Catenina (Figura 29B).

O fato de observamos piora nos grupos Colite e não termos observado alterações no grupo Controle+Glúten (resultados iniciais) pode estar relacionado ao aumento da expressão gênica do receptor de quimiocinas CXCR3, que esteve aumentado somente em ambos os grupos Colite (Figura 29C).

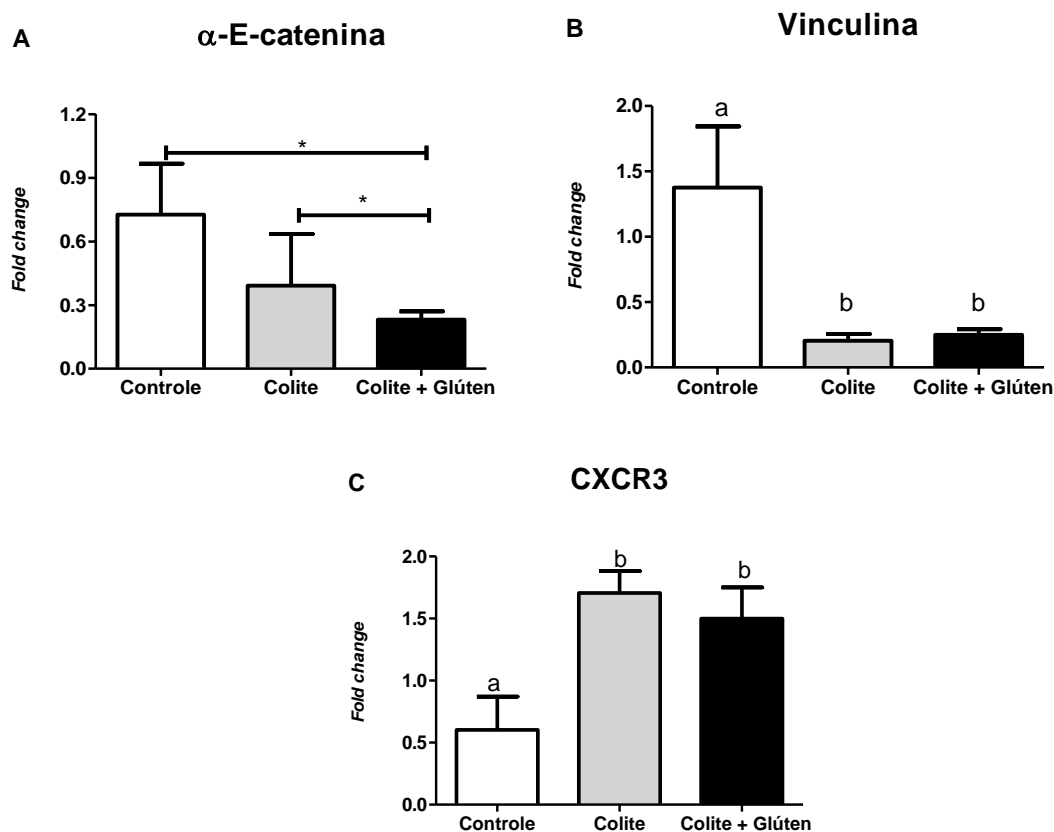


Figura 29. Expressão gênica de proteínas de junção de adesão. Grupo Controle: dieta AIN-93M e sem indução de colite; Grupo Colite: dieta AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: dieta AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); Resultados expressos como média \pm Erro padrão; animais α -E-catenina n= 03/03/04; Vinculina n=05/05/03; CXCR3 n=03/04/04. Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$.

7. Discussões

De acordo com o nosso conhecimento, este estudo é pioneiro em avaliar os efeitos do glúten e seus mecanismos associados às alterações celulares do cólon em modelo de colite experimental induzido por DSS. Nossos resultados mostram que o glúten é capaz de influenciar negativamente a evolução da colite ulcerativa. Com o objetivo de se observar possíveis efeitos do glúten de trigo, no modelo de colite experimental aguda utilizamos a concentração de 1,5% (p/v) de DSS por 7 dias e observamos moderada inflamação e baixas taxas de mortalidade. Este modelo gera uma colite moderada, útil para se estudar as fases iniciais e o desenvolvimento da colite, que acarreta manifestações clínicas semelhantes às apresentadas por pacientes com retocolite ulcerativa. Assim, em comparação aos animais dos grupos Controle, os animais dos grupos Colite apresentaram perda de peso, piora do escore clínico, alterações histopatológicas importantes como perda da integridade da mucosa e depleção de células caliciformes.

Em relação aos resultados encontrados nos experimentos iniciais, no que se refere aos grupos Controle + Glúten e Controle + Farinha de trigo, dentre os parâmetros avaliados (variação ponderal, escore clínico e comprimento do cólon), nenhum resultado foi diferente do grupo Controle. O mesmo aconteceu em relação ao grupo Colite + Farinha de trigo, ao compará-lo ao grupo Colite. Desta forma, supõe-se que os efeitos deletérios na colite encontrados neste estudo sejam provenientes especificamente do glúten e não de outros componentes da farinha trigo, como FODMAP's e ATI's. Salienta-se que as farinhas brasileiras são suplementadas com ferro e ácido fólico, que podem exercer efeitos protetores na mucosa intestinal (Biasco e Di Marco, 2005). Além disso, a farinha de trigo pode conter amido resistente cuja fermentação pelas bactérias do intestino grosso pode gerar butirato de sódio, ácido graxo de cadeia curta com benefícios já comprovados na colite (Vieira, Leonel, Sad, Beltrao, *et al.*, 2012; Ashwar *et al.*, 2015). Dessa forma, os resultados e as discussões são referentes aos grupos Controle, Colite e Colite+Glúten. Entretanto, além dos resultados já descritos anteriormente, resultados de permeabilidade intestinal referente a esses grupos estão disponíveis no apêndice 1.

Observou-se que a gravidade da colite foi aumentada no grupo Colite + Glúten a partir do 2.º dia até o último dia de administração de DSS, com diminuição da consistência das fezes e presença de sangue fecal. Os animais que ingeriram glúten foram os únicos que apresentaram sangramento retal. Esse fato é incomum no caso de colite induzida por DSS em doses entre 1,5-2,5% (Vieira, Leonel, Sad, Beltrao, *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2015), sendo mais frequente

quando administrado em doses entre 3,0-10% (Okayasu *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2014).

Na análise de infiltrado inflamatório, observou-se maior infiltração de neutrófilos no cólon dos animais dos grupos Colite, especialmente no grupo que recebeu glúten. Estudo realizado por Lammers *et al.*, demonstrou que a gliadina pode induzir o recrutamento de neutrófilos por meio da indução da liberação de IL-8 e de outras quimiocinas da família CXC (Lammers Km 2015). Como o glúten aumentou o infiltrado de neutrófilos, sugere-se uma possível atuação da proteína na ativação desta célula, encontrados predominantemente em tecidos inflamados, reação que pode estar exacerbada na colite.

Por outro lado, não foram observadas alterações na concentração de macrófagos, independentemente da presença de colite ou glúten. Esta característica também foi observada em estudos anteriores do nosso grupo (Vieira, Leonel, Sad, Beltrao, *et al.*, 2012) provavelmente relacionado ao nosso modelo experimental (tempo de indução e concentração de DSS).

Aumento de migração de eosinófilos é relatado na RCU (Moshkovits *et al.*, 2016) e também em processos alérgicos envolvendo a gliadina (Bodinier *et al.*, 2009). Embora em nosso estudo não tenha havido aumento significativo de eosinófilos no grupo Colite, provavelmente devido à menor concentração de DSS utilizada (1,5% p/v), pudemos observar aumento no grupo Colite + Glúten. O aumento de eosinófilo em pacientes com RCU parece estar relacionado à gravidade da doença (Sangfelt *et al.*, 2001). Análises clínicas de biópsia do intestino de pacientes com RCU revelaram a presença aumentada de proteínas catiônicas produzidas pelos eosinófilos, como a peroxidase eosinofílica (EPO), e demonstraram a correlação entre o seu aumento e o aumento da lesão tecidual (Jeziorska *et al.*, 2001). Em estudos *in vitro* foram observados que fragmentos de gliadina também são capazes de estimular várias populações de células inatas, incluindo eosinófilos, sugerindo um possível potencial alergênico do glúten, o que poderia contribuir ainda mais para o agravamento da colite (Palova-Jelinkova *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2015).

Além do encurtamento do comprimento do cólon, observou-se piora do escore histopatológico nos animais dos grupos Colite e, embora a intensidade da lesão tenha sido semelhante, o grupo que recebeu glúten (Colite + Glúten) apresentou maior extensão da lesão, quando comparado ao grupo isento (Colite). Tanto a piora do escore clínico quanto a maior extensão da inflamação da mucosa colônica no grupo Colite + Glúten podem ser devido à

hiperosmolaridade ou ao aumento da permeabilidade das células intestinais causado pela colite em combinação à ingestão de glúten. Por ser apenas parcialmente digerido pelas enzimas do trato gastrointestinal, pode ocorrer acúmulo de peptídeos potencialmente tóxicos ao lúmen como alguns peptídeos de gliadina. Estudos prévios demonstram que a gliadina não é completamente degradada pelas enzimas pepsina e tripsina, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (modelos murinos) (Shan *et al.*, 2002), o que pode acarretar em aumento da osmolaridade por persistência do conteúdo mal digerido na luz intestinal. Soma-se a isso o fato de que, na inflamação do cólon, já há aumento da osmolaridade intestinal, visto que a capacidade absorptiva das células está diminuída (Schwartz *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2014).

O glúten também aumentou a permeabilidade intestinal no grupo Colite + Glúten. Há evidências de que a gliadina, ao se ligar no receptor CXCR3, ativa uma via de sinalização por meio da liberação de um peptídeo intestinal, a zonulina, o que resulta em redução imediata da função da barreira intestinal, principalmente em pacientes intolerantes ao glúten (Fasano *et al.*, 2000), e em menores proporções em indivíduos saudáveis (Fasano *et al.*, 2000; Drago *et al.*, 2006). O mecanismo com o qual a zonulina aumenta a permeabilidade intestinal parece estar relacionado à reorganização dos filamentos de actina e alteração da expressão de proteínas de junção de oclusão (Sander *et al.*, 2005). A expressão gênica do receptor de gliadina e de quimiocinas CXCR3, estava aumentada em ambos os grupos Colite em relação ao grupo Controle. Como esse receptor exerce um importante papel inflamatório na colite, talvez isso explique porque não encontramos piora dos primeiros parâmetros avaliados no início dos trabalhos (variação ponderal, escore clínico e comprimento do cólon) no grupo Controle+Glúten, já que fora do ambiente inflamatório este receptor permanece a níveis fisiológicos vistos no grupo Controle. O glúten poderia exacerbar os efeitos da colite por meio da ligação de gliadina ao receptor CXCR3, provocando alterações na junção de oclusão (Lammers *et al.*, 2008). No entanto, em nosso estudo, o aumento da permeabilidade não parece estar relacionado às junções de oclusão e sim a alterações da junção de adesão, como discutiremos mais adiante. Isto porque encontramos redução da expressão gênica de ocludina em ambos os grupos Colite em relação ao grupo controle, mas não houve maior redução no grupo Colite + Glúten em relação ao grupo Colite, sugerindo que a junção de oclusão parece não ter sido alterada pelo glúten e sim pelo processo inflamatório em si.

Além do aumento da permeabilidade, possivelmente devido aos efeitos da gliadina pela via paracelular, a via transcelular também parece estar comprometida. Os resultados das

imagens cintilográficas de translocação bacteriana, após 45 minutos e 2 horas, mostraram acúmulo de radioatividade na região abdominal, porém, com um padrão de dispersão de radiação diferente no grupo Colite + Glúten em relação aos demais. Isso provavelmente pode ser explicado pelos resultados de contagem de radiação gama encontrados, 2 e 4 horas após gavagem de solução de $^{99m}\text{Tc-E. coli}$. Além do aumento da translocação bacteriana total observado no grupo Colite + Glúten, observou-se após 2 horas maiores quantidades de bactérias no fígado e pulmão, e após 4 horas no fígado, baço, linfonodo e pulmão.

A retocolite ulcerativa é uma condição de estresse que geralmente está associada tanto ao aumento da permeabilidade quanto da translocação bacteriana. Ainda, a translocação bacteriana pode ocorrer em decorrência de falhas da barreira e do aumento da permeabilidade intestinal e ambas parecem ser potencializadas pelo glúten ou seus fragmentos. Ao analisarmos os resultados de translocação bacteriana, observamos que o grupo Colite + Glúten parece ter perfil de translocação tanto pela via paracelular (via sistema porta-hepático), quanto pela via transcelular (via linfonodos mesentéricos). O mesmo não é observado no grupo Colite, cujo perfil de translocação parece ter sido predominantemente paracelular, já que havia mais bactérias no sangue e não nos órgãos nos tempos avaliados. Além disso, pelo padrão de dispersão da radiação (maior esvaziamento gástrico) observado nas imagens e por encontrarmos mais bactérias presentes nos órgãos nos tempos analisados, é possível que a translocação das bactérias tenha ocorrido de forma mais rápida no grupo Colite + Glúten, o que pode indicar uma provável ação deletéria do glúten no cólon inflamado.

Em indivíduos sadios, baixos níveis de translocação bacteriana são esperados, pois é um processo necessário para geração de células do sistema imune e que contribui para manutenção da homeostase intestinal (Schmitz *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2015). Porém em casos patológicos, como na RCU, pode haver falhas nos mecanismos de defesa e que podem ser agravadas pelo glúten, propiciando a entrada e sobrevivência de bactérias em sítios extra intestinais e, conseqüentemente, aumentando os riscos de infecções sistêmicas (Salim e Soderholm, 2011).

O mecanismo pelo qual o glúten piora a permeabilidade intestinal e aumenta a translocação bacteriana na colite parece estar relacionado ao aumento do transporte transcelular e principalmente paracelular, especialmente na junção aderente e desmossomos. Sabe-se que a gliadina pode levar à alteração da junção de oclusão por um mecanismo relacionado à liberação

de zonulina e reorganização de filamentos de actina (Sander *et al.*, 2005; Drago *et al.*, 2006; Hollon *et al.*, 2015). Nos pacientes celíacos, alteração dos mecanismos de transporte paracelular e transcelular podem estar relacionados à gliadina. No entanto, propõe-se que a gliadina primeiro deva atravessar a junção de oclusão antes de ser absorvida pela via transcelular (Sander *et al.*, 2005). Em nosso estudo, observamos por MET o aumento entre as junções de oclusão em ambos os grupos Colite. No entanto, houve aumento significativo na distância entre as junções de adesão e desmossomos nos animais do grupo Colite + Glúten. Acreditamos que o dano imposto na junção de oclusão devido à colite permitiu maior absorção paracelular de bactérias, moléculas e fragmentos de gliadina ou glúten, causando fragilidade tanto das junções de adesão quanto nos desmossomos.

Estudos relacionados ao glúten, proteínas do complexo juncional e tráfico intracelular de moléculas são escassos e quando relatados estão relacionados à doença celíaca. Embora os mecanismos patológicos subjacentes à doença celíaca tenham sido investigados, pouco se sabe sobre as primeiras interações e efeitos da gliadina no epitélio intestinal que ocorrem antes de causar danos à mucosa (De Re *et al.*, 2013).

Detalhes em relação as proteínas do complexo juncional foram melhores esclarecidos ao analisarmos algumas proteínas do complexo juncional por imunofluorescência, western blot e qPCR, confirmando os resultados obtidos por MET. A menor expressão gênica da proteína ocludina pode ter ocasionado o aumento da distância em as junções de oclusão nos grupos Colite. Esse resultado é coerente tanto com estudos relacionados a pacientes com DII's (Bruewer *et al.*, 2006; Shawki e Mccole, 2017), quanto a pacientes com doença celíaca (Ménard *et al.*, 2010; Fasano, 2012).

As proteínas de junção de adesão E-caderina e β -catenina também foram menos expressas em ambos grupos Colite. As imagens de imunofluorescência foram corroboradas tanto pela análise da intensidade da expressão das proteínas quanto pelos resultados de western blot. Ainda, embora não tenha havido diferença na expressão dessas proteínas entre os grupos Colite e Colite + Glúten, as análises de imunofluorescência evidenciam que elas não estão colocalizadas no grupo Colite + Glúten. Em um estudo feito por Sander *et al.*, 2005, que avaliou se a gliadina poderia alterar a função da barreira epitelial em cultura de células Caco-2, observou-se redução na expressão de E-caderina e também de ocludina (junção de oclusão), diminuindo a resistência transepitelial e aumentando a permeabilidade a pequenas moléculas.

Em um modelo *in vitro* de doença celíaca, Bidmon-Fliegenschnee *et al.* avaliaram a lesão do citoesqueleto de células Caco-2 expostas à gliadina e verificaram que houve destruição de E-caderina e de ezirina, proteína intermediária entre o citoesqueleto de actina e a membrana citoplasmática das células e que tem importante papel na estruturação das microvilosidades (Bidmon-Fliegenschnee *et al.*, 2015). Diminuição das proteínas E-caderina e β -catenina também foi observada em pacientes com RCU. Com objetivo de investigar as expressões de E-caderina, p120 catenina, β -catenina e NF- κ B nos tecidos de pacientes com RCU, Zhang *et al.* verificaram que, com excessão de NF- κ B que foi hiperexpresso, essas proteínas apresentaram expressão reduzida (Zhang *et al.*, 2015). Em modelos animais de colite induzida por DSS, diminuição na expressão de E-caderina foi associada a maior perda de peso, inflamação exacerbada e maior dano na mucosa, concluindo-se que esta proteína pode desempenhar um papel importante na patogênese de ulcerações na colite (Grill *et al.*, 2015).

Já a proteína α -E-catenina foi menos expressa apenas no grupo Colite + Glúten, sugerindo que a redução desta proteína pode estar associada ao aumento da distância entre as junções de adesão e também à localização errada das proteínas E-caderina e β -catenina encontrados neste grupo. A α -E-catenina desempenha um papel crucial na adesão mediada por E-caderina pela ligação à β -catenina, filamentos de actina e vinculina e sua disfunção está ligada ao enfraquecimento da junção de adesão das células epiteliais e podem estar relacionadas a maior grau de inflamação e maior atividade de DII's. (Vermeulen *et al.*, 1995; Karayiannakis *et al.*, 1998; Li, Newhall, *et al.*, 2015). Além da desestabilização da junção de adesão, a menor expressão de α -E-catenina pode levar ao aumento da proliferação de células tumorais e está associada a estágios mais agressivos e metástase de câncer de mama e cólon. Embora os mecanismos subjacentes a essa regulação não sejam compreendidos, a α -E-catenina está envolvida em múltiplos caminhos de sinalização que regulam a proliferação celular, incluindo Ras/MAPK e NF- κ B, além de afetar a taxa de apoptose (Kobiellak e Fuchs, 2004; Benjamin e Nelson, 2008; Choi *et al.*, 2013). A localização apropriada das proteínas do complexo juncional é crucial, pois fornece o contexto fisiológico para a sua função. A localização errada dessas proteínas pode ocorrer devido a mutação, expressão alterada da própria proteína ou de receptores de transporte ou por desregulação de componentes da maquinaria celular, característica proeminente em muitas doenças (Hung e Link, 2011). A proteína α -E-catenina se conecta a E-caderina por β -catenina e faz a ligação destas com a vinculina e aos filamentos de actina (Thiery e Sleeman, 2006). Sugere-se que a menor expressão de α -E-catenina pode ter

alterado a localização das proteínas E-caderina e β -catenina e, conseqüentemente, causado o enfraquecimento da junção de adesão.

A proteína vinculina, que faz a ligação entre a α -E-catenina e filamentos de actina foi expressa em menor quantidade nos grupos Colite em relação ao grupo Controle, no entanto, não houve diferença em relação aos grupos Colite e Colite + Glúten, o que sugere que o aumento da distância entre as junções de adesão deve estar relacionado primariamente à redução de α -E-catenina e não à esta proteína de ligação aos filamentos de actina.

A proteína α -E-catenina também está envolvida na interação com os desmossomos. Estudo realizado por Taniguchi *et al.* demonstrou que a região intermediária ou carboxi-terminal da α -E-catenina era necessária para a formação de desmossomo e que a interação da α -E-catenina e actina funciona na montagem de desmossomos nas células epiteliais (Taniguchi *et al.*, 2005). Ainda, a localização específica dos complexos de placoglobina provavelmente depende da sua capacidade de se ligar à α -E-catenina (Choi *et al.*, 2009). Vasioukhin *et al.* criaram um modelo murino que não expressava α -E-catenina. Durante o desenvolvimento embrionário esses animais apresentaram diminuição do desenvolvimento do folículo piloso e a arquitetura da pele foi alterada. Na epiderme a formação da junção aderente pareceu comprometida, e, embora os complexos E-caderina e β -catenina ainda estivessem localizados nas bordas das células, os desmossomos mantiveram o epitélio frouxamente juntos. O estudo também apresentou evidências de que o enfraquecimento dos desmossomos se deu devido a defeitos na polaridade epidérmica e da proliferação celular em consequência direta e específica da diminuição de α -E-catenina (Vasioukhin *et al.*, 2001). Nossos resultados mostram que, além da junção aderente, o afrouxamento dos desmossomos também foi maior no grupo Colite+Glúten. Sugerimos que o mecanismo pelo qual isto pode ter acontecido pode estar relacionado à redução da expressão de α -E-catenina. Entretanto, acreditamos que sejam necessários estudos que avaliem diretamente as proteínas que compõem os desmossomos para que este mecanismo fique melhor esclarecido.

Não há estudos que relacionem o glúten ou seus fragmentos à baixa expressão específica de α -E-catenina ou às proteínas dos desmossomos. No entanto, em nosso modelo de colite experimental, o glúten exerceu efeito deletério na colite e provocou alterações na arquitetura mucosa por meio do aumento da distância entre as junções aderentes e desmossomos. O mecanismo parece estar relacionado à redução de α -E-catenina, proteína que está associada a

maior grau de inflamação e maior atividade de DII's e que tem papel fundamental na estabilização da junção aderente. Ainda, acredita-se que a baixa expressão de α -E-catenina pode ter levado à localização errônea das proteínas E-caderina e β -catenina e ao enfraquecimento dos desmossomos, já que participa de sua formação.

Em conjunto nossos resultados reforçam a hipótese de que não só a via de passagem paracelular esteja prejudicada, mas também a via transcelular, já que a maior área lesada pode propiciar a passagem de antígenos e bactérias provenientes do lúmen intestinal por meio de endossomos ou exossomos (ver abaixo). Esta hipótese também é corroborada pelos resultados sobre os vacúolos e vesículas do sistema endossomo/lisossomo. O número de vacúolos foi maior no grupo Colite+Glúten, sugerindo maior atividade endocítica, e, as vesículas do sistema endossomo/lisossomo, embora estivessem em menor número no citoplasma, tiveram aumento de diâmetro, o que pode indicar maior atividade lítica e com provável formação de lisossomos em estágio mais tardio. Antígenos e bactérias podem atravessar a barreira epitelial através de vias paracelulares reguladas por junções de oclusão, e, alternativamente, podem passar pela camada transcelular por endocitose (Zimmermann *et al.*, 2014). Além dos efeitos de imunogenicidade, alguns autores propõe que a gliadina possa afetar diretamente o epitélio intestinal, induzindo atrofia de vilosidades, o que acarretaria em maior dano às microvilosidades (no caso do cólon) e conseqüente aumento do tráfico intracelular de moléculas (De Re *et al.*, 2013). Após a absorção intracelular, os conteúdos do vacúolo endocítico, que podem conter fragmentos de gliadina, são degradados pelos lisossomos e depois liberados sob a forma de aminoácidos ou produtos de degradação. No entanto, parte desse conteúdo pode atravessar todo o citoplasma por transcitose ou, ainda, envolvidos por exossomas, onde serão enriquecidos com MHC-II. Em ambos os casos, esses antígenos podem se difundir pela membrana plasmática e estimular células imunes locais, levando ao aumento do processo inflamatório e maior dano tecidual (Ménard *et al.*, 2010). Sugere-se, portanto, que um dos mecanismos que fazem com o glúten exacerbe os efeitos da colite seja pela via transcelular, já que o ambiente de lesão é propício para a internalização da gliadina e onde observamos maior atividade de vacúolos e vesículas da rota endocítica. Logo, acredita-se que, os estudos das alterações das microvilosidades, dos vacúolos e das vesículas do sistema endossomo/lisossomo, aliado às alterações do complexo juncional, especialmente das proteínas de junção de adesão e desmossomos, sejam caminhos promissores para futuros estudos que possam elucidar sobre os mecanismos pelos quais o glúten exacerba os efeitos da colite.

O glúten de trigo demonstrou exercer interferência nociva durante a colite. No entanto, ainda é preciso esclarecer melhor quais os mecanismos mediados por ele. Espera-se que este estudo, em um modelo de colite experimental, potencialmente possa elucidar sobre os efeitos do glúten e que abra novos caminhos de investigação relacionados para se obter uma abordagem terapêutica mais segura e eficiente quanto ao tratamento de pacientes com retocolite ulcerativa.

8. Conclusão

Nossos resultados mostram que o glúten, especificamente, exerce efeito deletério na colite, com piora do escore clínico (inclusive com presença de sangramento retal), aumento no recrutamento das células efetoras neutrófilos e eosinófilos, importantes em doenças inflamatórias intestinais e aumento da extensão da inflamação na mucosa intestinal. Todos esses fatores contribuíram para o aumento da permeabilidade intestinal, aumento da translocação bacteriana, tanto pela via paracelular quanto transcelular. O mecanismo pelo qual o glúten exacerba a colite parece estar relacionado às alterações na junção de adesão e desmossomos, especialmente à proteína α -E-catenina. Essas alterações comprometem a localização e eficiência das funções de E-caderina, β -catenina e dos desmossomos, desestruturando o complexo juncional. Soma-se a isso o maior dano epitelial causando pelo glúten, com alteração das microvilosidades, maior quantidade de vacúolos digestivos e alteração do sistema endossomo/lisossomo.

9. Perspectivas

Com o objetivo de estudar melhor os mecanismos pelos quais o glúten exerce efeito deletério no epitélio colônico durante a colite, as perspectivas sugeridas para este trabalho são:

- Análise dos filamentos de actina por imunofluorescência e western blot;
- Análise da expressão e localização de outras proteínas de junção aderente e desmossomos por imunofluorescência e western blot;
- Análise de estruturas citoplasmáticas por microscopia eletrônica de transmissão;
- Análise da interação dos fragmentos de gliadina e organelas celulares por microscopia eletrônica de transmissão;
- Estudo *in vitro* utilizando gliadina purificada para avaliar as vias moleculares envolvidas no processo de alteração das proteínas do complexo juncional e de vesículas do sistema endossomo/lisossomo.

10. Apêndice

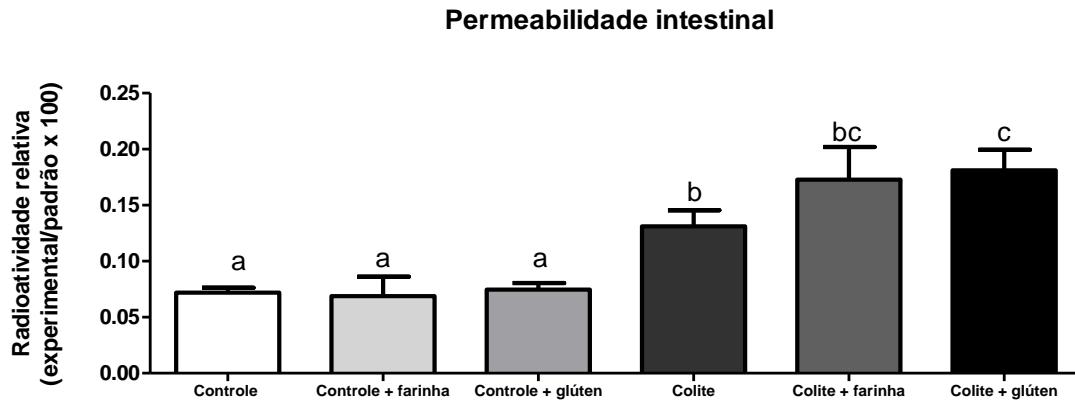


Figura A. Determinação da permeabilidade intestinal usando DTPA marcado com Tecnécio. Grupo Controle: AIN-93M e sem indução de colite; grupo Controle + Glúten: AIN-93M com 4,5% de glúten; grupo Controle + Farinha: AIN-93M com farinha de trigo; Grupo Colite: AIN-93M e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Glúten: AIN-93M com 4,5% de glúten e com indução de colite (DSS 1,5% p/v); grupo Colite + Farinha: AIN-93M com farinha de trigo e com indução de colite (DSS 1,5% p/v). Resultados expressos como média ± Erro padrão, em porcentagem de dose encontrada no sangue (n= 08/10/05/10/08/04). Teste: One-way Anova e pós-teste Newman-keuls. Letras diferentes representam diferença estatística, $p < 0,05$

11. Referências bibliográficas

ABADIE, V.; JABRI, B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. **Immunol Rev**, v. 260, n. 1, p. 221-34, Jul 2014. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24942692> >.

ABRAHAM, B. P. Symptom management in inflammatory bowel disease. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, p. 1-15, Apr 2015. ISSN 1747-4132. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905569> >.

ANDRADE, M. E. et al. Pretreatment and Treatment With L-Arginine Attenuate Weight Loss and Bacterial Translocation in Dextran Sulfate Sodium Colitis. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, Apr 2015. ISSN 0148-6071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855577> >.

ANDRADE, M. E. R. **Ação da arginina na permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e resposta imune local, em modelo experimental de colite ulcerativa.** 2013. 88 (Dissertação de Mestrado). Ciências de Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

_____. **Ação da arginina na proteção da colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrano** 2016. 125 (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ASHWAR, B. A. et al. Preparation, health benefits and applications of resistant starch—a review. **Starch - Stärke**, v. 68, n. 3-4, p. 287-301, 2015. ISSN 1521-379X. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/star.201500064/abstract> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/star.201500064/full> >. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/star.201500064/pdf> >.

AZIZ, I. et al. A study evaluating the bidirectional relationship between inflammatory bowel disease and self-reported non-celiac gluten sensitivity. **Inflamm Bowel Dis**, v. 21, n. 4, p. 847-53, Apr 2015. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719528> >.

AZIZ, I.; HADJIVASSILIOU, M.; SANDERS, D. S. The spectrum of noncoeliac gluten sensitivity. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 9, p. 516-26, Sep 2015. ISSN 1759-5053. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122473> >.

BENJAMIN, J. M.; NELSON, W. J. Bench to bedside and back again: molecular mechanisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 1, p. 53-64, Feb 2008. ISSN 1044-579X (Print)1044-579x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.08.003> >.

BERTHOL, D.; FEIDT, C.; BRUN BELLUT, J. Effect of low continuous ⁹⁹Tc intake on its absorption and metabolism in young rats. **J Environ Radioact**, v. 67, n. 3, p. 169-80, 2003. ISSN 0265-931X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691716> >.

BIASCO, G.; DI MARCO, M. C. Folate and prevention of colorectal cancer in ulcerative colitis. **Eur J Cancer Prev**, v. 14, n. 4, p. 395-8, Aug 2005. ISSN 0959-8278 (Print)0959-8278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BIDMON-FLIEGENSCHNEE, B. et al. Overexpression of Hsp70 confers cytoprotection during gliadin exposure in Caco-2 cells. **Pediatric Research**, v. 78, n. 4, p. 358, 2015-06-18 2015. ISSN 1530-04471530-0447. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/pr2015112> >.

BIESIEKIERSKI, J. R. et al. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Am J Gastroenterol**, v. 106, n. 3, p. 508-14; quiz 515, Mar 2011. ISSN 1572-0241. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224837> >.

_____. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. **Gastroenterology**, v. 145, n. 2, p. 320-8.e1-3, Aug 2013. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23648697> >.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. São Paulo, Brasil: 2001. 143.

BODINIER, M. et al. Sensitization and elicitation of an allergic reaction to wheat gliadins in mice. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 4, p. 1219-25, Feb 2009. ISSN 1520-5118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19170508> >.

BRUEWER, M.; SAMARIN, S.; NUSRAT, A. Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1072, p. 242-52, Aug 2006. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057204> >.

CATELAN, T. T. T. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. 2017. Disponível em: < http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4053 >.

CHAMI, B. et al. The role of CXCR3 in DSS-induced colitis. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101622, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101622> >.

CHOI, H. J. et al. Interactions of Plakoglobin and β -Catenin with Desmosomal Cadherins: BASIS OF SELECTIVE EXCLUSION OF α - AND β -CATENIN FROM DESMOSOMES*. In: (Ed.). **J Biol Chem**, v.284, 2009. p.31776-88. ISBN 0021-9258 (Print)1083-351X (Electronic).

CHOI, S. H. et al. α -Catenin interacts with APC to regulate β -catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes. **Genes Dev**, v. 27, n. 22, p. 2473-88, Nov 15 2013. ISSN 0890-9369 (Print)1549-5477 (Electronic). Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1101/gad.229062.113> >.

COOPER, B. T. et al. Proceedings: Chronic diarrhoea and gluten sensitivity. **Gut**, v. 17, n. 5, p. 398, May 1976. ISSN 0017-5749. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1278762> >.

COSTA, D. V. D. S. **Role of S100 β /RAGE/NF κ B pathway in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: dysregulation of enteric glia and neurons.** Fortaleza, p.155. 2016

CRUVINEL, W. D. M. et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010. ISSN 0482-5004. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008&nrm=iso >.

DANESE, S.; FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 30, p. 4807-12, Aug 2006. ISSN 1007-9327. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16937461> >.

DAS, P. et al. Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: a new perspective. **Virchows Arch**, v. 460, n. 3, p. 261-70, Mar 2012. ISSN 1432-2307. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297703> >.

DAULATZAI, M. A. Non-celiac gluten sensitivity triggers gut dysbiosis, neuroinflammation, gut-brain axis dysfunction, and vulnerability for dementia. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 110-31, 2015. ISSN 1996-3181. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642988> >.

DE ANGELIS, M. et al. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 1, p. 80-93, Jan 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311022> >.

DE GIORGIO, R.; VOLTA, U.; GIBSON, P. R. Sensitivity to wheat, gluten and FODMAPs in IBS: facts or fiction? **Gut**, v. 65, n. 1, p. 169-78, Jan 2016. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26078292> >.

DE LORGERIL, M.; SALEN, P. Gluten and wheat intolerance today: are modern wheat strains involved? **Int J Food Sci Nutr**, v. 65, n. 5, p. 577-81, Aug 2014. ISSN 1465-3478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524657> >.

DE PALMA, G. et al. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. **Br J Nutr**, v. 102, n. 8, p. 1154-60, Oct 2009. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445821> >.

DE PUNDER, K.; PRUIMBOOM, L. The dietary intake of wheat and other cereal grains and their role in inflammation. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 771-87, Mar 2013. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482055> >.

DE RE, V. et al. The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. **Clin Biochem**, v. 46, n. 6, p. 552-60, Apr 2013. ISSN 0009-9120. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.038> >.

DELVA, E.; TUCKER, D. K.; KOWALCZYK, A. P. The desmosome. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 2, p. a002543, Aug 2009. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066089> >.

DRAGO, S. et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. **Scand J Gastroenterol**, v. 41, n. 4, p. 408-19, Apr 2006. ISSN 0036-5521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635908> >.

FARRUKH, A.; MAYBERRY, J. F. Inflammatory bowel disease in Hispanic communities: a concerted South American approach could identify the aetiology of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Arq Gastroenterol**, v. 51, n. 4, p. 271-5, 2014 Oct-Dec 2014. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591153> >.

FASANO, A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. **Physiol Rev**, v. 91, n. 1, p. 151-75, Jan 2011. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248165> >.

_____. Leaky gut and autoimmune diseases. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 42, n. 1, p. 71-8, Feb 2012. ISSN 1559-0267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22109896> >.

FASANO, A. et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. **Lancet**, v. 355, n. 9214, p. 1518-9, Apr 2000. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801176> >.

_____. Nonceliac gluten sensitivity. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1195-204, May 2015. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25583468> >.

FREIRE, R. H. et al. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. **Int J Obes (Lond)**, Oct 2015. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443339> >.

GRILL, J. I. et al. Intestinal E-cadherin Deficiency Aggravates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. **Dig Dis Sci**, v. 60, n. 4, p. 895-902, Apr 2015. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-015-3551-x> >.

GROOM, J. R.; LUSTER, A. D. CXCR3 in T cell function. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 5, p. 620-31, Mar 10 2011. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.017> >.

HAFSTRÖM, I. et al. A vegan diet free of gluten improves the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: the effects on arthritis correlate with a reduction in antibodies to food antigens. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, n. 10, p. 1175-9, Oct 2001. ISSN 1462-0324. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600749> >.

HARTSOCK, A.; NELSON, W. J. Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n. 3, p. 660-9, Mar 2008. ISSN 0006-3002 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012> >.

HAWRELAK, J. A.; MYERS, S. P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Altern Med Rev**, v. 9, n. 2, p. 180-97, Jun 2004. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253677> >.

HERFARTH, H. H. et al. Prevalence of a gluten-free diet and improvement of clinical symptoms in patients with inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 20, n. 7, p. 1194-7, Jul 2014. ISSN 1536-4844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24865778> >.

HOLLON, J. et al. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1565-76, Mar 2015. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734566> >.

HUNG, M.-C.; LINK, W. Protein localization in disease and therapy. 2011-10-15 2011. Disponível em: < <http://jcs.biologists.org/content/124/20/3381> >.

JACKSON, F. W. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects - comment by Jackson. **Br J Nutr**, v. 104, n. 5, p. 773, Sep 2010. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465858> >.

JEZIORSKA, M. et al. Distribution and activation of eosinophils in inflammatory bowel disease using an improved immunohistochemical technique. **J Pathol**, v. 194, n. 4, p. 484-92, Aug 2001. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JUNKER, Y. et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v. 209, n. 13, p. 2395-408, Dec 2012. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209313> >.

JÚNIOR, A. B. D. C. **Comparação do padrão inflamatório intestinal crônico antígeno-específico entre camundongos C57BL/6J e BALB/C**. Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, p.156. 2006

KARAYIANNAKIS, A. J. et al. Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. **J Pathol**, v. 185, n. 4, p. 413-8, Aug 1998. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199808\)185:4<413::aid-path125>3.0.co](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199808)185:4<413::aid-path125>3.0.co) >.

KOBIELAK, A.; FUCHS, E. α -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 614, 2004-08-01 2004. ISSN 1471-0080/1471-0080. Disponível em: < <http://www-nature.ez27.periodicos.capes.gov.br/articles/nrm1433> >.

LAMMERS KM , E. A. Gliadin Induces Neutrophil Migration via Engagement of the Formyl Peptide Receptor, FPR1. - PubMed - NCBI. 2015. Disponível em: < <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez27.periodicos.capes.gov.br/pubmed/26378785> >.

LAMMERS, K. M. et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 194-204.e3, Jul 2008. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485912> >.

LARSEN, J. et al. Effect of dietary gluten on dendritic cells and innate immune subsets in BALB/c and NOD mice. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0118618, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118618> >.

LI, J. et al. Changes in the phosphorylation of claudins during the course of experimental colitis. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 10, p. 12225-33, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722407> >.

_____. Structural Determinants of the Mechanical Stability of alpha-Catenin. **J Biol Chem**, v. 290, n. 31, p. 18890-903, Jul 31 2015. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.647941> >.

LIMKETKAI, B. N. et al. Prevalence and factors associated with gluten sensitivity in inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol**, p. 1-5, Dec 2017. ISSN 1502-7708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29216767> >.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, n. 2, p. 135-50, 1978. ISSN 0012-2823 (Print)0012-2823. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000198104> >.

MARCHESI, J. R. et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. **J Proteome Res**, v. 6, n. 2, p. 546-51, Feb 2007. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17269711> >.

MATTE, U.; PASQUALIM, G. Lysosome. <http://dx.doi.org/10.1177/2326409816679431>, 2016-12-05 2016. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2326409816679431> >.

MITEA, C. et al. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. **Gut**, v. 57, n. 1, p. 25-32, Jan 2008. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494108> >.

MOJIBIAN, M. et al. Diabetes-specific HLA-DR-restricted proinflammatory T-cell response to wheat polypeptides in tissue transglutaminase antibody-negative patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 58, n. 8, p. 1789-96, Aug 2009. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401421> >.

MOSHKOVITS, I. et al. A key requirement for CD300f in innate immune responses of eosinophils in colitis. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 172-183, 2016-04-27 2016. ISSN 1933-0219. Disponível em: < <http://www.nature.com/mi/journal/v10/n1/full/mi201637a.html> >.

MÉNARD, S.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 3, p. 247-59, May 2010. ISSN 1935-3456. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404811> >.

OKAYASU, I. et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, Mar 1990. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688816> >.

OLIVEIRA, L. G. et al. Positive correlation between disease activity index and matrix metalloproteinases activity in a rat model of colitis. **Arq Gastroenterol**, v. 51, n. 2, p. 107-12, 2014 Apr-Jun 2014. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25003261> >.

PALLIS, A. G.; MOUZAS, I. A.; VLACHONIKOLIS, I. G. The inflammatory bowel disease questionnaire: a review of its national validation studies. **Inflamm Bowel Dis**, v. 10, n. 3, p. 261-9, May 2004. ISSN 1078-0998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15290922> >.

PALOVA-JELINKOVA, L. et al. Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. **J Immunol**, v. 175, n. 10, p. 7038-45, Nov 15 2005. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PICHE, T. Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? **Neurogastroenterol Motil**, v. 26, n. 3, p. 296-302, Mar 2014. ISSN 1350-1925. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/nmo.12315> >.

PORITZ, L. S. et al. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. **J Surg Res**, v. 140, n. 1, p. 12-9, Jun 2007. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17418867> >.

REN, W. et al. Serum amino acids profile and the beneficial effects of L-arginine or L-glutamine supplementation in dextran sulfate sodium colitis. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88335, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24505477> >.

SALIM, S. Y.; SODERHOLM, J. D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 1, p. 362-81, Jan 2011. ISSN 1078-0998. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21403> >.

SANDER, G. R. et al. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. **FEBS Lett**, v. 579, n. 21, p. 4851-5, Aug 2005. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099460> >.

SANGFELT, P. et al. Neutrophil and eosinophil granule proteins as markers of response to local prednisolone treatment in distal ulcerative colitis and proctitis. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 4, p. 1085-90, Apr 2001. ISSN 0002-9270 (Print)0002-9270. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03743.x> >.

SANZ, Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. **Gut Microbes**, v. 1, n. 3, p. 135-7, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1949-0984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21327021> >.

SAPONE, A. et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC Med**, v. 10, p. 13, 2012. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22313950> >.

SCHMITZ, H. et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 116, n. 2, p. 301-9, Feb 1999. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922310> >.

SCHUPPAN, D.; ZEVALLOS, V. Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity. **Dig Dis**, v. 33, n. 2, p. 260-3, 2015. ISSN 1421-9875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25925932> >.

SCHWARTZ, L. et al. Hyperosmotic stress contributes to mouse colonic inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, n. 5, p. G934-41, Nov 2008. ISSN 0193-1857. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755808> >.

SHAH, N. D. et al. Oral Diets and Nutrition Support for Inflammatory Bowel Disease: What Is the Evidence? **Nutr Clin Pract**, v. 30, n. 4, p. 462-73, Aug 2015. ISSN 1941-2452. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26084506> >.

SHAN, L. et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, n. 5590, p. 2275-9, Sep 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351792> >.

SHAWKI, A.; MCCOLE, D. F. Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive Escherichia coli. In: (Ed.). **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, v.3, 2017. p.41-50. ISBN 2352-345X (Electronic).

SHEWRY, P. R. et al. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 357, n. 1418, p. 133-42, Feb 2002. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911770> >.

SINGH, U. P. et al. CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 111-23, Jun 2007. ISSN 1871-5303. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17584151> >.

SOARES, F. L. et al. Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 6, p. 1105-11, Jun 2013. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253599> >.

STANDRING, S. **Gray's anatomia 40a edição**. 40. Rio de Janeiro: 2010. 1551 ISBN 9788535234398. Disponível em: < https://books.google.com/books/about/Gray_s_anatomia_40a_edição.html?hl=pt-BR&id=bJP2VMQGNLQC >.

TANIGUCHI, T. et al. Identification of regions of alpha-catenin required for desmosome organization in epithelial cells. **Int J Mol Med**, v. 16, n. 6, p. 1003-8, Dec 2005. ISSN 1107-3756 (Print)1107-3756. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 131, 2006-02-01 2006. ISSN 1471-00801471-0080. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nrm1835> >.

TOVOLI, F. et al. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. **World J Clin Cases**, v. 3, n. 3, p. 275-84, Mar 2015. ISSN 2307-8960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789300> >.

TURNER, J. R. Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation : From Basic Mechanisms to Clinical Application. **Am J Pathol**, v. 169, n. 6, p. 1901-9, Dec 2006. ISSN 0002-9440 (Print)1525-2191 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.060681> >.

VASIOUKHIN, V. et al. Hyperproliferation and Defects in Epithelial Polarity upon Conditional Ablation of α -Catenin in Skin. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 605-617, 2001/02/23 2001. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.cell.com/article/S009286740100246X/abstract> >.Disponível em: < <http://www.cell.com/article/S009286740100246X/fulltext> >.Disponível em: < <http://www.cell.com/article/S009286740100246X/pdf> >.

VERMEULEN, S. J. et al. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of alpha-catenin in human colon cancer cells. **Cancer Res**, v. 55, n. 20, p. 4722-8, Oct 15 1995. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 20-5, 2009 Jan-Mar 2009. ISSN 1678-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466305> >.

VIEIRA, E. L. et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 5, p. 430-6, May 2012. ISSN 0955-2863.

_____. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 5, p. 430-6, May 2012. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21658926> >.

VOLTA, U. et al. Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. **Cell Mol Immunol**, v. 10, n. 5, p. 383-92, Sep 2013. ISSN 2042-0226. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934026> >.

WANG, Q. et al. The gut-liver axis: impact of a mouse model of small-bowel bacterial overgrowth. **J Surg Res**, v. 221, p. 246-256, Jan 2018. ISSN 1095-8673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29229136> >.

WERNER, U.; SZELENYI, I. Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues. **Agents Actions**, v. Spec No, p. C101-3, 1992. ISSN 0065-4299. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1332450> >.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiol**, v. 24, n. 2, p. 115-9, Apr 2007. ISSN 0740-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008153> >.

WIEST, R.; RATH, H. C. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, n. 3, p. 397-425, Jun 2003. ISSN 1521-6918. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763504> >.

WIRTZ, S. et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nat Protoc**, v. 2, n. 3, p. 541-6, 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406617> >.

YAN, Y. et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e6073, Jun 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19562033> >.

ZEVALLOS, V. F. et al. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. 1100-1113.e12, Apr 2017. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27993525> >.

ZHANG, C. et al. Expressions of E-cadherin, p120ctn, beta-catenin and NF-kappaB in ulcerative colitis. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 35, n. 3, p. 368-73, Jun 2015. ISSN 1672-0733 (Print)1672-0733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11596-015-1439-9> >.

ZIMMERMANN, C. et al. Epithelial Transport of Immunogenic and Toxic Gliadin Peptides In Vitro. In: (Ed.). **PLoS One**, v.9, 2014. ISBN 1932-6203 (Electronic).