

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Adna Luciana de Souza

**EFEITOS IMUNOBIOLOGICOS DE DIETAS CONTENDO AMINOACIDOS
LIVRES**

Belo Horizonte

Agosto de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Departamento de Bioquímica e Imunologia

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



EFEITOS IMUNOBIOLÓGICOS DE DIETAS CONTENDO AMINOÁCIDOS LIVRES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de doutor.

Doutoranda: Adna Luciana de Souza

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientadora: Dr.^a. Ana Cristina Gomes Santos

Belo Horizonte

Agosto de 2016

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Immunobiologia do Departamento de Bioquímica e Immunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos

Sumário

Lista de abreviaturas	- 2 -
Lista de figuras.....	- 4 -
1. Resumo e abstract 	- 6 -
2. Justificativa 	- 11 -
3. Estado da Arte 	- 13 -
3.1. O intestino, a estimulação antigênica e o GALT.....	- 14 -
3.2. Captura de antígenos e indução das respostas imunes no GALT	- 18 -
3.3. Tolerância oral e homeostase intestinal.....	- 19 -
3.4. Nutrientes e sistema imune	- 23 -
3.5. Digestão e absorção de proteínas, peptídeos e aminoácidos.	- 24 -
3.6. O papel das proteínas da dieta no desenvolvimento do sistema imune	- 26 -
3.7. Doenças inflamatórias intestinais.....	- 28 -
4. Objetivos 	- 32 -
4.1. Objetivo geral.....	- 33 -
4.2. Objetivos específicos.....	- 33 -
5. Materiais e métodos 	- 34 -
5.1. Animais.....	- 35 -
5.2. Dietas	- 35 -
5.3. Eutanásia.....	- 37 -
5.4. Delineamento experimental	- 37 -
5.5. Avaliação da gravidade da inflamação intestinal.....	- 40 -
5.6. Avaliação do peso	- 41 -
5.7. Consumo da dieta	- 41 -
5.8. Exames bioquímicos.....	- 42 -
5.8.1. Albumina	- 42 -
5.8.2. Proteínas totais.....	- 42 -
5.8.3. Glicose	- 43 -
5.8.4. Triglicérides	- 43 -
5.8.5. Colesterol.....	- 44 -
5.8.6. Transferrina	- 45 -
5.9. Avaliação histológica e morfometria intestinal	- 45 -
5.9.1. Tamanho dos vilos e profundidade das criptas.....	- 46 -
5.9.2. Altura da camada submucosa e espessura da camada muscular	- 47 -

5.10.	Avaliação de imunoglobulinas no soro	- 47 -
5.11.	Avaliação da sigA no lavado intestinal	- 48 -
5.12.	Dosagem de citocinas	- 48 -
5.12.1.	Preparação do extrato de tecidos.	- 49 -
5.12.2.	Determinação da concentração de citocinas por ELISA	- 49 -
5.13.	Perfil de células na lâmina própria.....	- 50 -
5.13.1.	Obtenção de células da lâmina própria.....	- 50 -
5.13.2.	Citometria de fluxo	- 50 -
5.14.	Análise Estatística dos Dados	- 52 -
5.15.	Soluções	- 52 -
6.	Resultados 	- 56 -
6.1.	Efeitos do consumo da dieta contendo aminoácidos livres no estado nutricional e metabolismo.....	- 57 -
6.2.	Efeitos da dieta aminoácido na produção de imunoglobulinas.....	- 59 -
6.3.	Efeitos da dieta aminoácido na produção de citocinas	- 61 -
6.4.	Efeitos da dieta livre de proteínas intactas no perfil de células intestinais.....	- 66 -
6.5.	Efeitos da dieta isenta de proteínas intactas na morfologia intestinal.	- 69 -
6.6.	Efeitos de dieta contendo aminoácidos livres na inflamação intestinal.....	- 71 -
7.	Discussão 	- 76 -
7.1.	Efeitos da dieta contendo aminoácidos livres em situações fisiológicas.....	- 77 -
7.2.	Efeitos das dietas contendo aminoácidos livres na inflamação intestinal.....	- 86 -
8.	Conclusões 	- 91 -
9.	Perspectivas 	- 93 -
10.	Referências bibliográficas 	- 96 -
11.	Anexo 1.Manuscrito do artigo 	- 111 -

Lista de abreviaturas

AA	Aminoácidos
AIN	Instituto Americano de Nutrição
APC	Células apresentadoras de antígenos
Treg	Células T reguladoras
DC	Doença de Crohn
DSS	Dextran sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
FAE	Epitélio associado ao folículo
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
IBD	Doenças inflamatórias intestinais
IEL	Linfócitos intraepiteliais
IEC	Células epiteliais intestinais
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILF	Folículos linfoides isolados
iTregs	Células T reguladoras induzidas
LP	Lâmina própria
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MLN	Linfonodo mesentérico
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
nTregs	Células T reguladoras naturais
PP	Placa de Peyer
PEPT	Transportador de peptídeos
RALDH	Enzima sintetizadora de ácido retinóico
SED	Domo subepitelial
slgA	Imunoglobulina A secretória
TCR	Receptor de células T

TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TCM	Triglicerídeo de cadeia média
TCL	Triglicerídeo de cadeia longa
TH	Célula T auxiliar
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
UC	Colite ulcerativa

Lista de figuras

FIGURA 1. ORGANIZAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOLÓGICA DO INTESTINO.	- 15 -
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GALT	- 17 -
FIGURA 3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1.....	- 38 -
FIGURA 4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2	- 39 -
FIGURA 5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3.	- 40 -
FIGURA 6. RÉGUA MILIMETRADA PARA MORFOMETRIA INTESTINAL.....	- 46 -
FIGURA 7. ESTRATÉGIA DE ANÁLISE FENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO	- 52 -
FIGURA 8. CONSUMO ALIMENTAR E CURVA DE CRESCIMENTO.....	- 57 -
FIGURA 9. EXAMES BIOQUÍMICOS.	- 58 -
FIGURA 10. PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS E IGA SECRETÓRIA	- 60 -
FIGURA 11. NÍVEIS DE CITOCINAS NO BAÇO.	- 62 -
FIGURA 12. NÍVEIS DE CITOCINAS NO INTESTINO DELGADO.	- 63 -
FIGURA 13. NÍVEIS DE CITOCINAS NO CÓLON.	- 64 -
FIGURA 14. NÍVEIS DE CITOCINAS NO LINFONODO MESENTÉRICO.	- 65 -
FIGURA 15. PERFIL DE CÉLULAS NA LÂMINA PRÓPRIA DO INTESTINO DELGADO	- 67 -
FIGURA 16. PERFIL DE CÉLULAS NA LÂMINA PRÓPRIA DO CÓLON	- 68 -
FIGURA 17. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INTESTINO DELGADO.	- 69 -
FIGURA 18. ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CÓLON.	- 70 -
FIGURA 19. AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL, PARÂMETROS CLÍNICOS E NÍVEIS DE SIGA DURANTE A INFLAMAÇÃO INTESTINAL (PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2).	- 72 -
FIGURA 20. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL (PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2).....	- 73 -
FIGURA 21. AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL (PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3).....	- 74 -
FIGURA 22. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4	- 94 -
FIGURE 1. BODY WEIGHT, FOOD CONSUMPTION AND BIOCHEMICAL EXAMS.....	- 150 -
FIGURE 2. LEVELS OF IMMUNOGLOBULINS.....	- 151 -
FIGURE 3. CYTOKINES LEVELS IN THE SPLEEN	- 152 -
FIGURE 4. CYTOKINES LEVELS IN THE SMALL INTESTINE	- 153 -
FIGURA 5. CYTOKINES LEVELS IN THE COLON	- 154 -
FIGURA 6. PROFILE CELLS IN THE LAMINA PROPRIA OF SMALL INTESTINE	- 155 -
FIGURA 7. PROFILE CELLS IN THE LAMINA PROPRIA OF COLON.....	- 156 -
FIGURA 8. HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE SMALL INTESTINE	- 157 -
FIGURA 9. HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE SMALL INTESTINE	- 158 -
FIGURE 10. BODY WEIGHT, CLINICAL PARAMETERS AND SIGA LEVELS DURING INTESTINAL INFLAMMATION	- 159 -
FIGURE 11. HISTOLOGIC EVALUATION OF INTESTINAL INFLAMMATION	- 160 -
FIGURE 12. CLINICAL AND HISTOLOGIC EVALUATION OF INTESTINAL INFLAMMATION	- 161 -

Lista de tabelas

TABELA 1. COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL CENTESIMAL DAS DIETAS EXPERIMENTAIS CASEÍNA E AA	- 36 -
TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO CALÓRICA E FORMA DE APRESENTAÇÃO DOS MACRONUTRIENTES DAS DIETAS EXPERIMENTAIS CASEÍNA E AA	- 36 -
TABELA 3. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA COLITE.....	- 40 -
TABELA 4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA COLITE	- 41 -
TABELA 5. PAINEL DE ANTICORPOS PARA FENOTIPAGEM CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	- 51 -

1. Resumo e abstract |



RESUMO

Os nutrientes são capazes de modular o sistema imune em diversos aspectos, incluindo o seu desenvolvimento e homeostase. Após o desmame, as proteínas da dieta são essenciais para a maturação do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e modulação de atividade imunológicas sistêmicas tais como a resposta imune à infecção, a indução da tolerância nasal, a tolerância oral e respostas alérgicas. Porém, em situações de maturidade imunológica, em animais adultos, o papel das proteínas da dieta na operação do sistema imune não está claro. Entender os efeitos imunológicos das dietas contendo proteínas intactas ou aminoácidos (AA) livres é de grande importância na prática clínica, sobretudo em situações de inflamação intestinal nas quais dietas elementares contendo AA livres são utilizadas. A terapia nutricional é um ponto importante no tratamento das doenças inflamatórias intestinais, porém não há consenso sobre a formulação dietética mais adequada. Dessa forma, o objetivo do trabalho é estudar os efeitos imunobiológicos de dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas em animais adultos em situações fisiológicas e também durante a inflamação intestinal. Em todos os protocolos experimentais foram utilizados camundongos C57BL/6, machos com idade inicial de oito semanas. Esses animais foram alimentados com ração comercial desde o desmame até o início do protocolo experimental. As dietas experimentais seguiram o padrão AIN93G, sendo as modificações realizadas somente na composição da fonte nitrogenada (dieta contendo aminoácidos ou contendo caseína). Para a avaliação em situação fisiológica, os animais receberam a dieta contendo AA livres (dieta AA) ou caseína (dieta CAS) durante cinco semanas. O consumo de dieta AA não alterou o peso corporal e os exames bioquímicos indicativos do estado nutricional, porém provocou diversas alterações imunobiológicas, entre elas a redução sérica dos níveis imunoglobulinas e o aumento de diversas citocinas do intestino delgado e cólon como IL-17A, IL-10 e TGF- β . No baço desses animais, ao contrário, ocorreu redução dos níveis de praticamente todas as citocinas avaliadas. Essas alterações foram observadas principalmente após uma semana de consumo da dieta. O grupo que consumiu dieta AA também apresentou aumento do número de células totais, células ativadas, linfócitos Th17 e T reguladores na lâmina própria do intestino delgado, mas não do cólon. Nesse caso, as diferenças

entre os grupos foram observadas tardiamente, principalmente após cinco semanas. A morfologia intestinal apresentou-se alterada no grupo dieta AA, com aumento do tamanho do vilão e maior profundidade da cripta no intestino delgado e aumento do infiltrado celular, redução de células caliciformes e edema da camada submucosa no cólon. O papel da dieta AA também foi avaliado em situações de inflamação intestinal. Nesse caso, as dietas AA e CAS foram ofertadas em dois momentos diferentes do desenvolvimento da colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS), sendo o primeiro juntamente com o consumo de DSS e o segundo previamente à indução da colite. A dieta AA provocou exacerbação da inflamação intestinal quando consumida previamente ou durante a indução da colite, o que foi evidenciado pelos escores clínico e histológico aumentados e pela redução do comprimento do cólon. Em conclusão, o consumo de dietas contendo AA livres em substituição às proteínas intactas não altera o estado nutricional, porém provoca diversas alterações imunológicas intestinais e sistêmicas em camundongos adultos. Essas alterações são proporcionais ao tempo de consumo das dietas. A presença de aminoácidos livres na dieta provoca também exacerbação da inflamação intestinal. Dessa forma, dietas contendo aminoácidos livres devem ser utilizadas com cautela na prática clínica principalmente em situações de inflamação intestinal estabelecida.

Palavras chaves: aminoácidos dietéticos, imunologia nutricional, doenças inflamatórias intestinais.

ABSTRACT

Nutrients are capable of modulating the immune system in several ways, including the development and maintenance of immune homeostasis. After weaning, dietary proteins are essential for the maturation of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) and modulation of systemic immune activity, such as response to infection, nasal and oral tolerance induction and allergic responses. In situations of immunological maturity, in adult animals, the role of dietary protein in the immune system is not known. To understand the immune effects of diets containing free amino acids (AA) is very important in clinical routine, especially in situations of intestinal inflammation in which elemental diets containing AA are used. Nutritional therapy is a commonly used complementary tool in the treatment of inflammatory bowel disease, but there is no consensus about the most appropriate dietary formulation. Thus, the objective of this study was to analyze the immunobiological effects of diets containing either free amino acids (AA diet) or intact proteins (casein) in adult animals in physiological conditions as well as during intestinal inflammation. In all experimental protocols, 8 week-old mice C57BL/6 were chosen. AIN93 diet containing either 15% casein (CAS diet) or equivalent amounts of AA (AA diet) were used. For evaluation analysis in physiological conditions, animals received either CAS or AA diet for five weeks. AA diet consumption did not change weight or biochemical tests indicative of nutritional status, however it lead to several immunobiological changes in mice, such as reduction of serum immunoglobulins and increase of several cytokines in the small intestine and colon, including IL-17, IL-10 and TGF- β . Conversely, there was a reduction of virtually all cytokines evaluated in spleen of AA-fed mice. These alterations were observed mainly after one week of diet consumption. Animals from the amino acid group also showed an increase of total cells, activated cells, Th17 and regulatory T lymphocytes in the lamina propria of the small intestine, but not in the colon. In this case, differences among the groups were seen later, particularly after five weeks. Intestinal morphology was altered in the AA group, including increase of villus size and crypt depth in the small intestine and increase of cellular infiltration, reduction of goblet cells and edema of the submucosal layer in the colon. The impact of AA diet consumption also was evaluated in inflammatory situations. In this case, AA and CAS diets were offered either during the development of colitis induced by

dextran sulfate sodium (DSS) or prior to colitis induction. AA diet caused exacerbation of intestinal inflammation when consumed previously and during colitis induction. This was evidenced by the increased clinical and histological scores and shortening of the colon in AA-fed mice. In conclusion, consumption of diets containing free AA to replace the intact proteins does not change the nutritional status, but causes several intestinal and systemic immunological changes in adult animals. Severity of these changes are proportional to the time of diet consumption. Presence of free amino acids in the diet causes exacerbation of intestinal inflammation. Thus, the use of diets containing free amino acids should be used with caution in clinical practice, specially during intestinal inflammation.

Key words: dietary amino acids, nutritional immunology, inflammatory bowel disease.

2. Justificativa |



1. Justificativa

Os nutrientes são capazes de modular o sistema imune em diversos aspectos, incluindo o seu desenvolvimento e a manutenção da homeostase imunológica (Faria *et al.*, 2013). Após o desmame, as proteínas dietéticas são necessárias para maturação do sistema imune, sobretudo do tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês *gut associated lymphoid tissue*) (Menezes *et al.*, 2003). Além disso, a presença de proteínas dietéticas após o desmame é importante para modular atividades imunológicas sistêmicas como a resposta imune à infecção (Amaral *et al.*, 2010), a indução da tolerância nasal (Mucida *et al.*, 2004) e oral e respostas alérgicas (Paula-Silva *et al.*, 2015). Dessa forma, o papel das proteínas dietéticas no contexto de imaturidade imunológica, ou seja, nas fases iniciais da vida, está bem claro. Porém, a influência desse nutriente em situações de maturidade imunológica, durante a vida adulta, não é totalmente claro. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de investigar o papel das proteínas dietéticas após a maturação imunológica do sistema imune e contribuir para o esclarecimento de como a presença de aminoácidos livres na dieta podem atuar na modulação das respostas imunes no intestino.

Entender os efeitos imunológicos da fonte nitrogenada na forma de proteínas intactas ou aminoácidos livres é de grande importância na prática clínica, sobretudo em situações de inflamação intestinal. A terapia nutricional é uma opção importante no tratamento complementar das doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês *inflammatory bowel disease*), porém não há consenso sobre a formulação dietética mais adequada. Formulações elementares, que contêm somente aminoácidos livres, são utilizadas com a justificativa de promover o “descanso intestinal”. Porém, alguns trabalhos mostram que as dietas poliméricas, que possuem proteínas intactas, apresentam maiores benefícios no tratamento dessas doenças (Fernandez-Banares *et al.*, 1995; Griffiths *et al.*, 1995; Gassull, 2001). O papel de dietas elementares, semi elementares e poliméricas no tratamento das IBDs ainda precisa ser esclarecido. Assim, este trabalho teve o propósito de contribuir para o entendimento do papel dos aminoácidos dietéticos na inflamação intestinal.

3. Estado da Arte |



2. Estado da arte

2.1. O intestino, a estimulação antigênica e o GALT

O trato gastrointestinal possui cerca de 300m² de extensão em adultos, representando o principal local de contato com o ambiente externo (Brandtzaeg, 2009), especialmente com os componentes da dieta e da microbiota intestinal. A dieta consiste em fonte constante de nutrientes e de estímulo antigênico, principalmente através das proteínas dietéticas. Além dos componentes da dieta, a mucosa intestinal é constantemente estimulada por cerca de três trilhões de microrganismos que compõem a microbiota intestinal (Prakash *et al.*, 2011). O tipo de estímulo apresenta variação de acordo com a localização intestinal e possui grande influência nos processos fisiológicos do organismo. O número de bactérias aumenta ao longo do intestino, sendo o cólon o local de maior concentração bacteriana. Inversamente, a estimulação pelos antígenos dietéticos ocorre, na maior parte, no intestino delgado, local de digestão e absorção de nutrientes (Izcue *et al.*, 2009; Mowat e Agace, 2014). Essas diferenças na estimulação antigênica refletem a especialização regional do intestino, que possui ampla variação em termos estruturais e funcionais ao longo do intestino delgado e grosso (Mowat e Agace, 2014).

O intestino delgado é composto pelo duodeno, jejuno e íleo. O duodeno se inicia após o piloro e recebe o quimo do estômago e as secreções digestivas do pâncreas e fígado. O jejuno, por sua vez, é a maior porção do intestino delgado e está em continuação com o íleo, que se estende até a válvula íleo cecal. O intestino grosso inicia-se junto à parte terminal do íleo e estende-se até o ânus. Este pode ser subdividido anatomicamente em três partes: o ceco, a primeira parte do intestino grosso, semelhante a uma bolsa de fundo cego; o cólon, a maior porção do intestino grosso; e o reto, a parte terminal do trato digestório (Martini *et al.*, 2009). O intestino delgado e grosso diferem amplamente em tamanho, tendo o intestino delgado, em humanos, entre 6 e 7 metros e o cólon aproximadamente 1,5m (Mowat e Agace, 2014).

Em termos histológicos, as principais camadas do intestino são: túnica mucosa, submucosa, muscular e serosa (Figura 1). Variações na estrutura dessas quatro camadas ocorrem ao longo do intestino e estão relacionadas a funções específicas de cada região (Martini *et al.*, 2009).

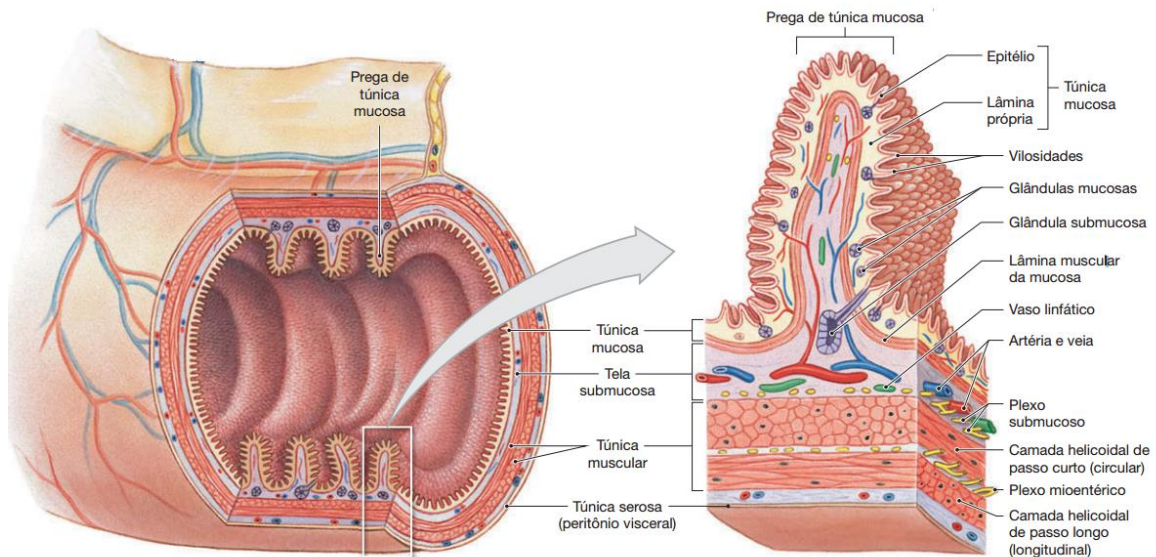


Figura 1. Organização macroscópica e histológica do intestino. No intestino ocorrem projeções macroscópicas conhecidas como pregas. Cada prega é recoberta por vilosidades, cuja camada epitelial contém microvilos. Em termos de organização histológica, o intestino é composto da camada mucosa, representado pelo epitélio e lâmina própria; camada submucosa, separada da camada anterior pela muscular da mucosa; camada muscular e serosa (Adaptado de Martini et al, 2009).

A superfície absorptiva da mucosa intestinal apresenta pregas que aumentam a área de absorção cerca de três vezes. Essas pregas estendem-se circularmente por quase todo o intestino e estão bastante desenvolvidas especialmente no duodeno e no jejuno. Nesses locais, a camada mucosa apresenta uma série de projeções conhecidas como vilos, que se estendem para o lúmen. As superfícies apicais das células epiteliais que recobrem os vilos possuem microvilos, que formam uma estrutura conhecida como “borda em escova”. Essa estrutura contém enzimas digestivas e vários transportadores de nutrientes. Cada prega sustenta um conjunto de vilosidades e cada vilão é recoberto por células epiteliais, cujas superfícies expostas contêm microvilosidades. Essa organização amplia a área total de absorção de mais de 200m². Ao longo do intestino delgado, as pregas e vilosidades diminuem em tamanho e

número até a parte terminal do íleo. Dessa forma, o íleo, além das funções exclusivas de absorção de sais biliares e vitamina B12, apresenta uma menor contribuição para a digestão e absorção de nutrientes. O cólon não possui vilo e borda em escova, não tendo, portanto, função digestiva (Martini *et al.*, 2009). Porém, é o local principal para reabsorção de água e onde se encontra a maior parte das bactérias comensais, que apresentam importante função para a homeostase do sistema imune e do organismo (Mowat e Agace, 2014).

O cólon consiste principalmente de criptas e apresenta um número muito superior de células caliciformes em relação ao intestino delgado (Martini *et al.*, 2009). Modificações na população de células caliciformes entre os diferentes segmentos intestinais são relacionadas às distintas funções fisiológicas exercidas pela mucosa de cada porção. A produção de muco pelas células caliciformes do intestino grosso constitui a primeira linha de defesa contra componentes microbianos. Nesse local, a camada de muco, além da função lubrificante que facilita a progressão do conteúdo fecal, possui função de proteção química contra a agressão ocasionada por antígenos, toxinas e enzimas digestivas existentes no lúmen. O muco também atua de forma a limitar o contato direto das bactérias com a superfície intestinal, apresentando função essencial na manutenção da homeostase nesse local (Kim e Ho, 2010).

Não somente as células caliciformes, mas diversos tipos celulares apresentam diferenças ao longo do intestino, incluindo células do sistema imune inato e adaptativo. Dessa forma, o intestino apresenta especialização regional anatômica e fisiológica que o torna adaptado para lidar com os diferentes estímulos externos presentes ao longo do trato gastrointestinal (Mowat e Agace, 2014).

O intestino abriga o maior e mais complexo componente do sistema imune, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT, do inglês *gut associated lymphoid tissue*) (Figura 2). O GALT é caracterizado por um perfil distinto de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e células que contribuem para a manutenção de um ambiente tolerogênico (Weiner *et al.*, 2011), sendo capaz de discriminar e responder apropriadamente a organismos patogênicos, microbiota comensal e antígenos dietéticos (Mowat, 2003).

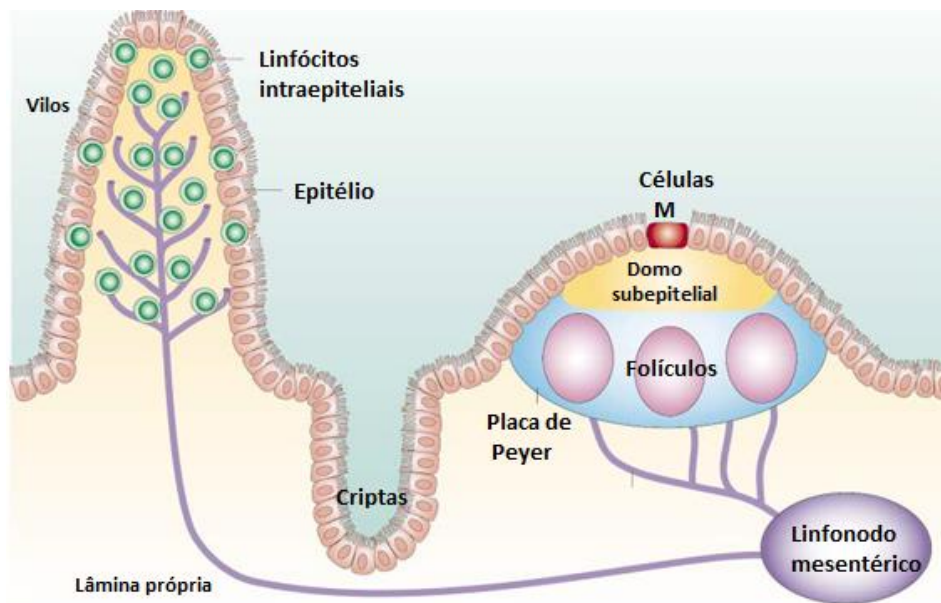


Figura 2. Representação esquemática do GALT. O GALT é didaticamente dividido em locais efetores e locais indutores das respostas imunes. Nos locais indutores ocorre a captura, processamento, apresentação de antígenos e ativação de células T e B *naive*. Esses locais compreendem as placas de Peyer (PP), folículos linfoides isolados (ILF) e linfonodos drenantes. Já os locais efetores são representados pelos linfócitos intra-epiteliais (IEL) e células da lâmina própria. Adaptado de Mowat, 2003.

As células epiteliais intestinais (IECs, do inglês *intestinal epithelial cells*) e os linfócitos intraepiteliais (IELs, do inglês *intraepithelial lymphocytes*) fazem parte da primeira linha de defesa intestinal. As IECs formam uma barreira física e bioquímica contra microrganismos patogênicos e comensais. Essas células são capazes de detectar e responder a estímulos microbianos e coordenar uma resposta imune apropriada, variando de tolerância a imunidade contra patógenos. Dessa forma, as IECs apresentam importante função imunorreguladora que influencia o desenvolvimento e homeostase das células imunes (Peterson e Artis, 2014). Os IELs são uma população heterogênea de linfócitos T distribuídos entre as células epiteliais do intestino delgado e grosso e possuem várias funções imunológicas, particularmente em resposta a antígenos no lúmen. Apesar das IELs apresentarem funções na manutenção da homeostase no intestino, essas células também podem atuar em combinação com células efetoras nas respostas patológicas (Cheroutre *et al.*, 2011).

Abaixo da camada epitelial, encontra-se a lâmina própria, composta por vasos sanguíneos, terminações nervosas sensitivas, vasos linfáticos, fibras musculares lisas e áreas esparsas de tecido linfático (Martini *et al.*, 2009). A lâmina própria é o local onde se encontram linfócitos T e B ativados, plasmócitos secretores de imunoglobulinas, células dendríticas, macrófagos e outras células que participam das fases efetoras das respostas imunes (Mowat e Agace, 2014). Essas células estão sob forte influência das proteínas da dieta e da microbiota, sendo constantemente modulados por esses estímulos externos (Smith e Nagler-Anderson, 2005).

2.2. Captura de antígenos e indução das respostas imunes no GALT

A apresentação de antígenos e indução das respostas imunes efetoras ocorre, em grande parte, nos locais organizados do GALT, entre eles as placas de Peyer (PP) e os folículos linfoides isolados (ILFs, do inglês *Isolated lymphoid follicles*). As PP são folículos linfoides altamente especializados no intestino delgado que contêm células B *naive*, células dendríticas foliculares e áreas ricas em células T (Hamada *et al.*, 2002). De forma similar às PP, os ILFs são compostos por áreas de linfócitos B e T. Os ILFs apresentam tamanhos variados, representando órgãos linfoides terciários em contínuo estado de maturação. Folículos linfoides maduros são mais observados no íleo e cólon, o que se relaciona com o aumento da carga microbiana nesses locais (Mowat e Agace, 2014).

As áreas linfoides organizadas são recobertas por uma camada de células epiteliais denominadas folículo associado ao epitélio (FAE, do inglês *follicle-associated epithelia*). Abaixo do FAE, encontra-se o domo subepitelial, local que abriga linfócitos B e T, células dendríticas e macrófagos. O FAE é constituído de células epiteliais especializadas, possui baixos níveis de enzimas digestivas e estrutura de borda de escova menos pronunciada. Uma característica importante do FAE é a presença de células M, que são células morfológicamente diferenciadas que não apresentam microvilosidades e camada de muco (Miller *et al.*, 2007; Corr *et al.*, 2008). As células M representam um importante local de entrada de antígenos no GALT. A membrana basolateral das células M apresenta invaginações semelhantes a “bolsos”, que reduzem a distância intracelular e facilitam o transporte de materiais antigênicos

(Miller *et al.*, 2007; Corr *et al.*, 2008). Além da entrada através das células M, também já foi demonstrado que células dendríticas CD103⁺ podem projetar dendritos transepiteliais e capturar antígenos diretamente do lúmen (Rescigno *et al.*, 2001; Rimoldi e Rescigno, 2005; Farache *et al.*, 2013). Outras rotas incluem difusão através das zônulas de oclusão e rotas transcelulares em células epiteliais (Cheroutre e Madakamutil, 2004), entrada através de canais formados por células caliciformes (Mcdole *et al.*, 2012) e transferência de antígenos de macrófagos CX3CR1 para células dendríticas CD103⁺ via conexina 43 (Mazzini *et al.*, 2014). Além disso, os próprios enterócitos podem atuar como células apresentadoras (Zimmer *et al.*, 2000; Mowat, 2003). Em menor proporção, locais mais distantes como fígado, baço e linfonodos periféricos também podem participar da apresentação de antígenos derivados do conteúdo luminal (Mowat *et al.*; 2005).

Após captura e processamento, as células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) podem apresentar os antígenos diretamente para células T na PP ou após migração para os linfonodos mesentéricos, sendo esses locais importantes para ativação de linfócitos e produção de imunoglobulina A secretória (sIgA, do inglês *secretory immunoglobulin A*) (Mowat e Agace, 2014). As células ativadas nos linfonodos mesentéricos sofrem diferenciação e migram para a mucosa, onde atuam nas respostas imunes locais. Como os linfonodos conectam o sistema imune periférico e sistêmico, as respostas induzidas na mucosa irão apresentar também repercussões em todo o organismo (Mowat e Agace, 2014).

2.3. Tolerância oral e homeostase intestinal

Em situações fisiológicas, o contato antigênico pela mucosa intestinal resulta em duas atividades imunológicas não inflamatórias com potencial imunorregulador: a indução da tolerância oral (Vaz *et al.*, 1977; Strobel e Mowat, 1998) e a produção de IgA secretória (Cebra *et al.*, 1977).

A tolerância oral é definida como a redução das respostas imunes celulares e humorais a antígenos que entraram em contato com o sistema imune primeiramente pela via oral (Vaz *et al.*, 1977). Esse é provavelmente um fenômeno fisiologicamente

induzido durante o contato diário do tecido linfóide associado à mucosa intestinal com os antígenos da dieta e da microbiota, sendo capaz de prevenir reações de hipersensibilidade a esses antígenos normalmente encontrados no intestino (Faria e Weiner, 2005; Weiner et al, 2011, Pabst and Mowat, 2012).

A presença de citocinas como fator transformador de crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*) e interleucina 10 (IL-10), além de linfócitos T reguladores (Treg), sIgA e outras populações celulares específicas presentes no intestino contribuem para manter nesse local um ambiente altamente tolerogênico (Faria e Weiner, 2005). Entre as células presentes no intestino, encontram-se macrófagos residentes da lâmina própria, que desempenham um papel central na manutenção da homeostase intestinal. Além da função fagocítica e bactericida, essas células produzem IL-10, uma importante citocina imunorreguladora que limita as respostas imunes exacerbadas contra antígenos dietéticos e da microbiota presentes no lúmen intestinal (Kuhn et al, 1993). A produção de IL-10 por macrófagos residentes especificamente no intestino delgado é modulada por componentes dietéticos, especialmente por aminoácidos da dieta (Ochi *et al.*, 2016)

A IL-10 também é produzida por outras células do sistema imune inato e adaptativo. Essa citocina interfere no processo de maturação das células dendríticas e previne a apresentação de antígenos por regulação negativa do complexo principal de histocompatibilidade II (MHCII, do inglês major histocompatibility complex) e das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em células dendríticas e macrófagos. Além disso, inibe a secreção de várias citocinas que podem apresentar ação pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumoral necrosis fator*) e IL-12. No que se refere à imunidade adaptativa, a IL-10 é importante para manutenção da expressão de Foxp3 (*forkhead box P3*) e a regulação da sua função em Tregs. Em células B, a IL-10 induz a secreção de imunoglobulinas (Ig) M, A e G e auxilia na troca de isotipo para IgA, IgE, IgG1 e IgG3 (Hofmann *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2012). A redução da expressão da IL-10 está associada a diversas desordens autoimunes. Camundongos geneticamente deficientes em IL-10 desenvolvem colite espontânea grave (Kuhn *et al.*, 1993; Gomes-Santos *et al.*, 2012) e, em humanos, as

doenças inflamatórias intestinais têm sido relacionadas a defeitos na produção e sinalização da IL-10 (Hedrich e Bream, 2010).

O TGF- β também é uma citocina importante no intestino, que apresenta efeitos pleiotrópicos na proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular, afetando múltiplos processos biológicos, incluindo desenvolvimento, carcinogênese, fibrose, cicatrização de feridas e respostas imunes (Cazac e Roes, 2000). O TGF- β é secretado na forma de um precursor ligado ao peptídeo associado à latência (LAP, do inglês *latent associated peptide*) e pode atuar na forma livre, após clivagem desse peptídeo, ou ligado à membrana da célula (Oida e Weiner, 2010). O TGF- β possui importante papel na homeostase intestinal e na tolerância imunológica aos autocomponentes. É fundamental na troca de isotipo para IgA (Cazac e Roes, 2000), na indução e manutenção de células Th17 e de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ naturais ou induzidas, na supressão de células T e de macrófagos inflamatórios (Li *et al.*, 2006; Pyzik e Piccirillo, 2007; Taylor, 2009).

Vários tipos de células T reguladoras estão envolvidos na homeostase intestinal, entre elas as células Tregs que expressam Foxp3: células T reguladoras naturais (nTreg) e induzidas (iTregs) (Pabst e Mowat, 2012). As células nTregs são produzidas no timo enquanto as iTregs são geradas na periferia após estímulos antigênicos em condições tolerogênicas (Yagi *et al.*, 2004). Linfócitos T reguladores CD4+Foxp3+ estão presentes em todos os órgãos do corpo e constituem aproximadamente 10% do total da população de células T CD4+. Porém, na lâmina própria do intestino, essas células representam uma proporção maior, sendo mais 30% das células TCD4+ no cólon e cerca de 20% na lâmina própria do intestino delgado. Células T reguladoras CD4+Foxp3+ regulam as respostas imunes em múltiplos níveis e através de vários mecanismos, entre eles inibição por contato e secreção de citocinas moduladoras como IL-10 e TGF- β , entre outras (Tanoue *et al.*, 2016). Linfócitos T reguladores também são fortemente influenciadas pela dieta. Em condições fisiológicas normais, macromoléculas da dieta são capazes de induzir o desenvolvimento de linfócitos T reguladores na lâmina própria do intestino delgado (Kim *et al.*, 2016). Da mesma forma, a indução e manutenção dessas células também são influenciadas pela microbiota intestinal (Round e Mazmanian, 2010).

Outros tipos de células T reguladoras incluem as células Tr1, células Th3 e CD4+LAP+ (Jonuleit e Schmitt, 2003). Tr1 são células CD4+CD25-Foxp3- que se diferenciam a partir linfócitos T CD4⁺ após a exposição crônica a antígenos e suas funções supressoras são atribuídas principalmente à ação da IL-10. Já as células Th3 exercem suas propriedades imunossupressoras principalmente via TGF-β. Além das células Tr1 e Th3, que exercem suas funções através da liberação de citocinas, foram descritas células Tregs que expressam TGF-β associado ao peptídeo constituinte da sua forma precursora (latente associated peptide ou LAP) em sua superfície e atuam de forma dependente de contato celular (Jonuleit e Schmitt, 2003; Nakamura *et al.*, 2004).

Células dendríticas intestinais CD103⁺ (integrina αEβ7) expressam a enzima sintetizadora de ácido retinóico (RALDH, do inglês *retinoic acid-synthesizing*) e assim são capazes de metabolizar a vitamina A produzindo ácido retinóico. A sinalização por esse metabólito juntamente com TGF-β é capaz de induzir a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *naive* em células CD4+CD25+Foxp3⁺ com propriedades reguladoras (Mucida *et al.*, 2007; Del Rio *et al.*, 2010).

Além das células Tregs, a manutenção de um ambiente tolerogênico na mucosa intestinal conta também com a ação da sIgA, a principal classe de imunoglobulina na mucosa intestinal. A sIgA é produzida na forma dimérica, sendo as duas unidades unidas por uma cadeia polipeptídica J. Essa imunoglobulina exerce funções imunológicas não inflamatórias como *clearance* de complexos imunes, neutralização extracelular de patógenos, neutralização intracelular de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e vírus (Sutherland e Fagarasan, 2012). Além disso, a sIgA apresenta reduzida capacidade de ativar a via clássica e alternativa do complemento e é capaz de suprimir o “burst respiratório” de neutrófilos, inibir a produção de citocinas induzidas por LPS, como TNF-α e IL-1 por monócitos. Complexos imunes contendo sIgA são capazes de suprimir a atração de neutrófilos, eosinófilos e monócitos, reduzindo dessa forma a atividade pró-inflamatória (Murthy *et al.*, 2006; Brandtzaeg, 2010; Strugnell e Wijburg, 2010).

Células Th17 também possuem importante função no intestino. Essas células constituem um subconjunto de linfócitos TCD4+ que expressam ROR γ t (*retinoic acid-receptor-related orphan receptor gamma*) na presença de TGF- β , IL-1 β , e IL-6, sendo o seu desenvolvimento também modulado pela microbiota comensal. Os linfócitos Th17 atuam através da secreção de citocinas como IL-17A, IL-17F e IL-22, atraindo neutrófilos, induzindo a liberação de peptídeos antimicrobianos e promovendo reparo do tecido. Porém, respostas Th17 descontroladas provocam dano tecidual, como ocorre, por exemplo, na inflamação intestinal. Dessa forma, o sistema imune apresenta vários mecanismos para controlar a atividade das células Th17, entre eles a ação das células T reguladoras (Huber *et al.*, 2012).

2.4. Nutrientes e sistema imune

Os nutrientes são importantes moduladores das respostas imunes, apresentando ação em diversos tipos celulares no intestino e contribuindo para manter a homeostase nesse local (Faria *et al.*, 2013). Estudos epidemiológicos e clínicos demonstram que deficiências nutricionais alteram a imunocompetência e aumentam o risco de infecções (Bell e Hazell, 1975; Bell *et al.*, 1976; Koster *et al.*, 1981; Woodward, 1998; Bhaskaram, 2002). As repercussões da desnutrição proteica no sistema imune já foram amplamente estudadas e sabe-se que essa condição está associada ao comprometimento da imunidade celular, da função fagocítica, da atividade do sistema do complemento, da secreção de imunoglobulina A e da produção de citocinas. Também já foi demonstrado que a deficiência de micronutrientes está relacionada a alterações na resposta imune e vários estudos abordam a influência da deficiência de cobre, zinco, selênio, vitamina A, C, D, E, B6 e ácido fólico no sistema imune (Fraker *et al.*, 2000; Marcos *et al.*, 2003; Cantorna *et al.*, 2004; Cunningham-Rundles *et al.*, 2005). Porém, quando se trata especificamente do papel das proteínas da dieta no sistema imune, a maioria dos trabalhos está restrita às repercussões imunológicas da desnutrição energético proteica. Dessa forma, pouco se sabe sobre os efeitos imunológicos de diferentes formas de apresentação da fonte nitrogenada, ou seja, aminoácidos, peptídeos ou proteínas intactas.

Durante vários anos, acreditou-se que as proteínas eram completamente hidrolisadas no lúmen intestinal e absorvidas como aminoácidos livres. Nos últimos 30 anos, estudos de digestão proteica revelaram que 70% são absorvidos como peptídeos e cerca de 30% como aminoácidos (Adibi, 2003; Sullivan et al, 2016). Cerca de 2% das proteínas escapam do processo digestivo e são absorvidas em sua forma intacta (Cheroutre e Madakamutil, 2004). Esse fato possui grande relevância imunológica, pois somente peptídeos contendo oito aminoácidos ou mais podem ser apresentados ligados ao MHC e assim serem reconhecidos pelos receptores de células T e participarem da ativação celular (TCR, do inglês *T cell receptor*) (Rammensee, 1995). Dessa forma, é de se esperar que a apresentação da fonte nitrogenada sob a forma de proteínas intactas, peptídeos ou aminoácidos influencie de alguma forma as respostas imunes.

2.5. Digestão e absorção de proteínas, peptídeos e aminoácidos.

A digestão das proteínas começa no estômago, onde enzimas proteolíticas, chamadas pepsinas, hidrolisam as ligações peptídicas. As pepsinas são geradas a partir do pepsinogênio, uma proenzima inativa. Quando expostas ao meio ácido do estômago, o pepsinogênio sofre uma alteração na conformação de sua molécula e torna-se pepsina ativa. A ação da pepsina é responsável por cerca de 10 a 20% da digestão total das proteínas, sendo encerrada quando o conteúdo gástrico se mistura com o suco pancreático alcalino no intestino delgado (Frenhani e Burini, 1999). A liberação de aminoácidos no estômago desencadeia parte da resposta inicial após uma refeição: secreção de ácido gástrico, secreção de colecistoquinina, secreção de gastrina e esvaziamento gástrico (Sullivan et al, 2016).

Uma parcela significativa da digestão das proteínas ocorre no duodeno e 60% das proteínas já estão digeridas ao alcançar o jejuno proximal. Muitas proteases são secretadas no lúmen duodenal pelo pâncreas e atuam como endopeptidases (tripsina, quimiotripsina e elastase) ou exopeptidases (carboxipeptidases A e B). A borda em escova da mucosa contém aproximadamente 20 peptidases que quebram aminoácidos específicos presentes em peptídeos. Essas peptidases são produzidas pelos enterócitos, liberadas na superfície da célula e ficam ancoradas à membrana celular.

Os aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos, depois de serem gerados pela hidrólise protéica intraluminal e na borda em escova, são transportados através da membrana apical do enterócito por mecanismos de transporte específicos (Sullivan et al, 2016).

O transporte de aminoácidos do lúmen intestinal é facilitado por vários sistemas, sendo que alguns podem utilizar muitos carreadores diferentes por causa da superposição de especificidades entre os sistemas. Na maioria dos sistemas, o transporte de aminoácidos é acoplado à captação de sódio, por difusão passiva ou facilitada (Sullivan et al, 2016). Na membrana basolateral dos enterócitos foram identificados cinco sistemas de transporte, sendo dois dependentes e três independentes de Na⁺. Os transportadores são específicos para aminoácidos básicos, neutros e aniônicos (Gilbert *et al.*, 2008).

Os dipeptídeos e tripeptídeos, por sua vez, são absorvidos pelo epitélio intestinal por meio de processos independentes de sódio que envolvem o co-transporte de hidrogênio-peptídeo de acordo com um gradiente de hidrogênio (Sullivan et al, 2016), principalmente através do transportador de peptídeo intestinal (PepT, do inglês *peptide transporter*) 1, expresso somente no intestino, e o PepT-2, expresso no rim e no intestino (Adibi, 2003). Após absorção, os pequenos peptídeos são convertidos pelas peptidases citoplasmáticas em aminoácidos livres, que são utilizados pelo enterócito ou liberados na circulação portal por meio de transportadores de aminoácidos específicos presentes na membrana basolateral das células por transporte ativo, difusão facilitada e difusão simples (Broer, 2008; Gilbert *et al.*, 2008). Os dipeptídeos e tripeptídeos que não são hidrolisados pelas peptidases citoplasmáticas são transportados através da membrana basolateral através de transportadores específicos por transporte passivo (Terada *et al.*, 1999).

Quanto à eficiência da absorção, sabe-se que di e tripeptídios são mais eficientemente absorvidos do que AA livres que, por sua vez, são mais absorvidos do que os oligopeptídios (com quatro ou mais aminoácidos) (Frenhani e Burini, 1999). Porém, em condições intestinais normais, quando se compara dietas contendo proteínas intactas e aminoácidos livres não há diferença no balanço nitrogenado (Frenhani e Burini, 1999).

O processo de digestão e absorção das proteínas e aminoácidos é distinto e, portanto, pode contribuir para diferenças no aparecimento plasmático de aminoácidos e peptídeos. Há poucos trabalhos na literatura que avaliaram essa questão. Snyderman *et al.* (1968) e Dangin *et al.* (2001) demonstraram que a cinética pós-prandial é afetada pela taxa de digestão e absorção de proteínas, sendo o aparecimento de aminoácidos livre diferente de acordo com a fonte nitrogenada. A refeição com proteínas intactas promove um aumento mais lento e duradouro na concentração plasmática de aminoácidos. Isso ocorre, entre outros fatores, pela formação de coágulos no estômago, o que prolonga o processo digestivo (Dangin *et al.*, 2001). Outro passo limitante são os peptídeos resistentes à hidrólise citoplasmática, principalmente aqueles contendo prolina (Grimble, 1994), o segundo peptídeo mais abundante da caseína (Geiss-Friedlander *et al.*, 2009). Dessa forma a cinética pós-prandial varia de acordo com a forma de apresentação da fonte nitrogenada (Snyderman *et al.*, 1968; Dangin *et al.*, 2001).

2.6. O papel das proteínas da dieta no desenvolvimento do sistema imune

A forma de apresentação da fonte nitrogenada em aminoácidos, peptídeos ou proteínas influencia diretamente a atividade imune da mucosa. Menezes e colaboradores (2003) demonstraram que as proteínas da dieta em sua forma imunogênica, ou seja, na forma intacta ou de peptídeos que podem ser apresentados pelo MHC e dessa forma reconhecidos pelo sistema imune, são essenciais para a maturação imunológica. Camundongos alimentados desde o desmame até a idade adulta com dieta livre de proteínas intactas apresentam crescimento corpóreo normal, mas desenvolvem anormalidades no desenvolvimento do sistema imune. Esses animais possuem redução no número de células na lâmina própria e de linfócitos intraepiteliais e alterações na morfologia do vilão no intestino delgado. A produção de sIgA, imunoglobulinas séricas totais, IgA e IgG séricos é comprometida. Além disso, a secreção de citocinas por diferentes órgãos linfoides é desviada para um perfil Th2, com alta concentração de IL-10 e IL-4 e baixos níveis de interferon gamma (IFN- γ). Essas características foram semelhantes às de camundongos neonatos. Dessa forma, esse trabalho demonstrou que a estimulação antigênica pelas proteínas da dieta após

o desmame é essencial para a maturação do sistema imune (Menezes *et al.*, 2003). Camundongos alimentados com uma dieta elementar desde o desmame até a vida adulta (12 semanas de idade) também apresentam defeitos similares na função imune (Menezes *et al.*, 2006)

Outros trabalhos do nosso grupo também demonstraram que o consumo de dieta isenta de proteínas intactas desde o desmame até a vida adulta leva ao comprometimento da função imune. Camundongos C57BL/6 que receberam dieta contendo aminoácidos e infectados com *Leishmania major* foram mais susceptíveis à infecção, o que está relacionado ao comprometimento da polarização Th1 e estado imaturo das APCs (Amaral *et al.*, 2010). Além disso, animais alimentados com aminoácidos livres são resistentes à indução da tolerância nasal (Mucida *et al.*, 2004), apresentam uma menor susceptibilidade à indução de tolerância oral e possuem menor tendência ao desenvolvimento de respostas imunológicas associadas à alergia alimentar (Paula-Silva *et al.*, 2015)

Os efeitos imunológicos do consumo de dietas contendo aminoácidos livres na produção de imunoglobulinas podem ser revertidos pela introdução de proteínas na dieta, o que sugere que esses efeitos são devido à baixa estimulação antigênica por antígenos dietéticos (Amaral *et al.*, 2006).

Algumas alterações vistas nos animais alimentados com dietas contendo aminoácidos livres são similares às encontradas em animais isentos de germes, como redução das PP, alterações morfológicas do vilo, redução de células na lâmina própria, diminuição de IEL, redução de IgA e imunoglobulinas séricas (Bos *et al.*, 1988; Macpherson e Harris, 2004). Além disso, alterações imunológicas observadas em animais isentos de germes alimentados com dietas sem antígeno são mais severas (Hashimoto *et al.*, 1978; Hooijkaas *et al.*, 1984), o que sugere que tanto as proteínas dietéticas quanto a microbiota participam do desenvolvimento imunológico (Faria *et al.*, 2013).

Dietas contendo aminoácidos livres são capazes de influenciar o sistema imune não somente pela reduzida estimulação antigênica, mas também pelo fato dos aminoácidos serem reguladores das respostas imunes (Li *et al.*, 2011). Os aminoácidos

influenciam a ativação de linfócitos T, B, células *natural killer* (NK) e macrófagos, a oxidação celular, a expressão genética, a produção de anticorpos e de citocinas (Wu, 2009; Li *et al.*, 2011).

Os aminoácidos são capazes de estimular a fosforilação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*) (Lynch, 2001; Wu, 2009). O mTOR é uma serina/treonina quinase que possui um papel central na regulação do crescimento celular e metabolismo (Li *et al.*, 2011; Chi, 2012). Seus efeitos dependem da concentração de aminoácidos plasmáticos, que é influenciada diretamente pela presença de aminoácidos livres, peptídeos ou proteínas inteiras na dieta (Frenhani e Burini, 1999; Dangin *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2008). O mTOR é mais sensível a aminoácidos específicos como L-glutamina e L-asparagina e também é ativado por aminoácidos essenciais como L-leucina, L-triptofano, L-fenilalanina, L-arginina (Nicklin *et al.*, 2009).

Assim, dietas contendo aminoácidos podem modular as respostas imunes por diversas formas, entre elas a redução da estimulação antigênica e ativação de mTOR, entre outros. Isso apresenta importância não somente em situações fisiológicas, mas também durante a inflamação intestinal, situação em que dietas elementares, que possuem aminoácidos livres, são utilizadas.

2.7. Doenças inflamatórias intestinais

As IBDs são inflamações crônicas e recorrentes do intestino, que compreendem duas formas clínicas principais: a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerativa (UC). A incidência das IBDs é amplamente variável, sendo alta nos Estados Unidos e Reino Unido, afetando uma em cada 250 pessoas, e baixa na Ásia, América do Sul e Nova Zelândia (Ferguson, Peterman, *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2012). No Brasil, há poucos estudos epidemiológicos sobre essas doenças e a incidência relatada é similar àquela encontrada em outros países da América do Sul (Victoria *et al.*, 2009). Os sintomas das IBDs são tipicamente diarreia, dor abdominal, sangramento retal, perda de peso e anemia (Wilson *et al.*, 2004; Abraham e Cho, 2009). Apesar da taxa de mortalidade ser

baixa, as IBDs estão associadas à alta morbidade e comprometimento da qualidade de vida do paciente (Ferguson, Peterman, *et al.*, 2007; Ferguson, Shelling, *et al.*, 2007).

A principal diferença entre UC e DC se baseia na natureza e na localização das lesões. A DC caracteriza-se por um envolvimento transmural e descontínuo do intestino, podendo atingir todo o tubo digestivo, sendo, porém, mais comum no íleo e cólon. Já a UC é caracterizada por uma inflamação contínua, restrita ao cólon e reto, e afeta somente a camada mucosa do intestino (Ferguson, Shelling, *et al.*, 2007; Khor *et al.*, 2011).

A etiologia das IBDs não está totalmente clara, porém é conhecido o envolvimento de fatores ambientais, genéticos e resposta imune. Os genes relacionados ao desenvolvimento das IBDs possuem funções em várias vias essenciais para a manutenção da homeostase intestinal, incluindo função epitelial, defesa contra micróbios, regulação das respostas imunes inatas, geração de espécies reativas de oxigênio, autofagia e regulação das respostas imunes adaptativas (Khor *et al.*, 2011).

Nas IBDs, ocorre uma desregulação das células imunológicas, sendo que a redução da atividade de células reguladoras e o aumento de células efetoras participam do desenvolvimento e exacerbação dessas doenças (Bouma e Strober, 2003). Fatores ambientais como microbiota intestinal (Friswell *et al.*, 2010; Khor *et al.*, 2011; Shiga *et al.*, 2012) e dieta também estão envolvidos no desenvolvimento das IBDs. A dieta representa uma fonte constante de antígenos luminiais e anticorpos específicos para componentes dietéticos já foram descritos em pacientes com IBDs. Porém, se isso desempenha um papel primário na etiologia dessas doenças ou se é um evento secundário à inflamação intestinal ainda precisa ser estabelecido (Yamamoto *et al.*, 2009). Os possíveis mecanismos dos antígenos dietéticos na patogênese da inflamação intestinal incluem efeito antigênico direto, alteração da expressão genética, mudanças na composição da microbiota entérica e efeitos na permeabilidade intestinal (Chapman-Kiddell *et al.*, 2010).

O tratamento atual para as IBDs é baseado em terapias com aminosalicilatos, antibióticos, imunossupressores (azatioprina, metotrexato) e corticosteroides, porém seus efeitos são limitados pela baixa eficácia e alta toxicidade. Além disso, anticorpos

para neutralização dos efeitos de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e anticorpos anti-IL-12p40, para neutralização de IL-12 e IL-23, têm sido utilizados (Ferguson, Shelling, *et al.*, 2007; Strober *et al.*, 2007).

A terapia nutricional foi associada a tratamentos medicamentosos no final da década de 1970 com o objetivo de corrigir deficiências nutricionais específicas, reverter o *déficit* no crescimento em crianças e promover o “descanso intestinal”. A prescrição dietética é variável de acordo com a situação clínica do paciente, podendo ser utilizadas dietas elementares, semi elementares ou poliméricas. Dietas elementares, oligoméricas e poliméricas são fórmulas nutricionalmente completas que diferem no grau de hidrólise dos macronutrientes constituintes. Fórmulas elementares contêm aminoácidos livres, glicose e apresentam conteúdo lipídico reduzido. Fórmulas semi elementares contêm peptídeos, maltodextrina e lipídeos na forma de triglicerídeos de cadeia média (TCM); e fórmulas poliméricas apresentam proteínas intactas, carboidratos complexos e principalmente triglicerídeos de cadeia longa (TCL) como fonte lipídica (Lochs *et al.*, 2006).

Os primeiros trabalhos investigaram os benefícios das dietas elementares, pois se acreditava que o nitrogênio da dieta oferecido na forma de aminoácidos, juntamente com o reduzido teor lipídico, era capaz de promover o “descanso intestinal” e reduzir a alergenicidade da dieta (Beattie *et al.*, 1998). Porém, alguns estudos posteriores demonstraram que fórmulas poliméricas também são efetivas no tratamento das IBDs (Rigaud *et al.*, 1991; Borrelli *et al.*, 2006). O papel das dietas elementares e poliméricas no tratamento das IBDs continua por ser esclarecido.

2.7.1. Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais

Atualmente existem vários modelos experimentais de doenças inflamatórias do intestino que se baseiam na indução da inflamação por agentes químicos, no desenvolvimento espontâneo da inflamação em animais geneticamente modificados ou na transferência de células T efectoras. Os modelos animais de IBDs, apesar de não reproduzirem todas as características das doenças em humanos, são ferramentas úteis, uma vez que há semelhança entre os mecanismos imunológicos básicos e conservação das principais vias de sinalização entre mamíferos (Mizoguchi, 2012).

Entre os agentes químicos indutores de inflamação intestinal encontra-se o dextrano sulfato de sódio (DSS). O dextrano é um polímero de glicose sintetizado por certas bactérias, principalmente *Leuconostoc ssp* e *Streptococcus ssp*, a partir da sacarose. O DSS é produzido a partir do dextran por esterificação com ácido clorosulfônico. O modelo de colite induzido por DSS foi descrito por Okayasu et al (1990) e hoje é amplamente utilizado para estudo das IBDs.

No modelo de colite por DSS, a inflamação é induzida através da adição do agente químico na água oferecida aos animais (*ad libitum*). As manifestações da colite são diarreia, presença de sangue nas fezes, perda de peso, anemia. Segundo Okayasu (1990) a inflamação é limitada ao cólon, sendo principalmente na camada mucosa, mas podendo afetar também a submucosa e a muscular (Okayasu *et al.*, 1990). Dependendo da concentração, duração e frequência de administração do DSS, os animais desenvolvem colite aguda ou crônica (Melgar *et al.*, 2005; Perse e Cerar, 2012). Nos camundongos C57BL/6, a fase aguda é caracterizada por sintomas como perda de peso, presença de sangue nas fezes, diarreia, piloereção, anemia, alto índice inflamatório, elevadas concentrações séricas de proteínas de fase aguda e alterações histopatológicas como úlceras superficiais, edema da mucosa, depleção de células caliciformes, formação de criptas com abscesso e infiltração celular na camada mucosa e submucosa. O infiltrado inflamatório é predominantemente de neutrófilos e macrófagos, com poucos linfócitos. Já na fase crônica, o peso é recuperado e os sintomas clínicos são leves ou ausentes, porém ainda é observado alto índice inflamatório, elevadas concentrações séricas de proteínas de fase aguda e alterações histopatológicas como erosão, epitélio irregular, infiltrado inflamatório, fibrose e folículos linfóides proeminentes na mucosa do intestino (Okayasu *et al.*, 1990; Melgar *et al.*, 2005; Perse e Cerar, 2012).

Os mecanismos pelos quais o DSS induz a colite ainda não estão totalmente esclarecidos, mas é proposto que esse composto exerça um efeito tóxico sobre o epitélio colônico, o que causa defeitos na função de barreira epitelial e permite a entrada de antígenos luminiais e microrganismos na mucosa, resultando em resposta inflamatória. Além disso, o DSS causa destruição da camada protetora de muco e

alteração da função de macrófagos (Okayasu *et al.*, 1990; Melgar *et al.*, 2005; Uhlig e Powrie, 2009; Perse e Cerar, 2012).

4. Objetivos |



3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estudar os efeitos imunobiológicos de dietas contendo aminoácidos livres e proteínas intactas em camundongos adultos.

3.2. Objetivos específicos

I. Investigar os efeitos da dieta contendo aminoácidos livres, em situações fisiológicas, nos seguintes parâmetros:

- a. Peso corporal e consumo alimentar;
- b. Exames bioquímicos: proteínas séricas totais, albumina, transferrina, triglicerídeos, colesterol, glicemia;
- c. Morfologia do intestino delgado e cólon;
- d. Produção de imunoglobulinas séricas;
- e. Níveis de imunoglobulina A secretória intestinal;
- f. Níveis de citocinas no intestino delgado, cólon, linfonodo mesentérico e baço;
- g. Imunofenotipagem de células na lâmina própria do intestino delgado e cólon.

II. Avaliar os efeitos das dietas contendo aminoácidos livres durante a inflamação intestinal induzida por DSS.

- a. Verificar os efeitos das dietas contendo aminoácidos livres no peso corporal, parâmetros clínicos, comprimento do cólon e escore histológico.

III. Verificar se o consumo de dieta contendo aminoácidos livres previamente ao consumo de DSS influencia a gravidade da inflamação.

- a. Avaliar o peso corporal, parâmetros clínicos, comprimento do cólon e escore histológico.

5. Materiais e métodos |



4. Materiais e métodos

Este trabalho é parte integrante do projeto “*Estratégias alternativas de imunomodulação das doenças inflamatórias do trato gastrointestinal*” (Edital PRONEX-FAPEMIG de 2009), aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA) – protocolo 114/2010.

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com idade inicial de aproximadamente oito semanas. Os animais foram alimentados desde o desmame até o início de cada protocolo experimental com ração comercial. Em cada protocolo experimental, os animais foram separados em grupos experimentais homogêneos, considerando-se o peso corporal inicial. Os camundongos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos em gaiolas coletivas no biotério do laboratório de Imunobiologia, no Instituto de Ciências Biológicas da mesma instituição.

4.2. Dietas

As dietas utilizadas no estudo foram baseadas no padrão estabelecido pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN) 93 para estudos nutricionais em roedores (Reeves *et al.*, 1993). A composição nutricional é semelhante entre as dietas, sendo as modificações somente na composição da fonte nitrogenada (tabelas 1 e 2). A dieta Caseína (CAS) refere-se à dieta AIN-93G padrão sem modificações, em que a caseína intacta é a única fonte proteica. Na dieta AA, a caseína foi substituída por aminoácidos livres, na mesma proporção da dieta controle. As dietas CAS e AA foram adquiridos da empresa Rhooster®.

Tabela 1. Composição nutricional centesimal das dietas experimentais Caseína e AA

Composição de aminoácidos (g/100g)			
Alanina	0,46	Lisina	1,3
Arginina	0,64	Metionina	0,46
Ácido aspártico	1,22	Fenilalanina	0,88
Cistina	0,37	Prolina	2,05
Ácido glutâmico	3,63	Hidroxiprolina	<0,1
Glicina	0,32	Serina	0,97
Histidina	0,46	Treonina	0,67
Isoleucina	0,85	Triptofano	0,21
Leucina	1,54	Tirosina	0,93
		Valina	1,0
Composição de vitaminas (U/100g)			
Ácido nicotínico	3,0mg	Biotina	0,02mg
Pantetonato de cálcio	1,5mg	Vitamina B12	2,5µg
Piridoxina	0,6mg	Vitamina K	90 µg
Tiamina	0,5mg	Vitamina E	7,5 UI
Riboflavina	0,6mg	Vitamina A	400 UI
Ácido fólico	0,2mg	Vitamina D	100 UI
		Colina	100mg
Composição de minerais (mg/100g)			
Cálcio	500,0	Cobre	0,6
Fósforo	300,0	Silício	0,5
Potássio	360,0	Cromo	0,1
Cloreto	163,1	Fluoreto	0,1
Sódio	103,9	Níquel	0,05
Magnésio	51,3	Bário	0,05
Enxofre	30,0	Iodo	0,02
Ferro	4,5	Selênio	0,018
Zinco	3,8	Molibdênio	0,015
Manganês	1,0	Lítio	0,01
		Vanádio	0,01

(Adaptado de Reeves *et al.*, 1993).

Tabela 2. Distribuição calórica e forma de apresentação dos macronutrientes das dietas experimentais caseína e AA

Dietas	Caseína	AA
Kcal/100g	376,7	
Fonte nitrogenada	100% caseína (19,3% do VCT)	100% aminoácidos livres (19,3% do VCT)
Carboidratos	63% amido 21% maltodextrina 16% sacarose (64% do VCT)	
Lipídeos	100% óleo de soja (16,7% do VCT)	

Nota: Para cálculo do percentual do valor calórico total (% VCT) foi considerado a contribuição calórica de cada macronutriente em relação ao conteúdo calórico total da dieta.

4.3. Eutanásia

No momento da eutanásia, os animais foram previamente anestesiados através da aplicação de injeção intraperitoneal de 100 µl de solução de 25% de Cloridato de Ketamina (Dopalen – Vetbrands) e 25% de Xilazina (Rompum – Bayer), diluídas em 50% de salina fisiológica 0,85%. A eutanásia foi realizada através do deslocamento cervical.

O soro foi obtido para realização dos exames bioquímicos e dosagem de imunoglobulinas sérica. O baço, linfonodo mesentérico, intestino delgado e cólon foram utilizados para dosagem de citocinas. O intestino delgado e cólon também foram utilizados para análise histológica e avaliação fenotípica das células na lâmina própria. O conteúdo do intestino delgado e cólon foi coletado para dosagem de IgA secretória.

4.4. Delineamento experimental

4.4.1. Parte I - Avaliação dos efeitos imunobiológicos da dieta contendo aminoácidos livres em situações fisiológicas

A primeira parte do trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do consumo das dietas experimentais em animais adultos em situações fisiológicas. Para isso, camundongos C57BL/6, com aproximadamente 8 semanas de idade, foram separados em dois grupos e alimentados com dietas experimentais CAS ou AA durante 1, 3 ou 5 semanas, tempos em que os animais foram submetidos à eutanásia (Protocolo experimental 1 – Figura 3).

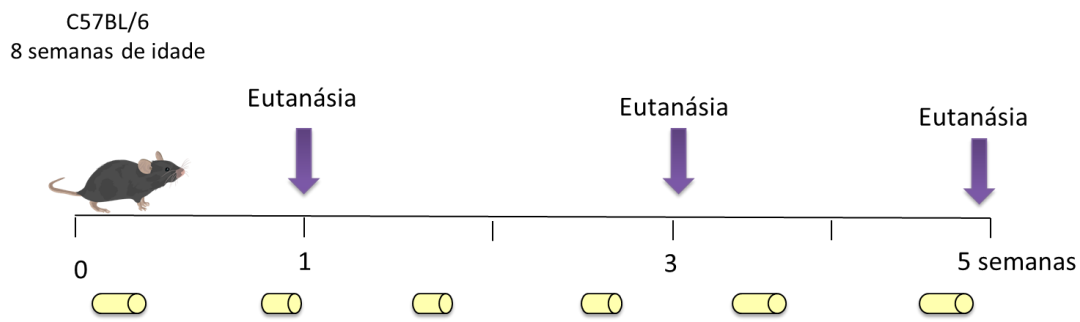


Figura 3. Protocolo Experimental 1. Camundongos C57BL/6, machos, foram alimentados com dieta Caseína ou AA durante 1, 3 ou 5 semanas.

4.4.2. Parte II - Avaliação dos efeitos da dieta contendo aminoácidos livres na inflamação intestinal

Para investigar os efeitos da dieta contendo aminoácidos livres na inflamação intestinal, a colite foi induzida através do agente químico DSS, conforme protocolo adaptado de Okayasu e colaboradores (1990).

Primeiramente, foram avaliados os efeitos das dietas contendo aminoácidos livres durante a indução da colite. Para isso, camundongos C57BL/6 foram separados em dois grupos, denominados CAS ou AA de acordo com a dieta recebida. Cada grupo foi separado em dois subgrupos, sendo um controle saudável, que recebeu apenas água, e o outro submetido à indução da colite através do consumo de DSS. As dietas experimentais caseína e aminoácidos foram mantidos durante todo o período de indução da colite, juntamente como o consumo de DSS.

O protocolo de indução da colite consistiu em três ciclos de consumo de DSS, que foi adicionado a 1% na água do bebedouro oferecido aos animais. Cada ciclo teve duração de sete dias e foram intercalados com períodos de intervalos de sete dias, em que todos os animais receberam somente água no bebedouro. A solução de DSS foi renovada a cada dois dias durante o período de indução da colite. A eutanásia foi realizada ao final de cada ciclo de DSS (protocolo experimental 2- figura 4).

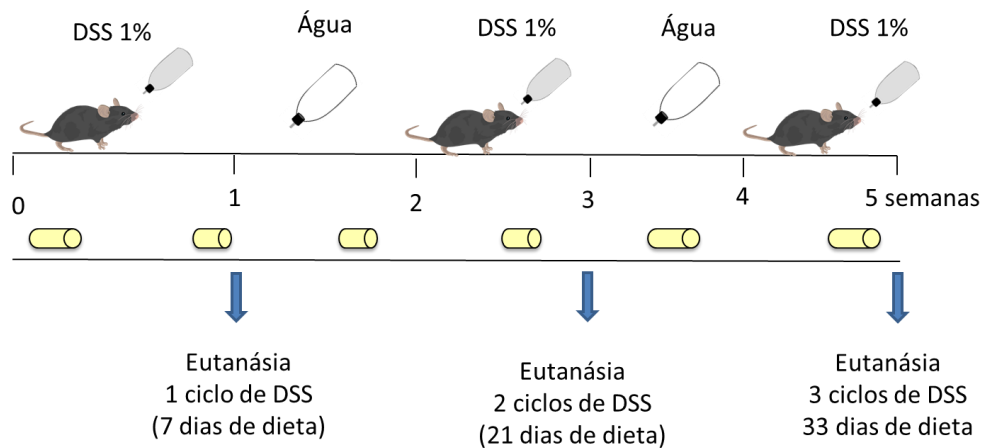


Figura 4. Protocolo experimental 2. Camundongos C57BL/6, machos, consumiram DSS a 1% na água ofertada no bebedouro durante 1, 3 ou 5 semanas. As dietas experimentais caseína ou aminoácido foram ofertadas durante todo o período de indução da colite.

Também foram avaliados os efeitos do consumo da dieta contendo aminoácidos livres previamente à indução da inflamação. Nesse caso, os animais foram separados em dois grupos e receberam dieta CAS ou aminoácido durante sete dias. Após esse período, a colite foi induzida através do consumo de DSS 1% durante sete dias. Contrariamente ao protocolo experimental 2, durante a indução da colite, as dietas experimentais foram substituídas por ração comercial. Esse protocolo visou esclarecer se as alterações induzidas pelos aminoácidos livres são duradouras e capazes de interferir na inflamação intestinal mesmo após a interrupção do consumo da dieta. A eutanásia foi realizada após o final da indução da colite, após sete dias de consumo de DSS (protocolo experimental 3 – figura 5).

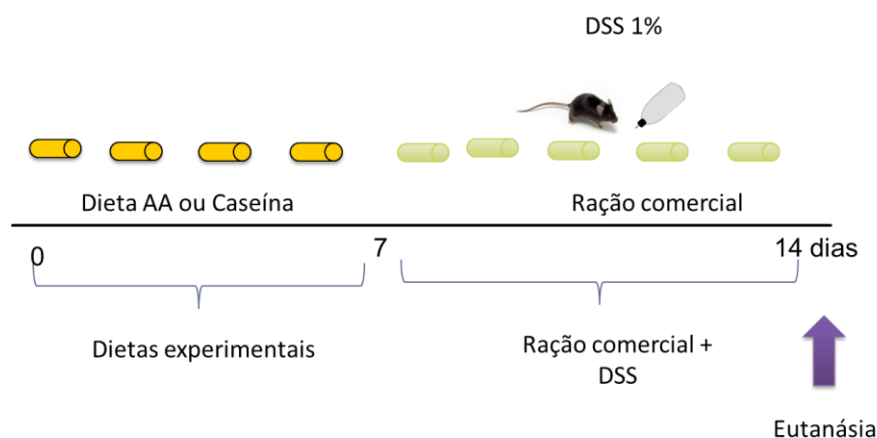


Figura 5. Protocolo experimental 3. Camundongos C57BL/6, machos, foram alimentados com as dietas experimentais caseína ou aminoácidos durante sete dias. Após esse período, a colite foi induzida através do consumo de DSS a 1% durante sete dias. A eutanásia foi realizada ao final do consumo de DSS.

4.5. Avaliação da gravidade da inflamação intestinal

Em todos os protocolos em que a colite foi induzida, a gravidade da inflamação foi avaliada através do comprimento do cólon, índice clínico macroscópico e análise histológica. O comprimento do cólon foi medido com o auxílio de uma régua e o resultado expresso por comprimento médio por grupo (Axelsson *et al.*, 1998). A avaliação clínica considerou a presença e intensidade da diarreia, sangramento e perda de peso, de acordo com a tabela 3. O sangramento visível foi definido como sangue presente no ânus e cauda do animal. Já o sangramento oculto foi observado na análise das fezes, após abertura longitudinal do cólon. O percentual de variação do peso foi realizado entre o primeiro e último dia de cada ciclo de consumo de DSS, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ variação do peso} = \frac{(\text{peso final} - \text{peso inicial}) \times 100}{\text{peso final}}$$

Tabela 3. Avaliação macroscópica da colite

Pontuação	% de perda de peso	Diarreia	Sangramento
0	Ausente	Ausente	Ausente
1	1-5		
2	5-10	Moderada	Oculto
3	11-15		
4	> 15	Severa	Sangramento visível

(Kang *et al.*, 2006)

Para análise histológica, as lâminas foram classificadas de acordo com a extensão da destruição da arquitetura da camada mucosa, presença e grau de infiltração celular, extensão do espessamento do músculo, presença ou ausência de abscessos das criptas e presença ou ausência de depleção de células caliciformes (tabela 5). Cada parâmetro foi pontuado e somado para análise do índice histológico, sendo o máximo igual a 11. A análise histológica foi realizada às cegas.

Tabela 4. Avaliação histológica da colite

Parâmetro	Classificação
Extensão da destruição da arquitetura da camada mucosa	0 - normal 1 - leve 2 - moderada 3 - dano extensivo
Presença e grau de infiltração celular	0 - normal 1 - leve 2 - moderada 3 - infiltração transmural
Extensão do espessamento do músculo	0 - normal 1 - leve 2 - moderada 3 - espessamentos extensivo
Presença ou ausência de abscessos das criptas	0 - ausente 1 - presente
Presença ou ausência de depleção das células caliciformes	0 - ausente 1 - presente

(McCafferty *et al.*, 2000)

4.6. Avaliação do peso

Durante os protocolos experimentais os animais foram pesados de duas a três vezes por semana. O peso foi expresso através da curva de crescimento, que considerou o peso médio do grupo em cada dia avaliado.

4.7. Consumo da dieta

O consumo da dieta foi avaliado de duas a três vezes por semana através do cálculo de consumo médio por grupo. No primeiro momento, é aferido o peso inicial (dieta ofertada) e, posteriormente, o peso final da dieta (sobra). Para o cálculo, o peso da sobra foi descontado do peso inicial e o valor dividido pelo número de animais na

gaiola e pelo número de dias de consumo. Dessa forma foi possível estimar o consumo médio diário de cada animal.

4.8. Exames bioquímicos

Os exames bioquímicos foram realizados em amostras de soro. Após anestesia, os animais foram exsanguinados pelo plexo subaxilar e o sangue colocado em tubos de centrifugação de 500µl, sem anticoagulante. Para separação do soro, o sangue foi mantido durante 15 minutos em estufa a 37°C e em seguida 15 minutos na geladeira a 4°C. Após isso, o soro foi separado por centrifugação a 600g durante 15 minutos. Após a separação, o soro retirado foi congelado a -20°C para posteriores análises.

Todos os testes descritos a seguir foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços (sarstedt) e a absorbância medida em leitor automático (Asys-modelo Expert plus).

4.8.1. Albumina

A determinação de albumina sérica foi realizada através do kit bioquímico Labtest®. O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima do corante verde de bromocresol ligado à albumina. A cor formada é medida colorimetricamente entre 600 e 640 nm, sendo proporcional à quantidade de albumina na amostra até a concentração de 6,0g/dL.

Para dosagem, foi adicionado 2 µL do reagente padrão, em triplicata, e 2 µL da amostra, em duplicata. O branco foi realizado com a adição de 2 µL de água destilada. Em seguida acrescentou-se 200 µL do reagente de cor em todos os poços. A absorbância foi determinada em 2 minutos, no máximo 10, a 620 nm. Para o cálculo da concentração da albumina, em g/dL, aplicou-se a fórmula:

$$\text{Albumina (g/dL)} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do padrão}) \times 3,8.$$

4.8.2. Proteínas totais

A determinação das proteínas séricas totais foi realizada através do kit bioquímico Labtest®. Os íons cobre em meio alcalino (reagente biureto) reagem com

as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

Para dosagem, foi adicionado 4 µL do reagente padrão, em triplicata, e 4 µL da amostra, em duplicata. O branco foi realizado com a adição de 2 µL de água destilada. Em seguida, acrescentou-se 200 µL do reagente biureto em todos os poços. As placas foram incubadas a 37°C durante 10 minutos e após isso a absorvância foi determinada a 545nm. Para o cálculo da concentração das proteínas séricas totais, em g/dL, aplicou-se a fórmula:

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do padrão}) \times 4.$$

4.8.3. Glicose

A determinação de glicose sérica foi realizada através do kit bioquímico Katal[®] Biotecnológica Ind. Com. Ltda. O teste é baseado no método enzimático colorimétrico, em que a glicose da amostra sofre a ação da glicose oxidase em presença de oxigênio produzindo peróxido de hidrogênio. Este, em presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina).

Para dosagem, foi adicionado 2 µL do reagente padrão, em triplicata, e 2 µL da amostra, em duplicata. O branco foi realizado com a adição de 2 µL de água destilada. Em seguida acrescentou-se 200 µL do reagente de glicose em todos os poços. As placas foram incubadas durante 15 minutos em estufa a 37°C. Após este período, a absorvância foi determinada em 492nm. Para o cálculo da concentração da glicose aplicou-se a fórmula:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do padrão}) \times 100.$$

4.8.4. Triglicérides

A determinação das concentrações de triglicérides foi realizada através do kit bioquímico Doles[®]. O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos do soro pela lipase lipoprotéica produzindo glicerol livre, que é, então, fosforilado pela glicerol

quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção a 500nm, sendo sua intensidade proporcional à concentração de triglicérides no soro.

Para dosagem, foi adicionado 2 µL do reagente padrão, em triplicata e 2 µL da amostra, em duplicata. O branco foi realizado com a adição de 2 µL de água destilada. Em seguida acrescentou-se 200 µL do reagente de cor em todos os poços. Para obtenção do reagente de cor, adiciona-se o volume do reagente 2 (10%) em um dos frascos tampão (90%). As placas foram incubadas durante 15 minutos em estufa à 37°C. Após este período, a absorbância foi determinada em 492nm. Para o cálculo da concentração dos triglicérides séricos, em mg/dL, aplicou-se a fórmula:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do padrão}) \times 200.$$

4.8.5. Colesterol

A determinação das concentrações de colesterol foi realizada através do kit bioquímico Doles®. O método consiste na hidrólise dos ésteres de colesterol do soro pela enzima colesterol esterase produzindo colesterol livre, que é, então, oxidado pela colesterol oxidase produzindo peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente p-hidroxibenzendo e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção a 510nm, sendo sua intensidade proporcional à concentração de colesterol no soro.

Para dosagem, foi adicionado 2 µL do reagente padrão, em triplicata e 2 µL da amostra, em duplicata. O branco foi realizado com a adição de 2 µL de água destilada. Em seguida acrescentou-se 200 µL do reagente de cor em todos os poços. As placas foram incubadas durante 5 a 10 minutos em estufa à 37°C. Após este período, a absorbância foi determinada em 492nm. Para o cálculo da concentração do colesterol sérico, em mg/dL, aplicou-se a fórmula:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = (\text{Absorbância do teste} / \text{Absorbância do padrão}) \times 200.$$

4.8.6. Transferrina

A determinação das concentrações de transferrina sérica foi realizada através do kit bioquímico Kovalent®. O método consiste na determinação quantitativa da transferrina no soro por ensaio turbidimétrico, através da medida da reação antígeno-anticorpo por método de ponto final. Para dosagem, a amostra foi diluída 1:10 em solução salina 9g/dL. Para determinação das concentrações de transferrina na amostra, foi adicionado 100µl de mono-reagente e 3µl da amostra. Para determinação da curva de referencia foi adicionado no primeiro poço da coluna padrão 90µl de salina e 10µl do padrão. Em seguida foi adicionado 50µl de salina nos demais poços e realizada diluição seriada (1:10 a 1:160). Após diluição, foi adicionado 100µl de mono-reagente em todos os poços da coluna padrão. A placa foi incubada durante 7 minutos em temperatura ambiente. O braço foi realizado com apenas o reagente enzimático. A medida da absorbância foi realizada em 405nm. As concentrações da transferrina foram realizadas a partir de equação gerada pela curva de calibração.

4.9. Avaliação histológica e morfometria intestinal

Para a confecção de lâminas histológicas, o intestino foi lavado com salina fisiológica para retirada das fezes e, então, dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Este procedimento foi adotado por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos. Cada porção foi cortada transversalmente ou longitudinalmente e a parte final acondicionada em formol tamponado.

Amostras do intestino delgado e cólon foram fixadas em formalina e processadas para análise histológica. Para isso, cada amostra foi colocada em cassetes, previamente identificados, e estes foram colocados em soluções de álcool obedecendo aos referidos tempos e concentrações:

Álcool 70% - 30 min / Álcool 80% - 30 min / Álcool 90% - 30 min.

Após a imersão nos três alcoóis, os cassetes foram imersos em uma solução de álcool etílico absoluto durante dois períodos de 30 minutos. Em seguida, os cassetes

foram imersos em xilol, também por dois períodos de 30 minutos. Após a imersão em xilol, os cassetes foram finalmente imersos em parafina líquida acondicionada em estufa a 60°. Ao final deste processo, os cassetes foram abertos e as amostras retiradas e colocados em parafina em forma própria para secagem final e formação de blocos de parafina. Os blocos foram acondicionados durante 24h para secagem. Após este período, os blocos foram desenhados e acondicionados em freezer. Por fim, os blocos de parafina, contendo os tecidos incluídos, foram seccionados pela navalha de aço do micrótomo e submetidos a coloração.

A coloração foi então realizada através da técnica hematoxilina e eosina (HE), conforme descrito por (Lev e Spicer, 1964). Cinco cortes de cada grupo, corado com hematoxilina e eosina (HE), foram fotografados utilizando-se uma câmera digital (Moticam 2500, China), acoplada em um microscópio óptico (Olympus Optical Co., Japan).

4.9.1. Tamanho dos vilos e profundidade das criptas

Imagens das lâminas histológicas foram capturadas a partir de uma microcâmera JVC TK-1270/RGB e analisadas através do programa Image J. Os vilos e as criptas foram medidos através de lamínula milimetrada de acordo com a figura 6, utilizando-se imagens capturadas com a objetiva de 10. Para cada animal foram contadas no mínimo 100 vilos e criptas.

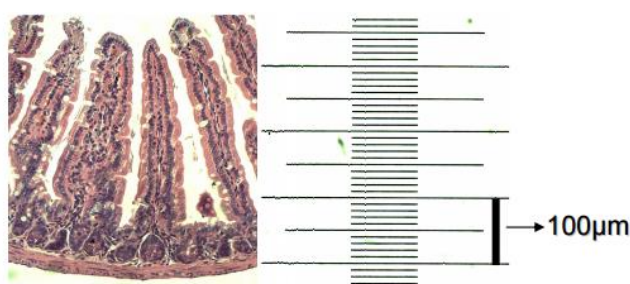


Figura 6. Régua milimetrada para morfometria intestinal. Régua milimetrada para morfometria intestinal. Os vilos e criptas intestinais foram medidos através de régua milimetrada.

4.9.2. Altura da camada submucosa e espessura da camada muscular

A altura da camada submucosa e espessura da camada muscular foram medidas através de lamínula milimetrada utilizando-se imagens capturadas com a objetiva de 40. Para cada animal foram contadas no mínimo 100 medidas.

4.9.3. Avaliação de imunoglobulinas no soro

A avaliação dos anticorpos presentes no soro dos camundongos foi realizada através do método ELISA. Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight*, por no mínimo 18 horas, a 4°C em câmara úmida, com solução contendo anticorpo anti-imunoglobulinas totais de camundongos em tampão de cobertura (tampão carbonato pH 9,6) concentração de 1µg/mL. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200 µl PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por duas vezes. Para a dosagem de Ig totais e IgG o soro foi diluído 1:2000 e para IgM e IgA 1:100 em PBS-caseína. Em seguida, foram feitas diluições seriadas com o soro em PBS-caseína e as placas foram incubadas durante uma hora a 37°C. Na sequência, as placas foram novamente lavadas. Anticorpos de cabra anti-Ig, IgG, IgM ou IgA de camundongo, conjugados com biotina 0,5mg/mL (Southern Biotechnology) e diluídos (1:10000) em PBS-caseína, foram adicionados aos poços (100 µL/poço). As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37°C. A seguir, foram lavadas e adicionou-se uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma) em diluição de 1:15000 (100µl/poço) em PBS-caseína durante uma hora a 37°C.

A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/mL de H₂O₂ e 0,4 mg/mL de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarela. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A absorbância ($\lambda = 492$ nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Asys- modelo Expert plus).

Todas as reações de ELISA acima descritas tiveram como controle positivo (padrão), anticorpos purificados IgA (10µg/mL) e Ig total, IgM, IgG (15µg/mL) de camundongo (Southern Biotechnology) diluídos em PBS-caseína. O controle negativo foi realizado com PBS-caseína.

4.10. Avaliação da sIgA no lavado intestinal

O conteúdo intestinal foi coletado do intestino delgado e cólon para dosagem de IgA secretória. O intestino delgado foi removido e cortado pela metade. Em seguida cada parte foi lavado com 5mL de solução salina tamponada (PBS) 1X gelado e o conteúdo coletado em um tubo de 15mL. O cólon foi retirado e, da mesma forma, lavado com 5mL de PBS 1x gelado. O conteúdo foi homogeneizado no vórtex e centrifugado durante 20 minutos a 1200 RPM a 4°C. O sobrenadante foi coletado e estocado no freezer a -80°C. Os níveis de IgA foram dosados em, no máximo, 48 horas após a coleta através da técnica de ELISA.

Os procedimentos para sensibilização e bloqueio são comuns aos procedimentos realizados para ELISA de Imunoglobulinas. Após o bloqueio, as placas foram lavadas duas vezes em salina-Tween e incubadas com conteúdo intestinal, obtido conforme protocolo anteriormente descrito. Foram adicionados no primeiro poço 20µl da amostra e 180µl de PBS-caseína. Nos demais poços foram adicionados 100µl de PBS caseína e em seguida foi feita diluição seriada. O controle foi realizado utilizando o padrão Mouse IgA-UNLB (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Foi adicionado 20µl do padrão diluído em 180 µl de PBS-caseína e em seguida foi realizado diluição seriada. Os procedimentos restantes de incubação com conjugado HRP e revelação são comuns ao ELISA de Imunoglobulinas séricas.

4.11. Dosagem de citocinas

Amostras do intestino delgado, cólon, baço e linfonodo mesentérico dos camundongos foram removidos, pesados e congelados a -80° para dosagem de citocinas.

4.11.1. Preparação do extrato de tecidos.

Foi adicionado 1mL de solução tampão para extração de proteínas para cada 100mg de tecido. As amostras foram trituradas com um homogeneizador de tecidos e centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. Durante a manipulação as amostras foram mantidas em gelo e a dosagem das citocinas foi realizada no mesmo dia.

4.11.2. Determinação da concentração de citocinas por ELISA

A determinação da concentração de citocinas foi realizada através do ensaio imunoenzimático ELISA. As placas de 96 poços (Nunc-Immuno Plates MaxiSorp) foram sensibilizadas com 100 µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra IFN-γ, IL-10, IL-6, TGF-β, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-17 e IL-12 diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina tween e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-caseína, por, no mínimo, 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com salina Tween. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes, assim como o padrão (do qual foi realizada diluição seriada) e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C.

No terceiro dia, as placas foram novamente lavadas e incubadas, por 1 hora a temperatura ambiente, com 100 µL/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para as citocinas já citadas. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (Southern Biotechnology), em uma diluição de 1/15000, foi adicionada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µL/mL de H₂O₂ e 0,4 mg/mL de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância ($\lambda = 492 \text{ nm}$) de cada poço foi obtida pelo leitor de ELISA automático (Asys- modelo Expert plus). Os valores das absorbâncias foram convertidos em ng/mL baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes, utilizadas como padrão.

4.12. Perfil de células na lâmina própria

A avaliação fenotípica das células foi realizada através da técnica de citometria de fluxo.

4.12.1. Obtenção de células da lâmina própria

Após a eutanásia dos animais, o intestino delgado e o cólon foram retirados e dispostos em placas de petri contendo HBSS gelado para posterior processamento. As placas de Peyer foram removidas do intestino e, após delicada e minuciosa remoção de muco, fezes e tecido gorduroso aderido aos intestinos, os mesmos foram abertos longitudinalmente e fracionados em porções de cerca de 2cm. Depois de 3 lavagens com agitação manual e filtração do tecido em rede de metal, os tecidos foram incubados durante 15 minutos a 37°C em HBSS contendo 0.15mg/ml de DTT (Dithiothreitol, Sigma) para desestruturação da camada epitelial. Posteriormente, os tecidos foram agitados manualmente para remoção das células epiteliais e filtrados novamente. O tecido restante foi então incubado por 1h a 37°C em meio Iscov's contendo 10% de SFB, 0.17 mg/ml de Liberase TL (Roche) e 30µg/ml de DNase I (Roche) para desagregar a matrix extracelular e permitir extração dos leucócitos. Após este período as células foram centrifugadas, lavadas e filtradas por duas vezes em filtros de nylon (cell strainer, BD) de 70µm e 40µm. A concentração celular foi determinada e as células isoladas foram utilizadas para os ensaios subsequentes.

4.12.2. Citometria de fluxo

Células isoladas dos órgãos foram plaqueadas e em seguida adicionados 10µl por poço do coquetel de anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com fluorocromos, conforme relação da tabela 5. Os anticorpos utilizados estão relacionados na tabela 6. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz.

Tabela 5. Painel de anticorpos para fenotipagem celular por citometria de fluxo

	Anticorpos	Fluorocromo
Marcação 1	Anti-CD4	FITC
	Anti-FOX	APC
	Anti-CD44	PE
Marcação 2	Anti-CD4	FITC
	Anti-RORyt	PE
	Anti-IL-23R	Percp 5.5

Para a marcação intracelular, após essa primeira etapa, foi utilizado kit de fixação/permeabilização comercial (e-Bioscience) e em seguida as amostras foram incubadas por mais trinta minutos com anticorpos anti-foxp3 ou anti-RORyt de camundongo. Após as lavagens com PBS-wash, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 3% durante 30 minutos, lavadas e armazenadas em PBS-wash a 4°C para leitura no citômetro.

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de leitura FACScanto II (Becton Dickinson). A partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células pelo padrão de dispersão do laser após a passagem das mesmas (Forward Scatter x Side Scatter), foram delimitadas as populações de linfócitos. Dentro do gate de linfócitos, foi delimitada a região de células positivas para CD4 e, entre estas, a expressão das demais marcações de interesse (CD4+ CD44+, CD4+ FOXP3+, CD4+ RORyt +, CD4+ IL-23R+). As análises foram feitas utilizando o software FlowJo (Tree Star) para determinar as populações positivas e negativas para cada marcação além do nível de expressão das respectivas moléculas. A estratégia para determinação de cada população de interesse está esquematizada na Figura 7.

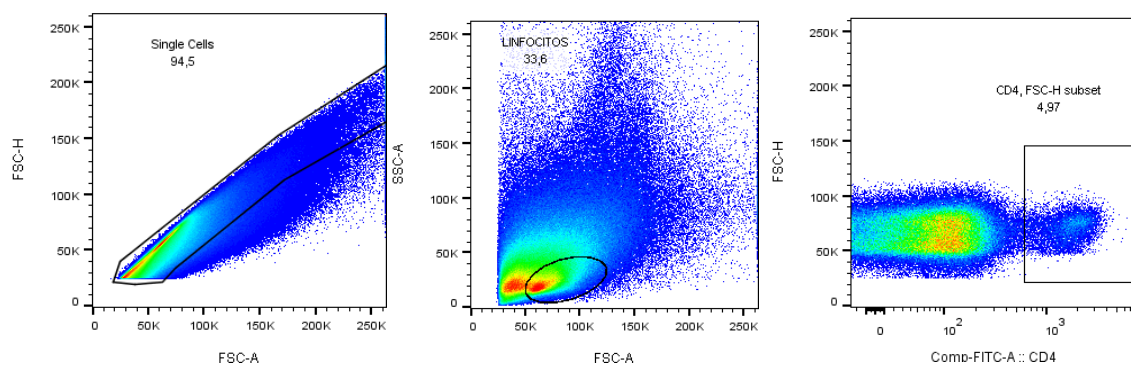


Figura 7. Estratégia de análise fenotípica por citometria de fluxo. A população de linfócitos foi delimitada por tamanho e granulosidade. Sem seguida, a região positiva para as marcações de interesse foi determinada, conforme marcação específica para cada tipo celular.

4.13. Análise Estatística dos Dados

Os testes estatísticos utilizados foram o *test t de Student*, para comparação de dois grupos, e o teste two-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O programa utilizado para fazer os testes foi o GraphPad Prism versão 6[®].

4.14. Soluções

PBS 10x – pH 7,2

- 80,00 g de NaCl;
- 2,00 g de KCl;
- 21,70 g de Na₂HPO₄;
- 2,00 g de KH₂PO₄;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Salina 10x

- 85 g de NaCl;
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Salina fisiológica a 0,85% (a partir da solução estoque 10X)

- 100 mL da solução salina 10X;
- 900 mL de água bidestilada ou deionizada;

- Filtrada em fluxo laminar ou autoclavada

RPMI 1640 incompleto - pH 7,3

- 16,2g RPMI 1640 (Gibco)
- 2 g de NaHCO₃
- 3,6 g/L de HEPES
- 1000 mL com água milli-Q.
- Filtrado em fluxo laminar e conservado em 4°C

RPMI 1640 completo

- 450 ml de meio RPMI incompleto;
- 50 mL de soro fetal bovino;
- 5 mL de solução de aminoácidos não essenciais (100X - 10mM);
- 5 mL de solução de piruvato de sódio (100X - 100mM) ou 55 mg de piruvato de sódio;
- 5 mL de L-glutamina (100x - 200 mM);
- 0.450 mL de 2-mercaptoetanol.
- 2,5mL de gentamicina (5mg/mL);
- 1,5mL de fungizona

Tampão Carbonato pH 9,6 (Coating Buffer)

- 1,86 g de Na₂CO₃;
- 2,93 g NaHCO₃ - 0,035M;
- 1000 mL de água destilada ou deionizada

Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

- NaCl 0,0015M
- KCl 0,0081M
- Na₂HPO₄ x 7 H₂O 0,1369M
- KH₂PO₄ 0,0027M

PBS-caseína 25%

- Tampão fosfato pH 7,2
- 2,5 g de caseína.
- 1000 mL de solução PBS 1x

Tampão Citrato - pH 5

- 13,41 g de Na₂HPO₄
- 5,19 g de Ácido cítrico (C₆H₈O₇)
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Solução de ácido sulfúrico 2N

- 53,24 mL de H₂SO₄
- 1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Solução OPD

- OPD: 4 mg
- H₂O₂ – 2µl
- Tampão citrato pH 5: 10 MI

Solução para extração de citocinas (1ml para cada 100mg de tecido)

- 0,05% de Tween-20
- 0,1 mM de PMSF
- 0,1 mM de cloreto benzotônio
- 10 mM de EDTA
- 20 KIU de aprotinina A

Soluções para extração e células da lâmina própria

HBSS

- NaCl, 8.0g
- KCl, 0.4g
- CaCl₂, 0.14g
- MgSO₄ 7H₂O, 0.1g
- MgCl₂.6H₂O, 0.1g

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06g
- KH_2PO_4 , 0.06g
- Glicose 1.0g
- NaHCO_3 0.35g
- H_2O para completar 1000 ml

BUFFER A:

- HBSS (500ml)
- 5% FCS (25ml)
- 25mM HEPES(12.5ml of 1M)

BUFFER B:

- HBSS (500ml)
- 2mM EDTA (2ml of 0.5M EDTA)
- 25mM HEPES (12.5ml of 1M HEPES]

BUFFER C:

- HBSS (500ml)
- 15mM HEPES (7.5ml of 1M HEPES)
- 5mM EDTA (5ml of 0.5M EDTA)
- 10% FCS
- 0.015% or 1mM DTT (0.077g in 500ml)

6. Resultados |



5. Resultados

5.1. Efeitos do consumo da dieta contendo aminoácidos livres no estado nutricional e no metabolismo.

O sistema imune é influenciado diretamente pelo estado nutricional. Assim, é importante garantir que as dietas utilizadas nesse estudo sejam igualmente capazes de promover e manter o estado nutricional normal dos animais e que as eventuais diferenças em parâmetros imunológicos observados entre os grupos não sejam devidas a alterações nutricionais. Dessa forma, foram investigados os efeitos das dietas contendo caseína ou aminoácidos livres no consumo alimentar, no peso corporal e em medidas bioquímicas.

O consumo alimentar foi semelhante entre os grupos durante todo o protocolo experimental. Da mesma forma, a ingestão da dieta contendo aminoácidos livres não alterou o crescimento dos animais, não havendo, portanto, diferenças no peso corporal entre os grupos (figura 8 A e B).

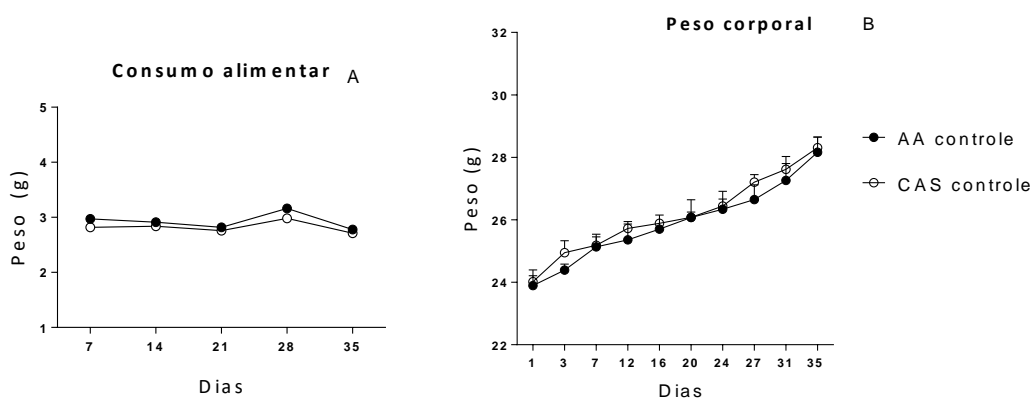


Figura 8. Consumo alimentar e curva de crescimento Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dieta CAS ou AA durante 5 semanas. A) Consumo alimentar. A ingestão alimentar foi avaliada através do consumo médio diário de ração por animal. B) Para a avaliação da curva de crescimento, o peso dos animais foi aferido de duas a três vezes por semana. Os resultados foram expressos como peso médio de cada grupo. Número de animais por grupo = 5. Teste estatístico: two-way ANOVA. $P < 0,05$

Os exames bioquímicos proteínas séricas totais, albumina, transferrina, triglicérides, colesterol e glicemia também não apresentaram diferenças entre os grupos (figura 9 A-F).

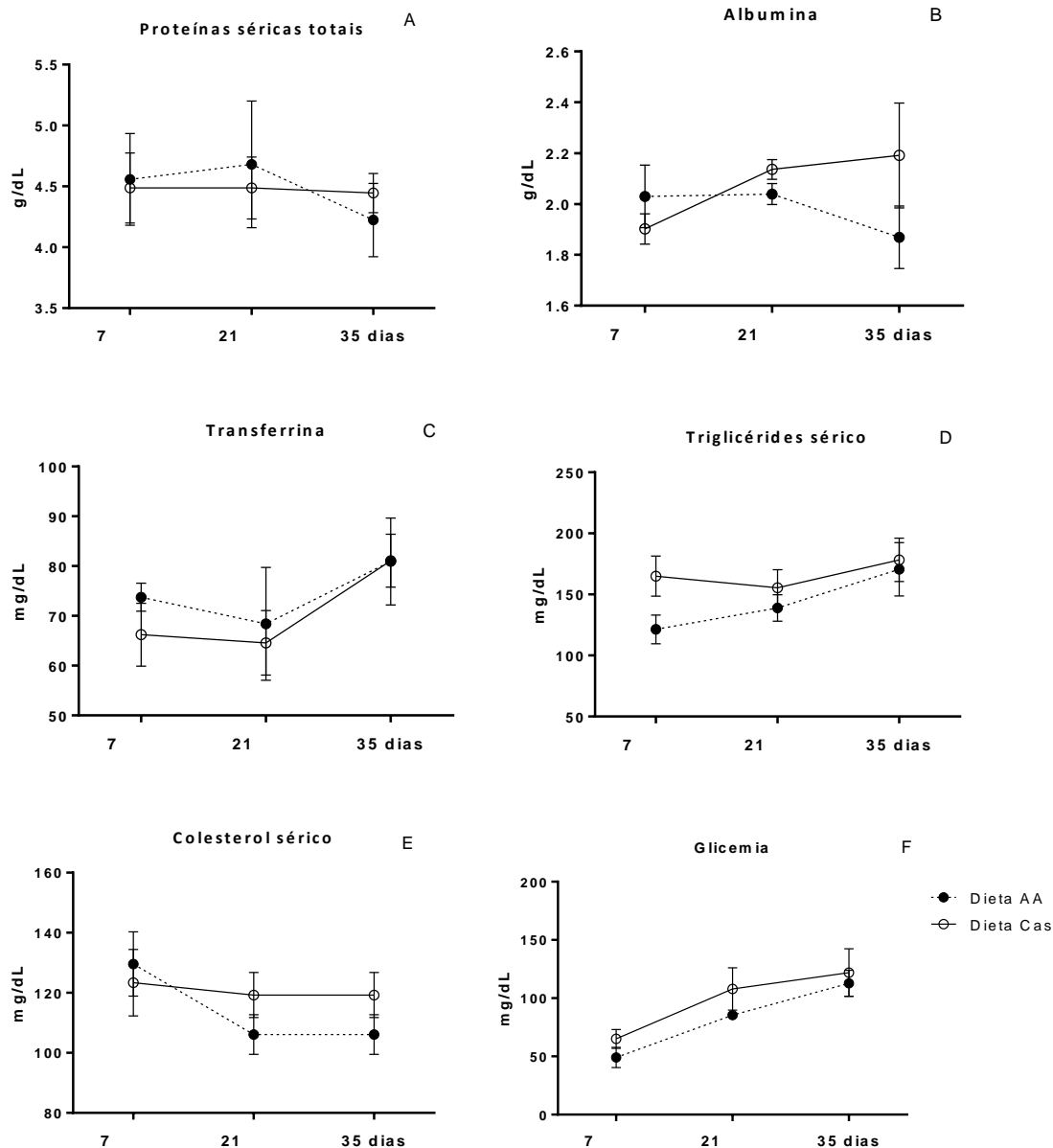


Figura 9. Exames bioquímicos. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. Nos tempos experimentais de 1, 3 e 5 semanas, os exames bioquímicos proteínas séricas totais (A), albumina (B), transferrina (C), triglicérides séricos (D), colesterol sérico (E) e glicemia (F) foram dosados em amostras de soro, após jejum de 12 horas, através de testes bioquímicos. Número de animais por grupo = 5 a 10. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. $P < 0,05$.

Dessa forma, os dados obtidos demonstram que o consumo de dieta contendo aminoácidos livres não altera o estado nutricional dos animais, sendo esta nutricionalmente equivalente à dieta contendo proteínas intactas.

5.2. Efeitos da ausência das proteínas dietéticas na produção de imunoglobulinas

As proteínas dietéticas representam importante fonte de estímulo antigênico para produção de imunoglobulinas séricas e sIgA após o desmame (Menezes *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2006). Porém, a relevância dessa estimulação em situações de maturidade imunológica não está clara. Devido a isso, os níveis de imunoglobulinas séricas e sIgA intestinal foram avaliados.

Ao avaliar os níveis de imunoglobulinas séricas totais, não foram observadas diferenças entre os grupos em nenhum dos tempos experimentais (figura 10 A). Porém, a análise isolada dos isotipos demonstrou que a ausência do estímulo dietético proteico influencia a produção de imunoglobulinas, sobretudo após uma semana de consumo das dietas. Quando comparado ao grupo caseína, os níveis de IgA sérica foram menores no grupo aminoácido após sete dias de consumo da dieta, assim como IgG sérica após 7 e 21 dias de consumo (figura 10 B e C respectivamente). Contrariamente à IgA e IgG, o nível de IgM foi semelhante entre os grupos nos dias 7 e 21, sendo menor no grupo aminoácido somente após 33 dias de consumo da dieta (figura 10 D).

Não houve diferença entre os grupos nos níveis de sIgA no intestino delgado. Porém no cólon, o consumo de dieta contendo aminoácidos livres promoveu aumento da sIgA após 35 dias quando comparado ao grupo caseína (figura 10 E-F).

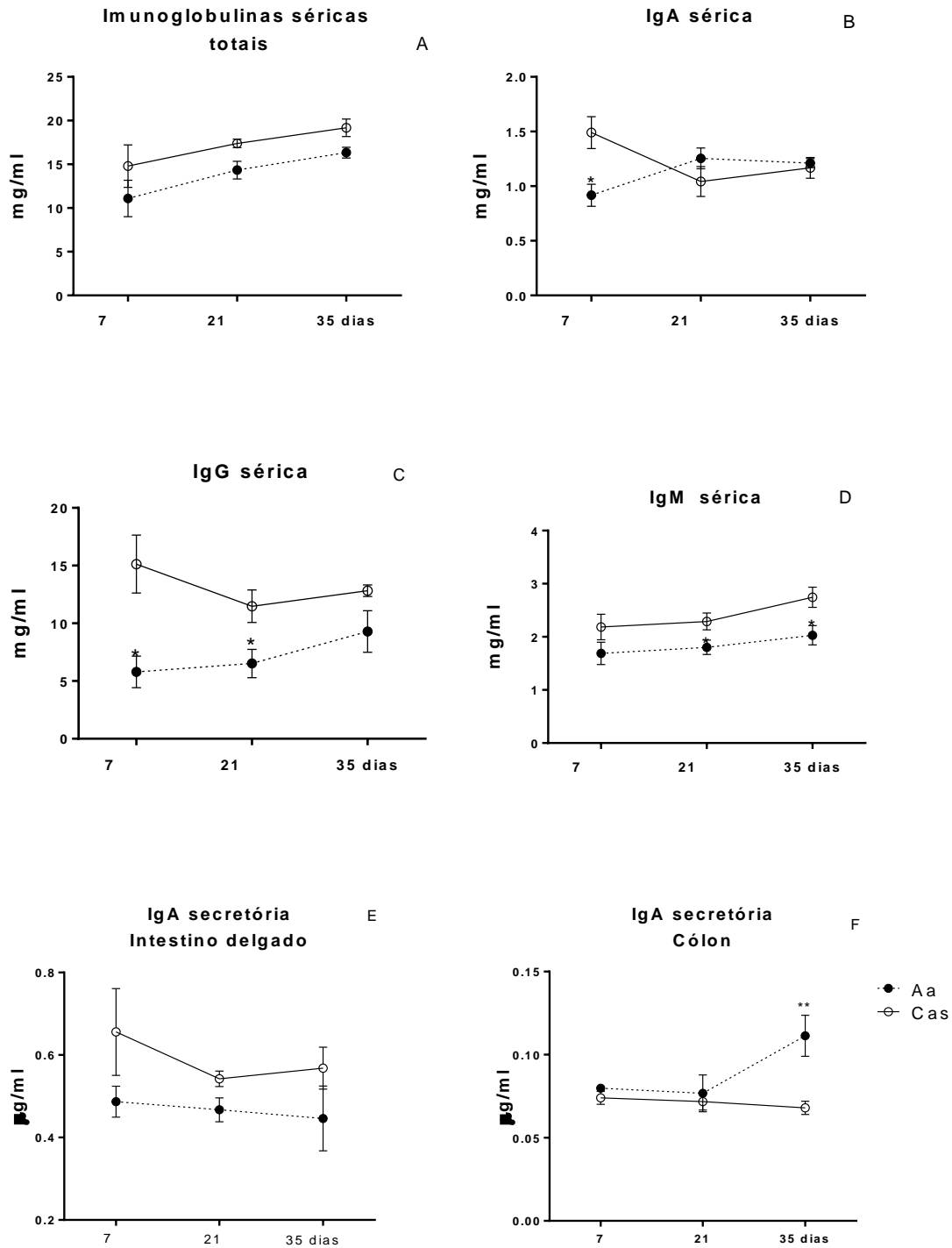


Figura 10. Produção de imunoglobulinas séricas e IgA secretória. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. Os níveis de imunoglobulinas totais (A), IgA (B), IgG (C) e IgM (D) foram dosados no soro por ELISA após 1, 3 e 5 semanas de dieta. Nos mesmos tempos experimentais, a sIgA foi dosada no lavado intestino do intestino delgado (E) e cólon (F). Número de animais por grupo = 5. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. $P < 0,05$.

5.3. Efeitos da dieta contendo aminoácidos livres na produção de citocinas

Foi investigado se a dieta livre de proteínas intactas provoca alterações no perfil de citocinas no baço, intestino delgado, cólon e linfonodo mesentérico.

No baço, o grupo alimentado com a dieta contendo aminoácidos livres apresentou, quando comparado ao grupo caseína, menores concentrações de IL-10, IL-4, IFN- γ , IL-17A e TGF- β após uma semana de consumo. Já após três e cinco semanas de dieta, esse efeito não foi mais observado, não havendo diferenças entre os grupos, exceto menores níveis de IL-4 no grupo AA após três semanas (figura 11 A-G).

No intestino delgado, o grupo alimentado com a dieta contendo aminoácidos livres apresentou maiores níveis de IL-6, após sete dias de consumo, e IL-17A após 7 e 14 dias de dieta. Após cinco semanas de consumo das dietas, os níveis dessas citocinas no grupo aminoácido (AA) retornaram para valores semelhantes ao grupo caseína. Os níveis de IL-10 foram semelhantes entre os grupos durante todo o protocolo experimental (Figura 12 A-C).

De forma similar ao intestino delgado, no cólon, o grupo AA apresentou maiores níveis de IL-6 e IL-17A após sete dias de consumo das dietas. Esse resultado também foi observado para as citocinas IL-10 e TGF- β . Nos dias 21 e 35, as diferenças entre os grupos não foram mais observadas, exceto menores níveis de IL-17A no grupo aminoácido ao final do protocolo experimental. Não houve diferença nos níveis de IL-12 e IFN- γ entre os grupos em nenhum tempo avaliado. Os níveis de IL-4 foram menores no grupo aminoácido após cinco semanas de consumo, quando comparado ao grupo caseína (figura 13 A-G).

Esses resultados demonstram que a dieta contendo aminoácidos livres apresenta efeitos específicos iniciais, tanto no baço quanto no intestino, que são modificados ou compensados por outros mecanismos ao longo do consumo das dietas.

Nos linfonodos mesentéricos, não foram observadas diferenças entre os grupos nas citocinas avaliadas (Figura 14 A -G).

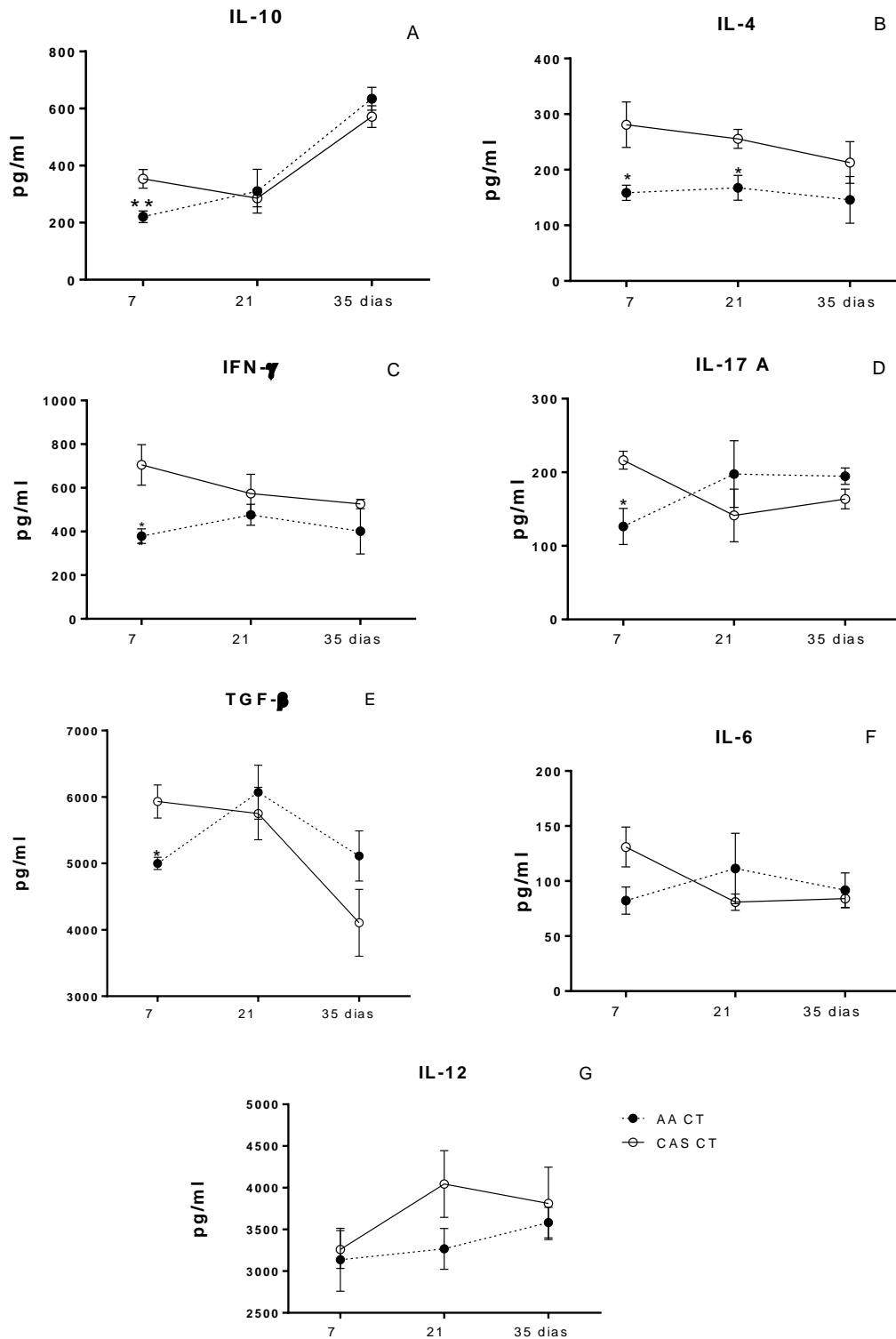


Figura 11. Níveis de citocinas no baço. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. Os níveis de IL-10 (A), IL-4 (B), IFN- γ (C), IL-17A (D), TGF- β (E), IL-6 (F) e IL-12 (G) foram dosados no baço por ELISA após 1, 3 e 5 semanas de dieta. Número de animais por grupo = 4 a 7. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. $P < 0,05$.

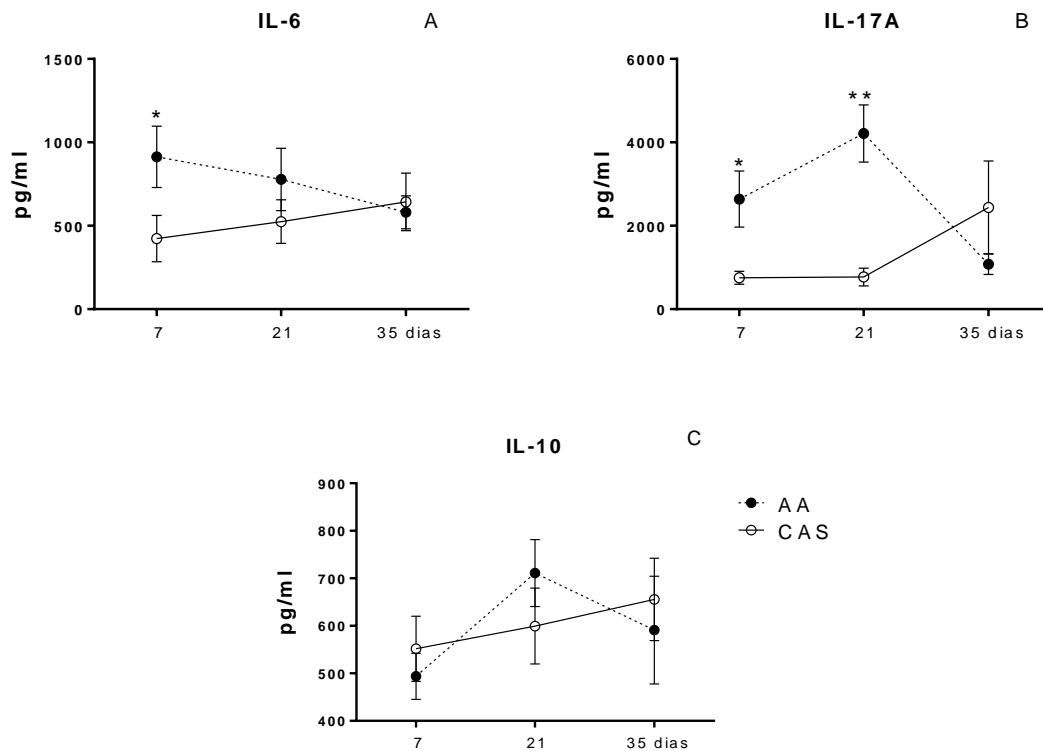


Figura 12. Níveis de citocinas no intestino delgado. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. Os níveis de IL-6 (A), IL-17A (B) e IL-10 (C) foram dosados no intestino delgado (jejuno) por ELISA após 1, 3 e 5 semanas de dieta. Número de animais por grupo = 4 a 7. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. $P < 0,05$.

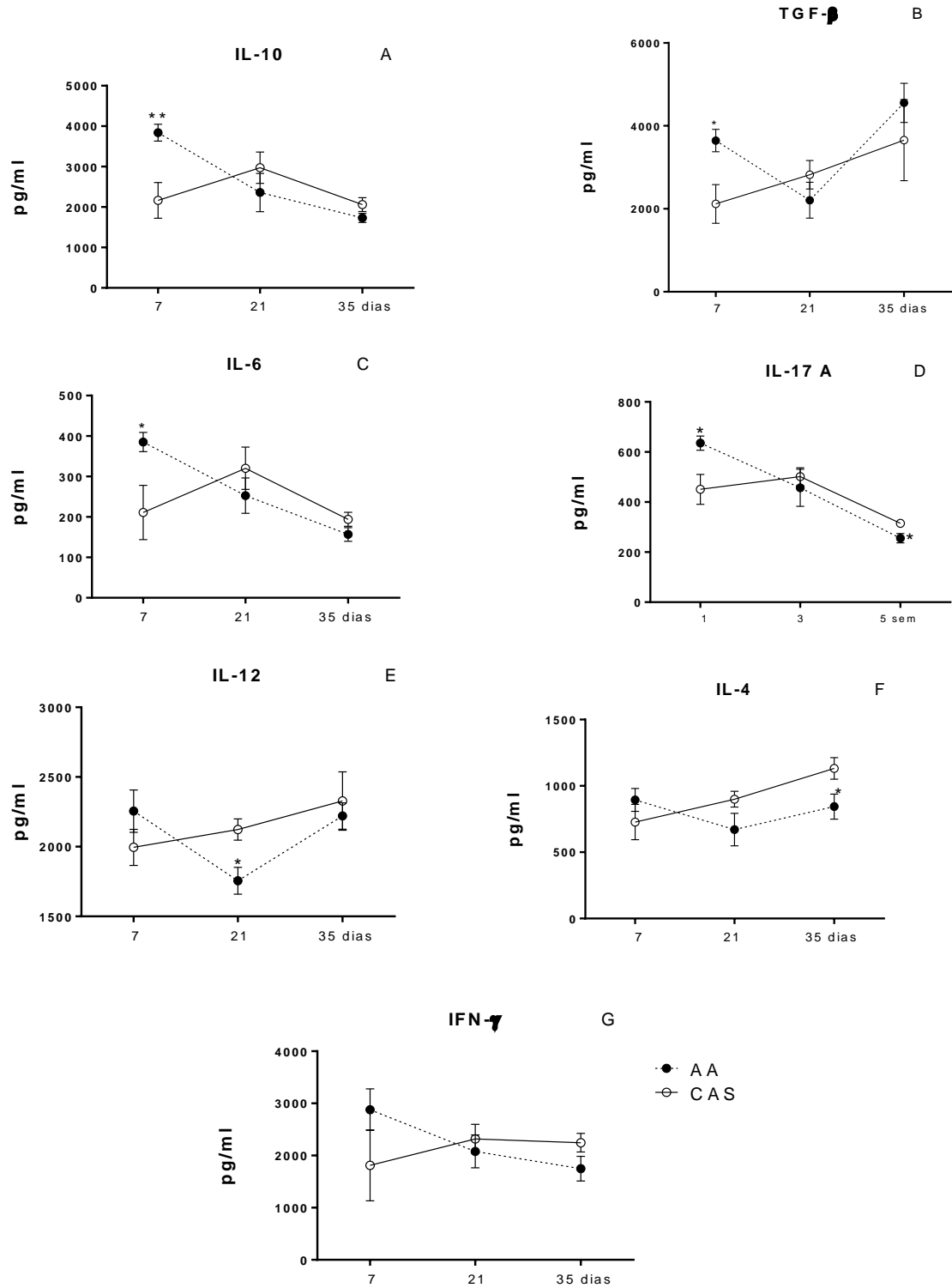


Figura 13. Níveis de citocinas no cólon. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. Os níveis de IL-10 (A), TGF-β (B), IL-6(C), IL-17A (D), IL-12 (E), IL-4 (F) e IFN-γ (G) foram dosados no cólon por ELISA após 1, 3 e 5 semanas de dieta. Número de animais por grupo = 4 a 7. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. P<0,05.

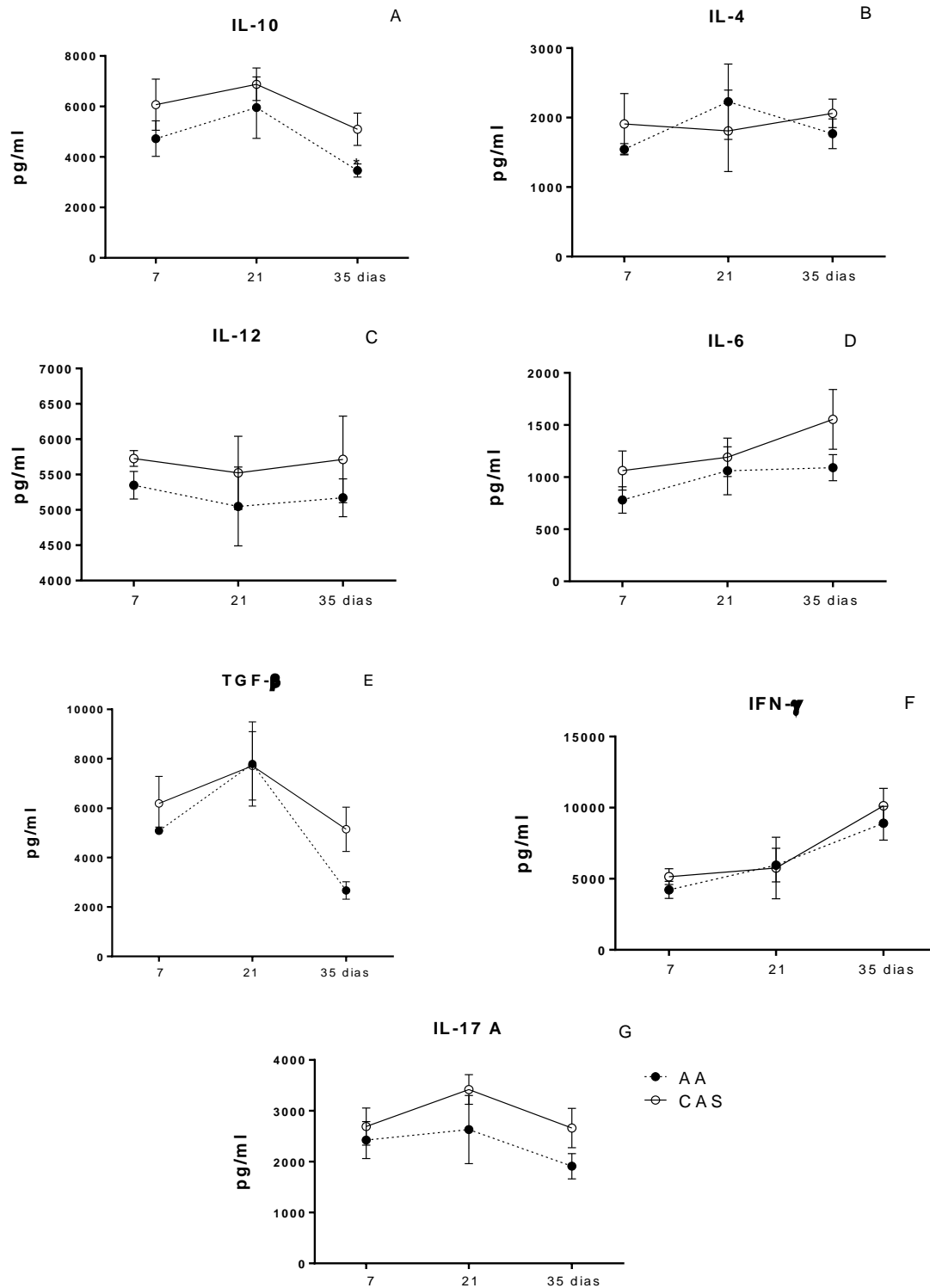


Figura 14. Níveis de citocinas nos linfonodos mesentéricos. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. Os níveis de IL-10 (A), IL-4 (B), IL-12(C), IL-6 (D), TGF-β (E), IFN-γ (F) e IL-17A (G) foram dosados nos linfonodos mesentéricos por ELISA após 1, 3 e 5 semanas de dieta. Número de animais por grupo = 4 a 7. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. P<0,05.

5.4. Efeitos da dieta livre de proteínas intactas no perfil de células intestinais

Diante dos resultados anteriores, que demonstraram que o consumo de dietas contendo aminoácidos livres altera os níveis de citocinas no intestino, foi avaliado se essas alterações são acompanhadas por mudanças no perfil de células na lâmina própria do intestino. As células T reguladoras Foxp3⁺ e Th17 foram verificadas na lâmina própria do intestino delgado e cólon após uma e cinco semanas de consumo das dietas, tempos experimentais em que as principais alterações descritas acima foram observadas.

O número de células na lâmina própria do intestino delgado foi semelhante entre os grupos após uma semana de dieta. Porém, após cinco semanas, o grupo aminoácido apresentou um grande aumento no número de células totais quando comparado ao grupo caseína. O consumo de dietas contendo aminoácidos livres provocou aumento de células T CD4⁺, após uma e cinco semanas, e linfócitos T ativados CD4⁺ CD44⁺, após cinco semanas de dieta (figura 15 A-C).

Após consumo de dietas contendo aminoácidos durante cinco semanas, os animais também apresentaram na lâmina própria do intestino delgado maior número de células T reguladoras CD4⁺ Foxp3⁺ e linfócitos TCD4⁺ ROR γ t⁺. O número de células TCD4⁺ CD23R⁺ foi semelhante entre os grupos (figura 15 D-F).

Na lâmina própria do cólon não foram observadas diferenças no perfil das células analisadas (figura 16 A - F).

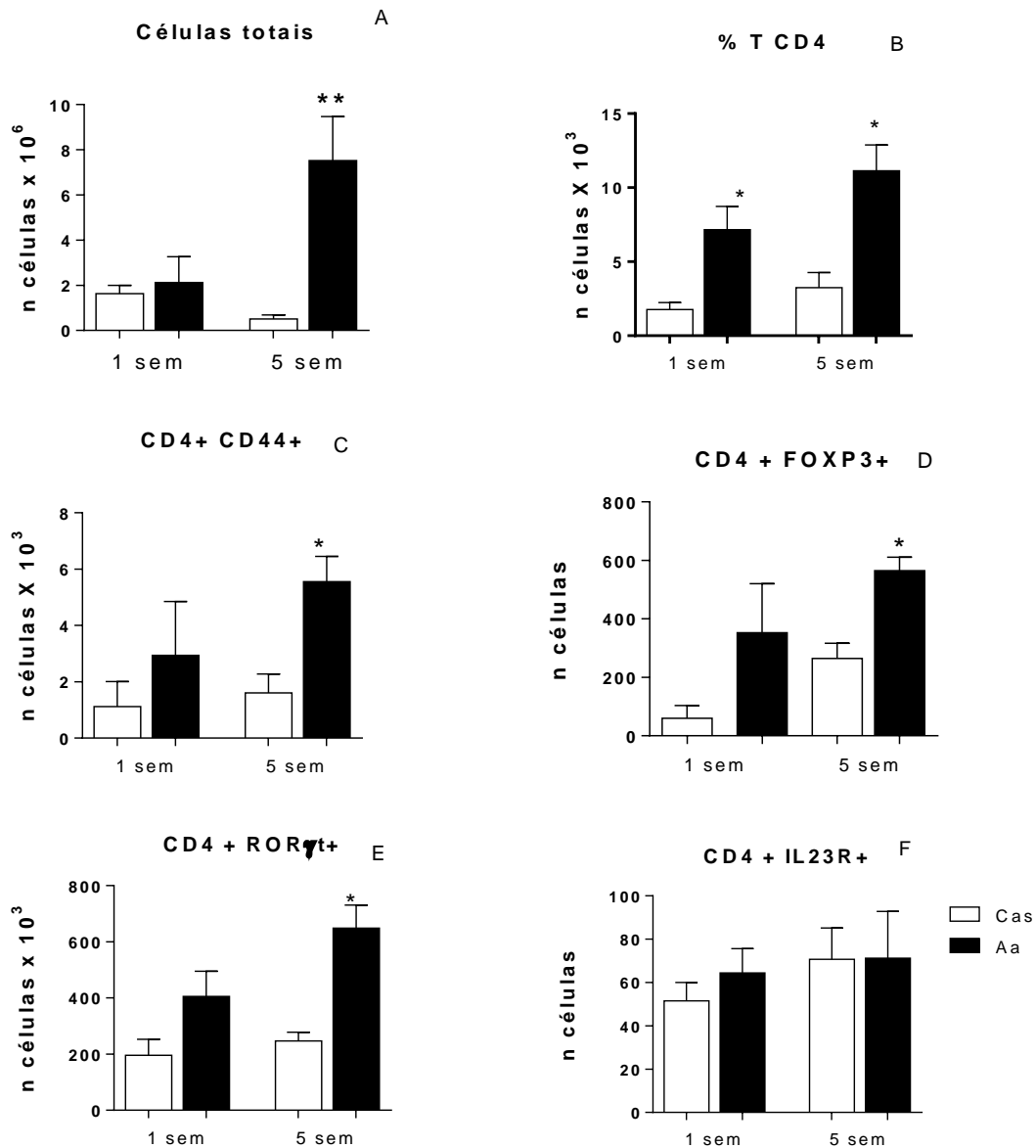


Figura 15. Perfil de células na lâmina própria do intestino delgado. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. O perfil de células totais (A), linfócitos T CD4+ (B), TCD4+ CD44+ (C), CD4+Foxp3+ (D), CD4+RORγt+ (E) e CD4+CD23R+ (F) foram avaliados, através de citometria de fluxo, na lâmina própria do intestino delgado após 1 e 5 semanas de consumo das dietas. Número de animais por grupo = 3 a 5. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. P<0,05.

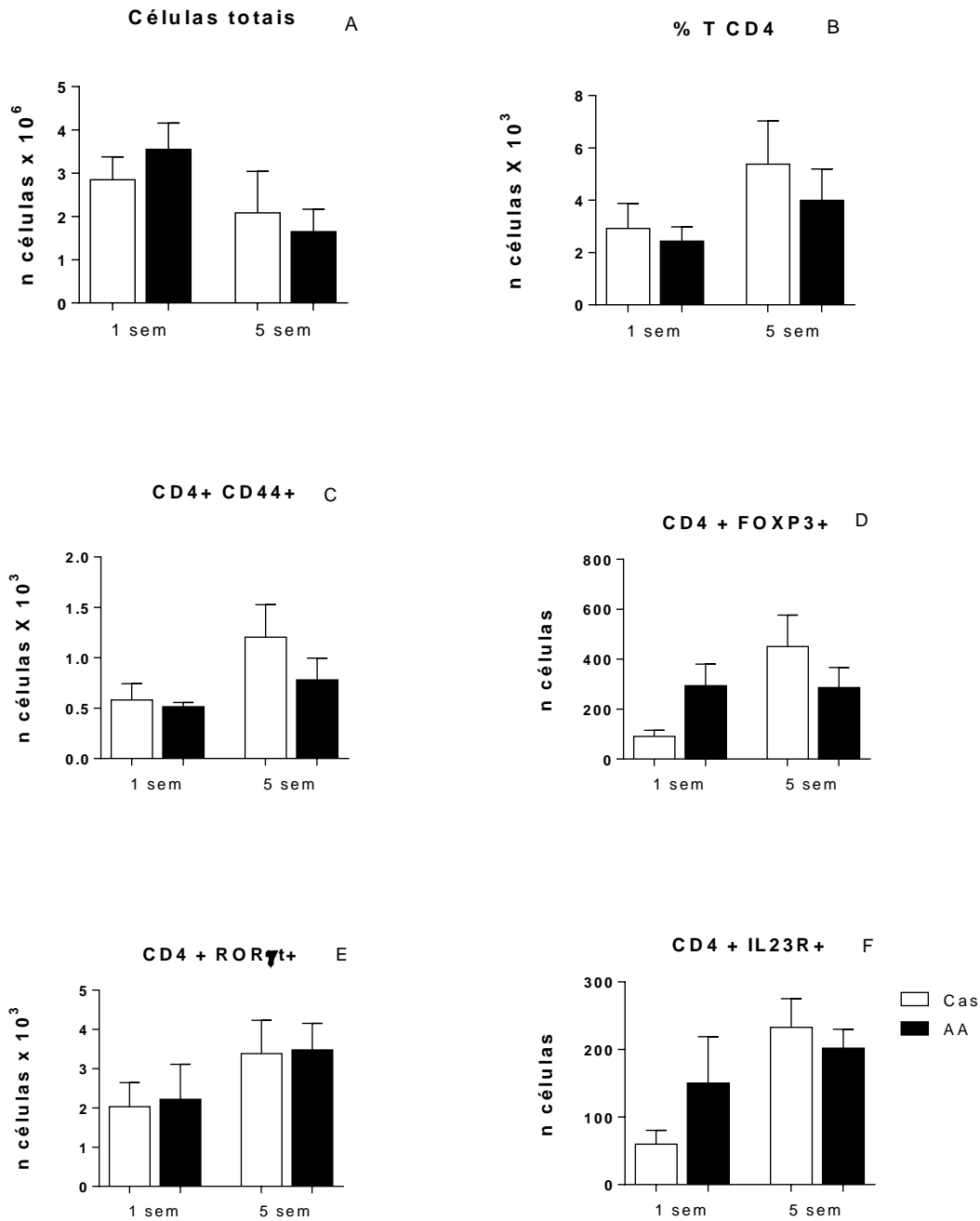


Figura 16. Perfil de células na lâmina própria do cólon. Camundongos C57BL/6 com idade inicial de 8 semanas foram alimentados com dietas contendo aminoácidos livres ou proteínas intactas durante 5 semanas. O perfil de células totais (A), linfócitos (B), linfócitos T CD4+ (C), TCD4+ CD44+ (D), CD4+Foxp3+ (E), CD4+RORγt+ (F) e CD4+CD23R+ (G) foram avaliados, através de citometria de fluxo, na lâmina própria do cólon após uma e cinco semanas de consumo das dietas. Número de animais por grupo = 3 a 5. A análise estatística foi realizada entre os grupos caseína e aminoácido em cada tempo experimental. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. P<0,05.

5.5. Efeitos da dieta isenta de proteínas intactas na morfologia intestinal.

O consumo de dietas contendo aminoácidos livres provocou importantes alterações no intestino como níveis de sIgA, citocinas e células na lâmina própria. Dessa forma, foi avaliado se essa dieta também influencia a morfologia intestinal. A análise morfológica foi realizada no intestino delgado e cólon.

No intestino delgado, quando comparado à dieta caseína, o consumo da dieta AA provocou aumento do tamanho do vilo em todos os períodos avaliados. Além disso, o grupo AA apresentou maior profundidade da cripta após cinco semanas de consumo (figura 17 A-E)

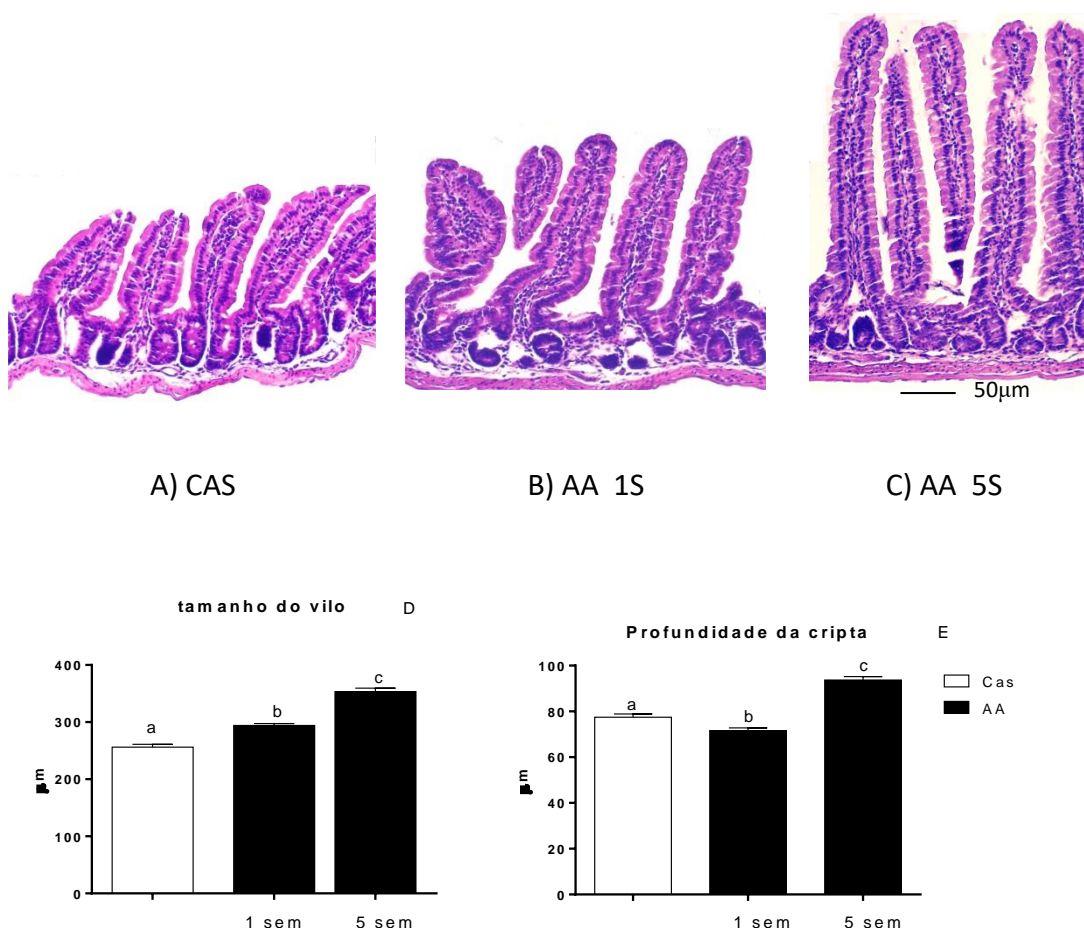


Figura 17. Análise morfológica do intestino delgado. Figuras de lâminas histológicas representativas do grupo controle (A) e dos grupos experimentais AA após 1 (B) e 5 semanas (C). Para as análises morfométricas tamanho do vilo (D) e profundidade da cripta (E) foram considerados pelo menos três animais por grupo. As análises foram realizadas em aumento de 10x. Teste estatístico ANOVA. $P < 0,05$.

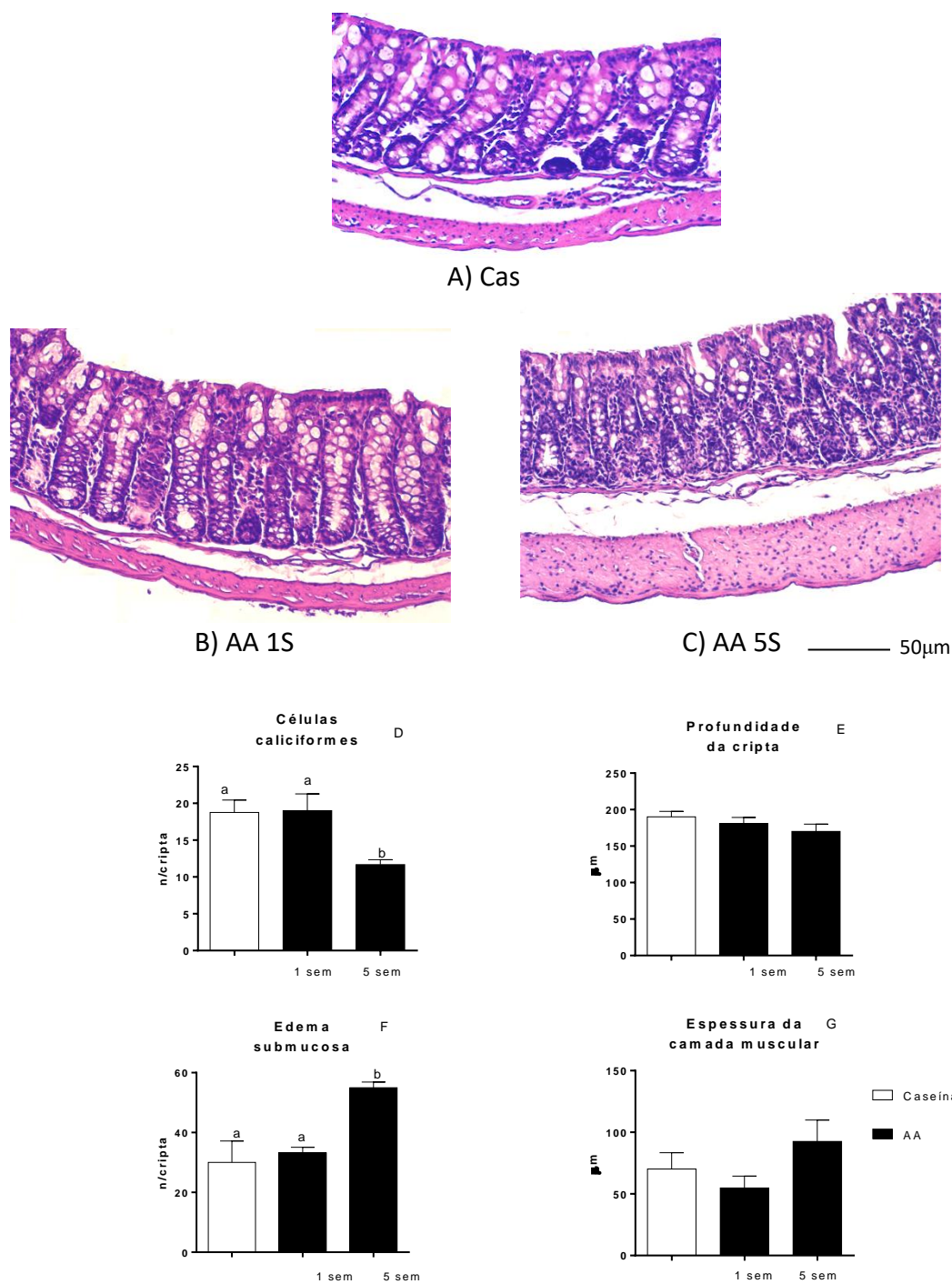


Figura 18. Análise morfológica do cólon. Figuras de lâminas histológicas representativas do grupo controle (A) e dos grupos experimentais AA após 1 (B) e 5 semanas (C). Para as análises morfométricas (D-G) foram considerados pelo menos três animais por grupo. As análises foram realizadas em aumento de 40x. Teste estatístico ANOVA. $P < 0,05$.

No cólon, o consumo da dieta AA durante uma semana não provocou alterações morfológicas. Porém, após cinco semanas o grupo AA apresentou

alterações histopatológicas como maior infiltrado celular na camada mucosa, redução de células calciformes e maior edema da camada submucosa (Figura 18 A – G).

5.6. Efeitos de dieta contendo aminoácidos livres na inflamação intestinal

Os resultados apresentados anteriormente demonstraram que o consumo de dietas contendo aminoácidos livres em substituição às proteínas intactas provocam diversas alterações imunológicas no intestino e sistemicamente. Entre as alterações intestinais, destacam-se alterações morfológicas no cólon como aumento do infiltrado celular e edema da camada submucosa, como evidenciado pelas imagens histológicas. Além disso, o consumo de dietas contendo aminoácidos livres provocou alterações em células do perfil Th17, que possuem papel importante nas respostas imunológicas intestinais, além de um grande aumento no número de células no intestino delgado. Dessa forma, os resultados sugerem um desbalanço da homeostase intestinal decorrente do consumo dos aminoácidos livres. Diante disso, foi avaliado se, durante situações de inflamação intestinal, o consumo dessas dietas teria alguma influência.

Quando consumida durante a indução da colite (protocolo experimental 2), a dieta AA provocou exacerbação da inflamação. Os animais do grupo aminoácido apresentaram perda de peso mais intensa desde o primeiro ciclo de DSS até o final do protocolo de indução da colite (figura 19 A). O escore clínico, que considera a presença e intensidade do sangramento, diarreia e perda de peso, também foi maior no grupo aminoácido nos três períodos avaliados (figura 19 B). O comprimento do cólon, uma medida inversamente proporcional à inflamação, também foi menor no grupo alimentado com a dieta contendo aminoácidos livres (figura 19 C). Esses dados demonstram que o consumo de aminoácidos livres durante a indução da inflamação intestinal apresenta efeitos deletérios intensos, contribuindo para maior gravidade da inflamação intestinal.

O grupo aminoácido apresentou, ao final do terceiro ciclo de indução da colite, maiores níveis de sIgA no cólon quando comparado ao grupo caseína. Não houve diferença nos níveis da sIgA no intestino delgado (figura 19 D e E).

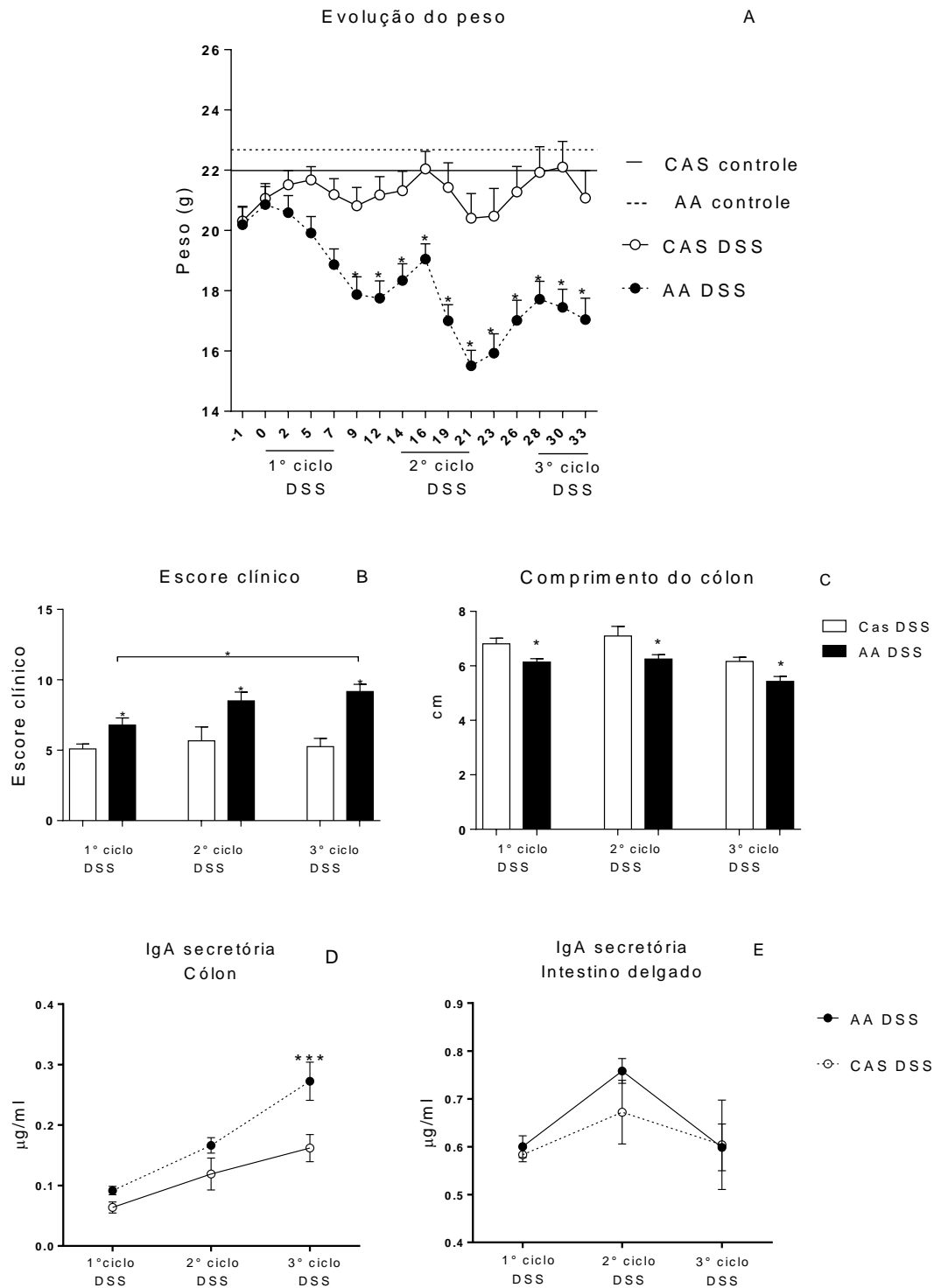
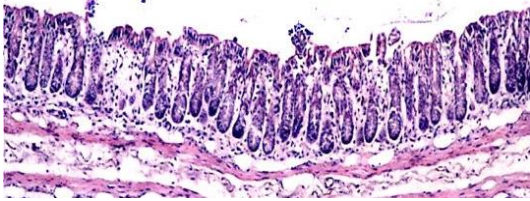


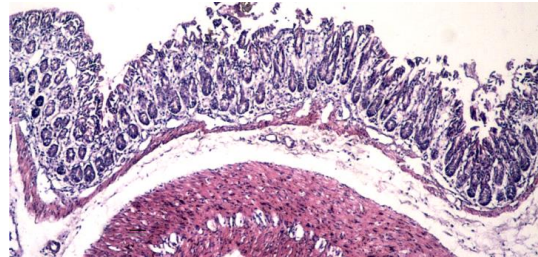
Figura 19. Avaliação do peso corporal, parâmetros clínicos e níveis de IgA durante a inflamação intestinal (protocolo experimental 2). A colite foi induzida através de três ciclos de consumo de DSS a 1% com duração de sete dias e intercalado por períodos de recuperação de sete dias, em que o DSS foi substituído por água. O peso corporal (A), escore clínico (B), comprimento do cólon (C) e níveis de IgA no intestino delgado (D) e cólon (E) foram avaliados ao final de cada ciclo de indução da colite. A análise estatística foi realizada entre os grupos em cada tempo experimental. Número de animais por grupo = 5 a 12. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. $P < 0,05$.

A análise histológica, realizada ao final do terceiro ciclo de indução da inflamação, também demonstrou maior gravidade da colite no grupo alimentado com a dieta contendo aminoácidos livres. O índice histológico evidenciou nesse grupo maior depleção de células caliciformes, erosão da camada mucosa, infiltrado celular na camada mucosa e submucosa e edema (figura 20).

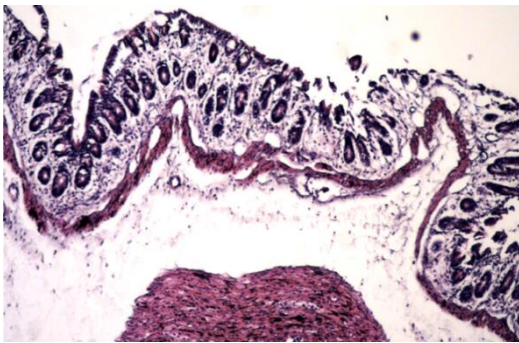
Caseína – controle



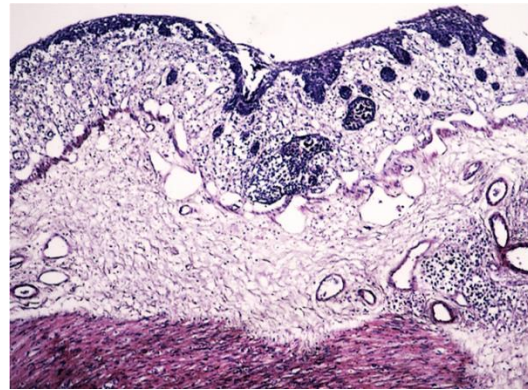
Aminoácido - controle



Caseína DSS



Aminoácido DSS



40X

Escore histológico

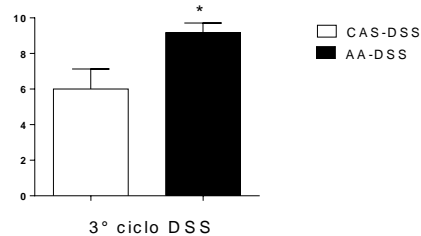


Figura 20. Avaliação histológica da inflamação intestinal (protocolo experimental 2). A colite foi induzida através de três ciclos de consumo de DSS a 1% com duração de sete dias e intercalado por períodos de recuperação de sete dias, em que o DSS foi substituído por água. A análise histológica foi realizada ao final do terceiro ciclo de indução da colite. Número de animais por grupo = 6. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. $P < 0,05$.

No protocolo experimental de indução da colite demonstrado acima, os animais consumiram as dietas caseína e aminoácido juntamente com o DSS. Além disso, também foi avaliado se o consumo das dietas previamente à indução da colite apresenta algum efeito na gravidade da inflamação (protocolo experimental 3). Dessa forma, foi possível avaliar se os efeitos induzidos pela dieta contendo aminoácidos livres são precoces e duradouros, influenciando o desenvolvimento da inflamação mesmo após a interrupção do seu consumo.

O consumo da dieta contendo aminoácidos livres previamente à indução da inflamação também provocou maior gravidade da colite. O grupo aminoácido apresentou maior escore clínico, menor comprimento do cólon e maior escore histológico quando comparado ao grupo caseína (figura 21 A-D).

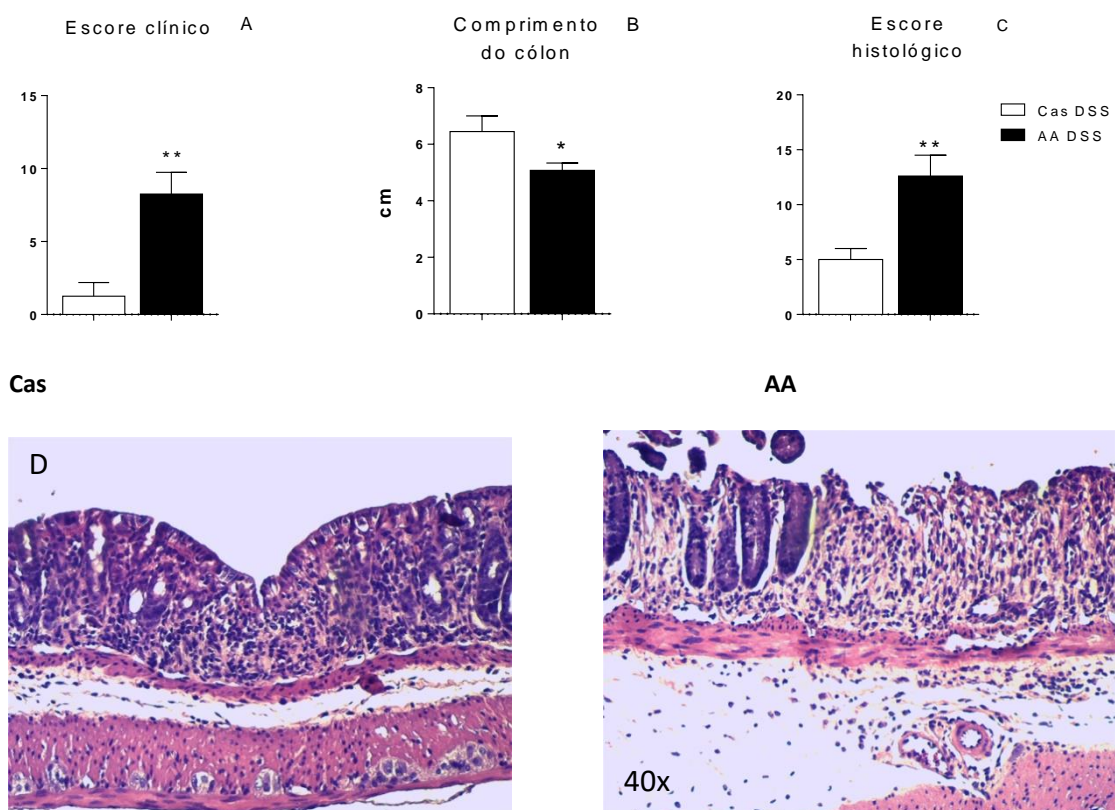


Figura 21. Avaliação clínica e histológica da inflamação intestinal (protocolo experimental 3). Animais C57BL/6 consumiram as dietas caseína ou aminoácidos durante sete dias. Ao final desse período, as dietas experimentais foram retiradas e substituídas por ração comercial. Dois dias depois, o DSS a 1% foi ofertado durante sete dias. Durante a indução da colite, os animais continuaram a consumir ração comercial. Número de animais por grupo = 4 - 6. Teste estatístico utilizado: teste t de Student. $P < 0,05$.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que dietas contendo aminoácidos livres são nutricionalmente equivalentes às dietas contendo caseína intacta. Porém, seu consumo provoca diversas alterações imunológicas, influenciando a produção de imunoglobulinas séricas, sIgA, níveis de citocinas, perfil de células e morfologia intestinal. Essas alterações são dependentes do tempo de consumo das dietas. Além disso, a ingestão da dieta AA durante e previamente à indução da colite provoca exacerbação da inflamação.

7. Discussão |



7. Discussão

7.1. Efeitos da dieta contendo aminoácidos livres em situações fisiológicas

A ausência de proteínas intactas na dieta provocou alterações imunobiológicas em camundongos adultos em condições fisiológicas. Já havia sido demonstrado, em trabalhos anteriores do nosso grupo, que as dietas contendo aminoácidos livres, em substituição às proteínas inteiras, influenciam a maturação imunológica quando oferecidas aos animais continuamente após o desmame (Menezes *et al.*, 2003). Porém, os efeitos dessas dietas em animais já adultos, que possuem o GALT desenvolvido, não eram, até então, conhecidos. Este trabalho contribui para o esclarecimento dessa questão.

Para avaliar os efeitos das dietas em parâmetros imunológicos, primeiramente é importante conhecer os seus efeitos no estado nutricional. É conhecido que a desnutrição afeta diversos aspectos do sistema imune como a imunidade celular, o sistema do complemento, a função fagocítica, a produção de citocinas e a produção de imunoglobulinas (Chandra, 1997; Marcos *et al.*, 2003). Dessa forma, é importante garantir que as alterações imunológicas observadas não são devido a possíveis alterações no estado nutricional dos animais.

Este trabalho mostrou que as dietas contendo aminoácidos livres são nutricionalmente completas e capazes de manter o crescimento corporal normal dos camundongos em idade adulta. Isso foi demonstrado através da curva de crescimento semelhante entre os grupos experimental e controle. Além disso, exames bioquímicos indicativos do estado nutricional como as medidas de albumina, proteínas séricas totais e transferrina também não indicaram diferenças entre os animais alimentados com as dietas contendo aminoácidos ou com proteínas inteiras, mesmo após consumo prolongado (5 semanas). A albumina é uma proteína plasmática sintetizada no fígado, cuja produção é influenciada, entre outros fatores, pela dieta, disponibilidade de energia, proteínas e micronutrientes. A redução no consumo alimentar e ingestão proteica insuficiente causa redução na síntese hepática dessa proteína (Nicholson *et al.*, 2000). Da mesma forma, concentração reduzida das proteínas séricas totais também é um indicador do estado nutricional (Fuhrman *et al.*, 2004). Porém, essas

proteínas apresentam vida média longa, sendo de 19-20 dias para albumina, o que limita a avaliação de alterações agudas no estado nutricional (Jeejeebhoy, 2000; Acosta Escribano *et al.*, 2005). Dessa forma, também foi avaliada a concentração de transferrina, que tem vida média de 8 a 10 dias e, portanto, pode responder com mais rapidez às mudanças no estado nutricional (Jeejeebhoy, 2000). Mesmo nesse parâmetro mais sensível, não houve diferença entre os grupos alimentados com a dieta caseína ou aminoácido em nenhum momento avaliado.

A dieta contendo aminoácidos livres também não interferiu nas concentrações séricas de glicose, triglicérides e colesterol. A avaliação bioquímica reflete a situação metabólica do organismo e permite avaliar a adaptação diante de alterações nutricionais. Porém, os resultados não demonstraram diferenças nesses parâmetros entre os grupos, o que confirma que a presença de aminoácidos livres na dieta não provocou alterações metabólicas.

A avaliação desses parâmetros é importante para assegurar a equivalência nutricional das dietas experimentais utilizadas. Trabalhos anteriores do nosso grupo que utilizaram dietas contendo aminoácidos livres e caseína intacta também demonstraram que não houve alteração no peso e em parâmetros bioquímicos indicativos de desnutrição (Menezes *et al.*, 2003; Silva, 2010; Gomes-Santos, 2011). Em humanos, também foi observado que a utilização de aminoácidos, em comparação à proteína intacta, não alterou o balanço nitrogenado nem o ganho de peso em adultos saudáveis (Moriarty *et al.*, 1985).

As dietas experimentais utilizadas no nosso estudo são isocalóricas e semelhantes no conteúdo de macro e micronutrientes. Como o consumo alimentar foi semelhante, os efeitos imunológicos observados também não são devido a diferenças na ingestão de outros nutrientes. O consumo alimentar foi aferido como média da ingestão diária por gaiola por animal. Ressalta-se que esse método não é o ideal, pois o consumo entre os dias e entre os animais na gaiola podem apresentar variações. Porém, dada a inviabilidade técnica de avaliação dos animais individualmente em gaiolas metabólicas, o método utilizado foi escolhido por ser o que mais se aproxima do consumo real.

O consumo da dieta com aminoácidos livres provocou diversas alterações imunológicas, entre elas a redução da concentração de IgA e IgG séricos após uma e três semanas de dieta. Essa redução também foi encontrada quando a dieta é ofertada após o desmame (Menezes *et al.*, 2003), sendo esse efeito reversível pela introdução das proteínas dietéticas (Amaral *et al.*, 2006). Isso sugere que proteínas dietéticas entram em contato com a mucosa intestinal e estimulam a proliferação de linfócitos e sua diferenciação em plasmócitos ativados nos órgãos linfóides (Amaral *et al.*, 2006). A retirada do estímulo antigênico da dieta em animais adultos é suficiente para promover a redução do estímulo para produção de imunoglobulinas, embora esse efeito seja menos intenso quando comparado aos animais com o sistema imune imaturo. Além disso, o efeito da redução da estimulação antigênica parece ser mais importante nas primeiras semanas de consumo (uma semana e, em menor grau, três semanas). Após cinco semanas, a presença de aminoácidos dietéticos parece ativar outros mecanismos, possivelmente através do estímulo da proliferação celular. Esse efeito compensaria a ausência do estímulo antigênico derivado da presença de proteínas inteiras, podendo contribuir para a semelhança entre os grupos após cinco semanas de consumo das dietas.

Contrariamente à IgA e IgG séricos, os níveis de IgM foram semelhantes nos períodos iniciais, sendo reduzido no grupo aminoácido somente após cinco semanas de dieta, quando comparado ao grupo caseína. A IgM é considerada um “anticorpo natural”, ocorrendo espontaneamente na ausência de estimulação antigênica em animais *germ-free* e *antigen-free* (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1992; Coutinho *et al.*, 1995), o que explica o comportamento inicial distinto dos isótipos IgA e IgG. Após cinco semanas de dieta, o grupo aminoácido apresentou menores níveis de IgM sérica quando comparado ao grupo caseína. Isso sugere que o consumo de aminoácidos livres pode afetar a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B, a própria geração de linfócitos B2 da medula ou B1 no peritônio. Sabemos que os linfócitos B1 são a principal fonte da IgM natural encontrada na circulação (Kaveri *et al.*, 2012) e um defeito na produção de IgM sérica, ainda que em camundongos adultos, sugere que os linfócitos B1 estejam envolvidos nos efeitos induzidos pela dieta contendo

aminoácidos livres na produção de imunoglobulinas séricas. Esses mecanismos ainda requerem investigação em próximos estudos.

A fonte nitrogenada das dietas não alterou os níveis de sIgA no intestino delgado, porém o consumo de dietas contendo aminoácidos livres resultou em maiores níveis dessa imunoglobulina no cólon após cinco semanas de consumo. Uma hipótese explicativa para esse resultado é o estado pró-inflamatório observado no cólon dos animais, evidenciado pelo maior infiltrado celular, redução de células caliciformes e edema da camada submucosa após o consumo da dieta contendo aminoácidos livres durante cinco semanas. Maiores níveis de sIgA também foram observados nos animais do grupo aminoácido apresentando inflamação intestinal (colite), o que se relaciona à maior gravidade da colite vista nesse grupo. Essa relação entre inflamação intestinal no cólon ou no intestino delgado e aumento da produção de IgA secretória já foi relatada em outros trabalhos anteriores do nosso grupo descrevendo as alterações imunológicas de animais portadores de colite (Gomes-Santos et al, 2012) ou alergia alimentar (Gomes-Santos et al, 2015). No entanto, nesses animais, a inflamação intestinal era mais grave, o que não é o caso dos animais alimentados com a dieta AA que apresentaram um quadro inflamatório intestinal leve. Isto pode explicar porque não houve aumento de produção de IgA secretória no intestino delgado dos animais alimentados com a dieta AA. Esse efeito exclusivo na IgA secretória do cólon pode se dever, na verdade, a alterações na microbiota intestinal provocadas pela dieta AA. Diversos trabalhos demonstraram que a composição da dieta pode afetar tanto a diversidade quanto o número de bactérias intestinais (Conlon e Bird, 2015). A microbiota intestinal, por sua vez, é capaz de modular os níveis sIgA no intestino (Round e Mazmanian, 2009).

Uma das formas pelas quais a dieta pode modular a microbiota é através do fornecimento de substratos para o metabolismo bacteriano. Os produtos finais da fermentação por bactérias colônicas dependem da composição química da digesta que alcança o cólon. A fermentação microbiana de proteínas e aminoácidos não absorvidos resulta na produção de diversos produtos como amônia, fenóis, indóis e ácidos graxos de cadeia ramificada, que podem modular a composição bacteriana (Smith e Macfarlane, 1998; Hughes *et al.*, 2000). Alguns trabalhos sugerem que há diferenças

no metabolismo colônico dependendo da fonte nitrogenada. Bactérias anaeróbias metabolizam melhor o nitrogênio na forma de peptídeos ou amônia quando comparado à forma de aminoácidos livres. Além disso, peptídeos bioativos específicos podem estimular o crescimento de alguns microorganismos, enquanto que aminoácidos não apresentam essas funções (Smith e Macfarlane, 1998). Também já foi demonstrado que a degradação da caseína por bactérias intestinais produz peptídeos, mas não aminoácidos livres. Isso sugere que a taxa de hidrólise é um passo limitante na utilização de proteínas por bactérias e a participação de aminoácidos livres seria menor nesse caso (Macfarlane e Allison, 1986). Assim, a oferta de nitrogênio na forma de aminoácidos ou proteínas pode afetar diretamente a disponibilidade desses nutrientes no cólon e o seu metabolismo pelas bactérias intestinais, o que culminaria em uma diversidade de metabólitos com funções diferenciadas no intestino.

A dieta contendo aminoácidos livres levou à redução da maior parte das citocinas avaliadas no baço, entre elas IL-10, IL-4, IFN- γ , IL-17A e TGF- β , especificamente após uma semana de consumo. Esse efeito não foi observado após três e cinco semanas de dieta. Esse resultado sugere que a ausência de proteínas dietéticas provoca uma redução global na produção de citocinas e isso ocorre de maneira precoce. Com o tempo de consumo prolongado, esse efeito inicial parece ser compensado por outros mecanismos derivados dos efeitos estimulatórios dos aminoácidos livres e os níveis das citocinas se tornam semelhantes entre os grupos.

No intestino delgado, os níveis das citocinas IL-6 e IL-17A foram maiores no grupo aminoácido quando comparado ao grupo caseína após uma semana de dieta. Esse resultado também foi encontrado no cólon, juntamente com maiores níveis de TGF- β e IL-10. Novamente, esses resultados foram observados principalmente após uma semana de consumo das dietas, não se mantendo após cinco semanas de consumo. Isso reforça a hipótese de que a dieta contendo aminoácido provoca alterações iniciais específicas no baço e no intestino que são compensadas por outros mecanismos acionados pelos aminoácidos livre a longo prazo.

A redução das citocinas no baço e aumento no intestino demonstra que os mecanismos regulatórios para produção de citocinas são diferentes nesses locais. O

aumento de citocinas no intestino do grupo aminoácido pode ser resultante da estimulação local das células intestinais diretamente por bactérias comensais. Outra possível explicação tanto para o aumento dos níveis das citocinas locais quanto para os efeitos tardios da dieta AA se refere à ação dos aminoácidos livres nesse local estimulando a proliferação celular e a diferenciação de células produtoras de citocinas. De fato, o grupo alimentado com a dieta contendo aminoácidos livres apresentou um número maior de células totais, células ativadas, linfócitos TH17 e Treg na lâmina própria do intestino, o que reforça essa hipótese.

Linfócitos T CD4⁺ naive podem se diferenciar em células Th17, Th1, Th2 e outras dependendo das citocinas presentes no microambiente. A diferenciação para células Th17 requer a expressão do fator de transcrição ROR γ t. A regulação positiva desse fator ocorre na presença das citocinas TGF- β e IL-6 (Jin e Dong, 2013). Dessa forma, o aumento inicial de IL-6 e TGF- β no grupo aminoácido pode ter contribuído para o aumento no número de células TCD4⁺ ROR γ t⁺ nesse grupo.

O grupo aminoácido apresentou maiores concentrações de IL-17A no intestino após uma semana de dieta. Porém o aumento de células Th17, uma das responsáveis pela produção dessa citocina, só foi observado após cinco semanas de consumo. Outras populações celulares podem produzir IL-17, incluindo células T $\gamma\delta$ (Jin e Dong, 2013). As células T $\gamma\delta$ compreendem 1-5% do total de linfócitos em camundongos e humanos. Essas células estão localizadas nas mucosas, locais que estão constantemente em contato com o ambiente externo (Jin e Dong, 2013). Vários estudos mostraram que as células T $\gamma\delta$ produzem IL-17 rapidamente em resposta às infecções (Hamada *et al.*, 2008; Jin e Dong, 2013). Além dos linfócitos $\gamma\delta$, outras células inatas produtoras de IL-17 residentes do intestino foram identificadas e nomeadas células Th17 inatas (iTH17). A população mais importante desses linfócitos inatos produtores de IL-17 são os linfócitos inatos 3 (ILC 3) que expressam também o fator de transcrição ROR γ t (Geddes *et al.*, 2011). Células como natural killer, macrófagos e células de Paneth também podem produzir IL-17 (Reynolds *et al.*, 2010; Jin e Dong, 2013). Dessa forma, essas populações celulares podem ter contribuído para o aumento precoce na produção de IL-17 no intestino do grupo aminoácido. Porém,

essa hipótese e o papel dos aminoácidos e proteínas dietéticas nesses tipos celulares ainda precisam ser avaliados.

A citocina IL-17 desempenha papel protetor na defesa contra patógenos nas superfícies epiteliais e mucosas. Por outro lado, sua produção exacerbada pode resultar em expressão excessiva de citocinas pró inflamatórias e inflamação crônica, provocando dano tecidual (Jin e Dong, 2013). A IL-17 estimula fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzir mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- α , metaloproteinases e quimiocinas, resultando na amplificação da inflamação (Iwakura e Ishigame, 2006). Por outro lado, ela é capaz de bloquear a atividade da quimiocina RANTES induzida por TNF- α e mediar a formação de zônulas de oclusão entre as células epiteliais via a modulação da expressão de claudina (Wilson *et al.*, 2004; Korn *et al.*, 2007). A IL-17A pode ter contribuído para o estado pró-inflamatório visto no grupo aminoácido após cinco semanas de dieta. O aumento da IL-6 também pode ter contribuído para esse efeito. A IL-6 exerce efeitos pró-inflamatórios através da ativação de NF- κ B, um mediador central da inflamação intestinal (Wang *et al.*, 2003). Porém, de forma similar à IL-17, a citocina IL-6 também pode apresentar efeitos benéficos, atuando em atividades regenerativas e anti-inflamatórias no intestino em diferentes contextos (Jin *et al.*, 2010; Scheller *et al.*, 2011).

Os animais do grupo aminoácido também apresentaram maiores níveis de IL-10 no cólon, quando comparados aos camundongos do grupo caseína. A IL-10 atua na inibição das respostas inflamatórias, bloqueia a secreção de citocinas pró-inflamatórias e regula a proliferação e diferenciação de vários tipos celulares como células T, B, NK, APC, mastócitos e granulócitos (Li e He, 2004). É uma citocina fundamental na homeostase intestinal e camundongos geneticamente deficientes em IL-10 desenvolvem espontaneamente colite às 16 semanas de idade (Kuhn *et al.*, 1993; Gomes-Santos *et al.*, 2012). O aumento de IL-10 pode ter contribuído para reduzir os níveis das demais citocinas após o consumo prolongado da dieta (cinco semanas). Essa citocina é produzida, entre outras células do sistema imune inato e adaptativo, por linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ (Veenbergen and Samson, 2012), que também se encontravam em maior número no grupo que consumiu a dieta contendo aminoácido.

O aumento de células T reguladoras CD4+ Foxp3+ pode ser um importante mecanismo compensatório frente às alterações induzidas pelo consumo da dieta com aminoácidos livres.

Além do aumento no número de células Th17 e células T reguladoras CD4+ Foxp3+, também foi observado no grupo aminoácido um grande aumento no número de células totais, linfócitos TCD4+ e células ativadas CD4+CD44+ na lâmina própria do intestino delgado dos camundongos alimentados com dieta AA. O cólon desses animais não apresentou diferença no número dessas células, o que sugere que, nesse parâmetro, o efeito seja específico e local, uma vez que intestino delgado é o principal local de digestão e absorção dos nutrientes. O aumento expressivo no número de células no intestino delgado sugere que a dieta com aminoácidos livres pode atuar na ativação e proliferação celular, ou ainda na migração de células para o intestino.

É cada vez mais clara a importância fisiológica dos aminoácidos no metabolismo e no sistema imune e como esses nutrientes podem interferir em vários aspectos intestinais e sistêmicos. Já foi descrito que os aminoácidos são capazes de ativar mTOR (*mammalian target of rapamycin*), uma serina/treonina quinase que possui papel central na regulação do crescimento celular e do metabolismo (Li *et al.*, 2011; Chi, 2012). Diferenças na disponibilidade plasmática de aminoácidos livres na dieta AA, em comparação à disponibilidade de aminoácidos livres e peptídeos no grupo alimentado com dieta contendo caseína, poderiam apresentar efeitos estimulatórios compatíveis com aqueles observados nos animais alimentados com a dieta AA pela estimulação de mTOR.

O mTOR compreende o complexo mTOR 1 (mTORC1) e 2 (mTORC2), que possuem sinalização distinta. O mTORC1 regula o crescimento celular através da promoção da translação e biogênese ribossomal, sendo sua ativação dependente de nutrientes e aminoácidos. O mTORC2 responde primariamente a fatores de crescimento e promove a entrada no ciclo celular, sobrevivência, polarização do citoesqueleto e resposta anabólica (Yang *et al.*, 2013).

A sinalização através de mTORC1 contribui para manutenção da homeostase do epitélio intestinal (Nakamura *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2015) e regula várias células do

sistema imune inato e adaptativo (Powell *et al.*, 2012) como células dendríticas (Ohtani *et al.*, 2012), macrófagos (Zhou *et al.*, 2015), neutrófilos (Mcinturff *et al.*, 2012) e células T reguladoras (Zeng *et al.*, 2013), entre outras.

Uma das principais funções do mTORC1 é estimular a síntese proteica global após a ativação imune, com posterior reconfiguração do metabolismo celular. Células com alta atividade glicolítica exibem intensa atividade de mTOR, enquanto baixa atividade está associada com células mais dependentes de outras vias metabólicas energéticas (Keating e Mcgargill, 2016).

A diferenciação de alguns tipos celulares é estimulada pela ativação de mTOR, como por exemplo células NK (Marcais *et al.*, 2014) e iNKT (Zhang *et al.*, 2014). Essas células rapidamente produzem grandes quantidades de citocinas após ativação, incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-17 (Keating e Mcgargill, 2016). O mTOR também está envolvido na diferenciação de células T CD4 em Th1, Th2 e Th17 através da ativação de fatores de transcrição específicos de cada linhagem celular. Inversamente, a sinalização do mTOR bloqueia o desenvolvimento de células T reguladoras CD4+ Foxp3+ (Keating e Mcgargill, 2016).

O papel específico da ativação de mTOR por dietas contendo aminoácidos livres e proteínas intactas ainda precisa ser investigado, assim como a função dessa via na modulação das células imunes durante o consumo das dietas contendo aminoácidos livres.

As alterações no perfil de células, citocinas e sIgA no intestino foram acompanhadas de alterações morfológicas nesse local, principalmente após cinco semanas de dieta. No intestino delgado, o grupo aminoácido apresentou aumento no tamanho do vilão e profundidade da cripta. Diferenças na concentração de citocinas locais podem ter contribuído para esse resultado. Citocinas como a IL-6, cujos níveis estavam aumentados no grupo aminoácido, possui importantes efeitos intestinais, sendo capaz de induzir o aumento da altura dos vilos intestinais (Jin *et al.*, 2010). Alterações intestinais também são induzidas em resposta aos nutrientes dietéticos, sobretudo com vistas à adaptação da área absorvida frente aos nutrientes disponíveis, alterações funcionais em enterócitos e modulação no transportadores de nutrientes (Chinery *et al.*, 1992; Buddington, 1994; Makkink *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 1999).

No cólon, o consumo da dieta contendo aminoácidos livres provocou diversas alterações histopatológicas como aumento do infiltrado celular na camada mucosa, redução de células caliciformes, edema da camada submucosa. Essas alterações sugerem que o consumo prolongado de dietas com aminoácidos livres pode ser deletério, sobretudo para as porções finais do intestino. O aumento do infiltrado celular na camada mucosa pode estar relacionado à maior ativação de mTOR no grupo aminoácido. Alterações precoces na concentração de citocinas intestinais, também podem estar envolvidas no desenvolvimento de alterações histopatológicas após cinco semanas de consumo. Além disto, como discutido anteriormente, a modulação da microbiota pela dieta pode também ter exercido algum efeito sobre as alterações morfológicas na mucosa intestinal.

As alterações morfológicas e a concentração diferencial de citocinas, sIgA e células na lâmina própria do grupo aminoácido indicam que as respostas imunológicas intestinais podem estar alteradas nesse local e afetar a resposta frente à inflamação intestinal.

7.2. Efeitos das dietas contendo aminoácidos livres na colite experimental murina

A retirada das proteínas inteiras da dieta levou ao desenvolvimento de uma forma mais grave de colite experimental induzida por DSS. Os animais que consumiram dieta contendo aminoácidos livres durante a indução da inflamação apresentaram, em todos os tempos experimentais avaliados, maior índice macroscópico de doença e menor comprimento do cólon. A avaliação histológica demonstrou que alterações como infiltrado inflamatório na camada mucosa e submucosa, perda da arquitetura da camada mucosa e espessamento da camada muscular foram mais intensos no grupo aminoácido. Isso se refletiu no maior índice histológico de doença no grupo aminoácido quando comparado ao grupo caseína.

O consumo da dieta com aminoácidos livres também induziu maior perda de peso durante a colite. A perda de peso é relatada frequentemente em pacientes com IBDS (Gassull, 2003; Mijac *et al.*, 2010) e também ocorre nos modelos animais de colite experimental, podendo ser considerada como indicador da gravidade da doença

(Okayasu *et al.*, 1990). A causa da perda de peso é multifatorial e inclui diarreia, má absorção e estresse metabólico (Gassull, 2003; Mijac *et al.*, 2010).

Esses dados demonstram claramente que o consumo de dietas contendo aminoácidos livres durante a indução da inflamação intestinal é deletério. Além disso, o consumo dessa dieta previamente à indução da colite também provoca maior gravidade da inflamação. Isso sugere que os efeitos induzidos pela dieta contendo aminoácidos livres são duradouros e modificam o curso da inflamação mesmo após a interrupção do consumo.

Dietas elementares, que possuem em sua composição apenas aminoácidos livres em substituição às proteínas intactas, são frequentemente utilizados no tratamento nutricional de pacientes com IBDs. O efeito das dietas elementares, semi elementares e poliméricas no tratamento dessas doenças ainda é controverso (Fernandez-Banares *et al.*, 1995; Griffiths *et al.*, 1995; Gassull, 2001). Alguns trabalhos demonstram que dietas elementares são melhores no tratamento da doença de Crohn (DC) ativa quando comparado a dietas poliméricas (Giaffer *et al.*, 1990) e tratamento com corticosteróides (O'morain *et al.*, 1984; Gorard *et al.*, 1993). Outros demonstram que não há diferença entre a fórmula utilizada na eficácia do tratamento da DC ativa (Rigaud *et al.*, 1991; Verma *et al.*, 2000). Há ainda trabalhos que demonstram que as formulações poliméricas são as mais indicadas, pois apresentam os mesmos efeitos na taxa de remissão que dietas elementares, mas promovem maior ganho de peso (Ludvigsson *et al.*, 2004).

Há poucos trabalhos que avaliaram os efeitos de dietas elementares em modelos experimentais de colite. No modelo de colite induzida por transferência de células de animais C57BL/6 deficientes para IL-10 para camundongos da linhagem CB-17 SCID, a dieta elementar preveniu a perda de peso e suprimiu a inflamação intestinal, enquanto que o grupo alimentado com dieta normal apresentou uma forma grave da colite (Kajiura *et al.*, 2009).

As hipóteses explicativas para os efeitos das dietas elementares no tratamento da DC incluem a redução da estimulação antigênica, a redução do conteúdo lipídico da dieta, alterações na permeabilidade intestinal e modulação da microbiota intestinal

(Giaffer *et al.*, 1990; Ferguson *et al.*, 1998; Kajiura *et al.*, 2009). O uso da dieta AIN93 contendo aminoácidos livres utilizada neste trabalho foi importante para avaliar o papel exclusivo da redução da carga antigênica de proteínas na dieta, uma vez que esta contém carboidratos e lipídeos complexos em sua composição, não sendo considerada, portanto, uma formulação elementar. Em nosso trabalho, foi demonstrado que a retirada das proteínas intactas da dieta contribuiu para a piora da inflamação intestinal, ou seja, a redução da estimulação antigênica aparentemente não foi benéfica ou, alternativamente, outras características da dieta contendo aminoácidos livres produziram efeitos adversos nos animais com colite.

Vários fatores podem explicar esses resultados divergentes da literatura. Primeiramente, a maioria dos trabalhos foi realizada em humanos, com inclusão de pacientes com inflamação recorrente e de diversas faixas etárias. Os efeitos das dietas elementares podem apresentar diferentes efeitos em lesões primárias ou inflamações recorrentes, assim como distintos resultados em crianças, adultos ou idosos. Além disso, a grande diversidade nos critérios utilizados para avaliação da atividade da doença, variações na duração da terapia dietética, diferentes vias de administração da dieta e variações nas fórmulas utilizadas nos estudos dificultam a avaliação do papel da terapia nutricional nas IBDs (Beattie *et al.*, 1998). Outro ponto importante é que o uso de medicamentos paralelamente ao tratamento dietético pode influenciar diretamente os resultados observados. No estudo de O'morain *et al.* (1984), por exemplo, que demonstrou que o tratamento com dietas elementares é mais efetivo que corticosteróides, os pacientes receberam antibióticos durante o tratamento dietético. O mesmo ocorreu no estudo de Giaffer *et al.* (1990), que avaliou a eficácia de formulações dietéticas e sugeriu que dietas elementares são mais efetivas.

Outro ponto importante é que as dietas podem apresentar efeitos diferentes de acordo com o tipo e localização da lesão, o que pode explicar em parte os resultados divergentes. Segundo Beattie *et al.* (1998), a terapia nutricional é menos efetiva quando a lesão é localizada no colón quando comparada às lesões do intestino delgado. A maioria dos trabalhos avaliou a DC ativa, sendo que não há indícios na literatura dos benefícios das dietas elementares na colite ulcerativa (UC) (Rajendran e Kumar, 2010). Além disso, em trabalhos que compararam a efetividade do tratamento

com dietas elementares ou com medicamentos, a via de alimentação (oral ou enteral) foi diferente entre os grupos. Dessa forma, a administração via enteral de dieta elementar pode ter atuado pelo aumento da ingestão dietética e pelo fornecimento de nutrientes em quantidades adequadas, o que pode não ser proporcionado pela ingestão de dietas através da via oral devido à anorexia e à redução do consumo de alimentos provocada pela dor (Ferguson, Shelling, *et al.*, 2007). Rigaud e colaboradores (1991) também sugeriram que a melhora do estado nutricional pela terapia nutricional enteral pode ser um fator mais importante para a remissão clínica do que o descanso intestinal ou hipoalergenicidade da dieta.

Todos os trabalhos citados avaliaram a eficácia de dietas elementares no tratamento da inflamação intestinal. Como discutido anteriormente, a dieta AIN93 com aminoácidos livres utilizada neste estudo não pode ser considerada elementar e apresenta diferenças na composição e consistência em relação aos estudos citados. O conteúdo de lipídios, por exemplo, da dieta AA apresenta diferenças importantes com as dietas elementares utilizadas na clínica. Bamba e colaboradores (2003) demonstraram que a presença de triglicerídeos de cadeia longa (TCL) na dieta elementar compromete seus efeitos na indução da remissão da doença de Crohn. Esses resultados também foram encontrados por Middleton e colaboradores (1995). Os ácidos graxos poli-insaturados n-6 são precursores de ácido araquidônico, um dos substratos para eicosanoides inflamatórios. Assim, o baixo conteúdo lipídico de dietas elementares poderia contribuir para a eficácia dessas dietas no tratamento da inflamação intestinal (Bamba *et al.*, 2003; Gorard, 2003). O conteúdo de lipídeos das dietas elementares é variável entre os estudos mencionados, sendo entre 10% e 2,5%. As dietas experimentais utilizadas neste estudo contêm 16,7% do valor calórico total fornecido por lipídeos, cuja fonte é o óleo de soja. A diferença do conteúdo lipídico entre as dietas experimentais utilizadas neste trabalho e as dietas elementares utilizadas nos trabalhos citados também pode ter contribuído para as diferenças nos resultados encontrados.

Este trabalho demonstrou que a presença de aminoácidos livres provocou exacerbação da inflamação intestinal se consumida durante ou previamente à inflamação. Isso reforça a importância de realização de estudos clínicos que avaliem os

efeitos das diversas formulações enterais elementares, semi elementares e poliméricas em parâmetros imunológicos em pacientes com IBDs.

8. Conclusões |



8. Conclusões

O consumo de dietas contendo aminoácidos livres em substituição às proteínas intactas não altera o estado nutricional, porém provoca diversas alterações imunológicas intestinais e sistêmicas em animais adultos, previamente alimentados com dietas normais.

As alterações induzidas pelas dietas são específicas de acordo com o tempo de consumo. Alterações precoces estão relacionadas principalmente à produção de imunoglobulinas séricas e citocinas no baço e intestino. Já a ingestão por tempo prolongado provoca alterações morfológicas intestinais indicativas de maior estado pró-inflamatório, além do aumento de células na lâmina própria. Essas alterações observadas em tempos diferentes da introdução da dieta contendo aminoácidos livres são induzidas, provavelmente, por mecanismos de ação distintos.

A dieta contendo aminoácidos livres provoca alterações que contribuem para exacerbação da inflamação intestinal quando consumida previamente ou durante a indução da colite. Dessa forma, dietas contendo aminoácidos livres devem ser utilizadas com cautela na prática clínica.

9. Perspectivas |



9. Perspectivas

I. Avaliação da ativação de mTOR

Diante dos resultados encontrados que sugerem a participação do mTOR nos efeitos das dietas contendo aminoácidos livres, pretendemos avaliar a ativação de mTOR nas diferentes porções do intestino delgado e cólon. Essa avaliação será feita após 1, 3 e 5 semanas de consumo das dietas para verificar se este é um mecanismo de ação tardio ou precoce. Experimentos preliminares já realizados indicam que a dieta AA ativa mTOR nas células da mucosa intestinal (dados não mostrados).

II. Avaliação dos efeitos da ativação de mTOR na gravidade da inflamação intestinal

Além disso, será avaliado se a maior ativação de mTOR pela dieta AA é responsável pela maior gravidade da inflamação intestinal. Para isso, camundongos C57BL/6 adultos serão alimentados com a dieta caseína ou aminoácidos durante um determinado período. Esse período corresponderá ao tempo de consumo em que a dieta AA promove maior ativação de mTOR. Durante o consumo das dietas experimentais, os animais receberão, via intraperitoneal, doses diárias de rapamicina na concentração de 4mg/kg/dia. Ao final desse período, será assegurado que os grupos caseína e aminoácidos possuam o mesmo nível de ativação de mTOR no intestino. Em seguida, as dietas experimentais serão substituídas por ração comercial e os animais serão submetidos à indução da colite através do consumo de DSS 1% durante sete dias. O protocolo experimental será realizado conforme figura 22.

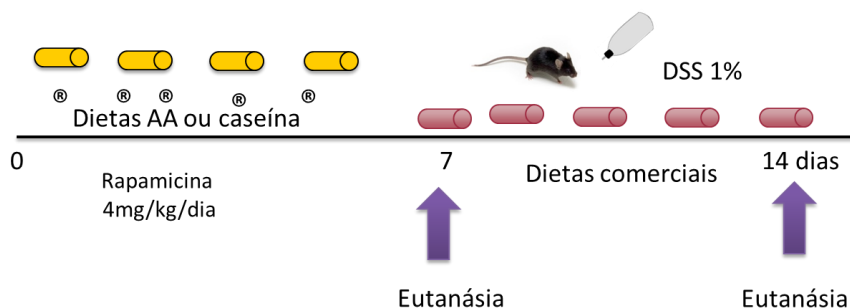


Figura 22. Protocolo experimental 4

III. Avaliação dos efeitos de dietas elementares, semi-elementares e poliméricas na inflamação intestinal

Além da dieta AIN93 utilizada nesse trabalho, que é específica para camundongos, também serão avaliadas os efeitos de formulações enterais comerciais na inflamação intestinal. O objetivo é avaliar o efeito de formulações completas utilizadas normalmente na prática clínica, que além de diferenças na forma de apresentação da fonte nitrogenada em aminoácidos (elementar), peptídeos (semi elementar) ou proteínas intactas (poliméricas), possui outras variações na composição nutricional. Dessa forma, será possível avaliar os efeitos da forma de apresentação da fonte nitrogenada, não isolados como na dieta AIN93, mas combinados em formulações completas que são normalmente utilizadas na prática clínica.

10. Referências

bibliográficas |



10. Referências bibliográficas

ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 361, n. 21, p. 2066-78, Nov 19 2009.

ACOSTA ESCRIBANO, J.; GOMEZ-TELLO, V.; RUIZ SANTANA, S. [Nutritional assessment of the severely ill patient]. **Nutr Hosp**, v. 20 Suppl 2, p. 5-8, Jun 2005.

ADIBI, S. A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 285, n. 5, p. G779-88, Nov 2003.

AMARAL, J. F.; FOSCHETTI, D. A.; ASSIS, F. A.; MENEZES, J. S.; VAZ, N. M.; FARIA, A. M. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 12, p. 1581-6, Dec 2006.

AMARAL, J. F.; GOMES-SANTOS, A. C.; PAULA-SILVA, J.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q.; FARIA, A. M.; MENEZES, J. S. Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice. **Immunology**, v. 129, n. 3, p. 455-64, Mar 2010.

AXELSSON, L. G.; LANDSTROM, E.; BYLUND-FELLENIUS, A. C. Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, n. 9, p. 925-34, Sep 1998.

BAMBA, T.; SHIMOYAMA, T.; SASAKI, M.; TSUJIKAWA, T.; FUKUDA, Y.; KOGANEI, K., . . . NAKAJIMA, M. Dietary fat attenuates the benefits of an elemental diet in active Crohn's disease: a randomized, controlled trial. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 2, p. 151-7, Feb 2003.

BEATTIE, R. M.; BENTSEN, B. S.; MACDONALD, T. T. Childhood Crohn's disease and the efficacy of enteral diets. **Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 345-50, Apr 1998.

BELL, R. G.; HAZELL, L. A. Influence of dietary protein restriction on immune competence. I. Effect on the capacity of cells from various lymphoid organs to induce graft-vs.-host reactions. **J Exp Med**, v. 141, n. 1, p. 127-37, Jan 1 1975.

BELL, R. G.; HAZELL, L. A.; PRICE, P. Influence of dietary protein restriction on immune competence. II. Effect on lymphoid tissue. **Clin Exp Immunol**, v. 26, n. 2, p. 314-26, Nov 1976.

BHASKARAM, P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: an overview. **Nutr Rev**, v. 60, n. 5 Pt 2, p. S40-5, May 2002.

BORRELLI, O.; CORDISCHI, L.; CIRULLI, M.; PAGANELLI, M.; LABALESTRA, V.; UCCINI, S., . . . CUCCHIARA, S. Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active

pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 6, p. 744-53, Jun 2006.

BOS, N. A.; MEEUWSEN, C. G.; WOSTMANN, B. S.; PLEASANTS, J. R.; BENNER, R. The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. **Cell Immunol**, v. 112, n. 2, p. 371-80, Apr 1 1988.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 7, p. 521-33, Jul 2003.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 6, p. 505-15, Dec 2009.

_____. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 6, p. 554-63, Nov 2010.

BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 249-86, Jan 2008.

BUDDINGTON, R. K. Nutrition and ontogenetic development of the intestine. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 72, n. 3, p. 251-9, Mar 1994.

CANTORNA, M. T.; ZHU, Y.; FROICU, M.; WITTKE, A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6 Suppl, p. 1717S-20S, Dec 2004.

CAZAC, B. B.; ROES, J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 443-51, Oct 2000.

CEBRA, J. J.; KAMAT, R.; GEARHART, P.; ROBERTSON, S. M.; TSENG, J. The secretory IgA system of the gut. **Ciba Found Symp**, n. 46, p. 5-28, Apr 26-28 1977.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 2, p. 460S-463S, Aug 1997.

CHAPMAN-KIDDELL, C. A.; DAVIES, P. S.; GILLEN, L.; RADFORD-SMITH, G. L. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, n. 1, p. 137-51, Jan 2010.

CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 7, p. 445-56, Jul 2011.

CHEROUTRE, H.; MADAKAMUTIL, L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 4, p. 290-300, 2004.

- CHI, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 325-38, 2012.
- CHINERY, R.; GOODLAD, R. A.; WRIGHT, N. A. Soy polysaccharide in an enteral diet: Effects on rat intestinal cell proliferation, morphology and metabolic function. **Clin Nutr**, v. 11, n. 5, p. 277-83, Oct 1992.
- CONLON, M. A.; BIRD, A. R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 17-44, Jan 2015.
- CORR, S. C.; GAHAN, C. C.; HILL, C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 2-12, Jan 2008.
- COUTINHO, A.; KAZATCHKINE, M. D.; AVRAMEAS, S. Natural autoantibodies. **Curr Opin Immunol**, v. 7, n. 6, p. 812-8, Dec 1995.
- CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, n. 6, p. 1119-28; quiz 1129, Jun 2005.
- DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENAS, C.; GACHON, P.; FAUQUANT, J.; CALLIER, P., . . . BEAUFRERE, B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 2, p. E340-8, Feb 2001.
- DEL RIO, M. L.; BERNHARDT, G.; RODRIGUEZ-BARBOSA, J. I.; FORSTER, R. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. **Immunol Rev**, v. 234, n. 1, p. 268-81, Mar 2010.
- FARACHE, J.; KOREN, I.; MILO, I.; GUREVICH, I.; KIM, K. W.; ZIGMOND, E., . . . SHAKHAR, G. Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 581-95, Mar 21 2013.
- FARIA, A. M.; GOMES-SANTOS, A. C.; GONCALVES, J. L.; MOREIRA, T. G.; MEDEIROS, S. R.; DOURADO, L. P.; CARA, D. C. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Front Immunol**, v. 4, p. 102, 2013.
- FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 206, p. 232-59, Aug 2005.
- FERGUSON, A.; GLEN, M.; GHOSH, S. Crohn's disease: nutrition and nutritional therapy. **Baillieres Clin Gastroenterol**, v. 12, n. 1, p. 93-114, Mar 1998.
- FERGUSON, L. R.; PETERMAN, I.; HUBNER, C.; PHILPOTT, M.; SHELLIN, A. N. Uncoupling gene-diet interactions in inflammatory bowel disease (IBD). **Genes Nutr**, v. 2, n. 1, p. 71-3, Oct 2007.

FERGUSON, L. R.; SHELLING, A. N.; BROWNING, B. L.; HUEBNER, C.; PETERMANN, I. Genes, diet and inflammatory bowel disease. **Mutat Res**, v. 622, n. 1-2, p. 70-83, Sep 1 2007.

FERNANDEZ-BANARES, F.; CABRE, E.; ESTEVE-COMAS, M.; GASSULL, M. A. How effective is enteral nutrition in inducing clinical remission in active Crohn's disease? A meta-analysis of the randomized clinical trials. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 19, n. 5, p. 356-64, Sep-Oct 1995.

FRAKER, P. J.; KING, L. E.; LAAKKO, T.; VOLLMER, T. L. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1399S-406S, May 2000.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. [Mechanisms of absorption of amino acids and oligopeptides. Control and implications in human diet therapy]. **Arq Gastroenterol**, v. 36, n. 4, p. 227-37, Oct-Dec 1999.

FRISWELL, M.; CAMPBELL, B.; RHODES, J. The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Gut Liver**, v. 4, n. 3, p. 295-306, Sep 2010.

FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C. M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **J Am Diet Assoc**, v. 104, n. 8, p. 1258-64, Aug 2004.

GASSULL, M. A. New insights in nutritional therapy in inflammatory bowel disease. **Clinical Nutrition**, v. 20, Supplement 1, n. 0, p. 113-121, 2001.

_____. Nutrition and inflammatory bowel disease: its relation to pathophysiology, outcome and therapy. **Dig Dis**, v. 21, n. 3, p. 220-7, 2003.

GEDDES, K.; RUBINO, S. J.; MAGALHAES, J. G.; STREUTKER, C.; LE BOURHIS, L.; CHO, J. H., . . . GIRARDIN, S. E. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. **Nat Med**, v. 17, n. 7, p. 837-44, Jul 2011.

GEISS-FRIEDLANDER, R.; PARMENTIER, N.; MOLLER, U.; URLAUB, H.; VAN DEN EYNDE, B. J.; MELCHIOR, F. The cytoplasmic peptidase DPP9 is rate-limiting for degradation of proline-containing peptides. **J Biol Chem**, v. 284, n. 40, p. 27211-9, Oct 2 2009.

GIAFFER, M. H.; NORTH, G.; HOLDSWORTH, C. D. Controlled trial of polymeric versus elemental diet in treatment of active Crohn's disease. **Lancet**, v. 335, n. 8693, p. 816-9, Apr 7 1990.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB, K. E., JR. Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. **J Anim Sci**, v. 86, n. 9, p. 2135-55, Sep 2008.

GOMES-SANTOS, A. C. **Estratégias alternativas de imuno- modulação nas doenças inflamatórias intestinais**. 2011. 144 Doutorado (Doutorado). Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

GOMES-SANTOS, A. C.; MOREIRA, T. G.; CASTRO-JUNIOR, A. B.; HORTA, B. C.; LEMOS, L.; CRUZ, D. N., . . . FARIA, A. M. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 560817, 2012.

GORARD, D. A. Enteral nutrition in Crohn's disease: fat in the formula. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 2, p. 115-8, Feb 2003.

GORARD, D. A.; HUNT, J. B.; PAYNE-JAMES, J. J.; PALMER, K. R.; REES, R. G.; CLARK, M. L., . . . SILK, D. B. Initial response and subsequent course of Crohn's disease treated with elemental diet or prednisolone. **Gut**, v. 34, n. 9, p. 1198-202, Sep 1993.

GRIFFITHS, A. M.; OHLSSON, A.; SHERMAN, P. M.; SUTHERLAND, L. R. Meta-analysis of enteral nutrition as a primary treatment of active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. 1056-67, Apr 1995.

GRIMBLE, G. K. The significance of peptides in clinical nutrition. **Annu Rev Nutr**, v. 14, p. 419-47, 1994.

HAMADA, H.; HIROI, T.; NISHIYAMA, Y.; TAKAHASHI, H.; MASUNAGA, Y.; HACHIMURA, S., . . . ISHIKAWA, H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. **J Immunol**, v. 168, n. 1, p. 57-64, Jan 1 2002.

HAMADA, S.; UMEMURA, M.; SHIONO, T.; TANAKA, K.; YAHAGI, A.; BEGUM, M. D., . . . MATSUZAKI, G. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. **J Immunol**, v. 181, n. 5, p. 3456-63, Sep 1 2008.

HASHIMOTO, K.; HANDA, H.; UMEHARA, K.; SASAKI, S. Germfree mice reared on an "antigen-free" diet. **Lab Anim Sci**, v. 28, n. 1, p. 38-45, Feb 1978.

HEDRICH, C. M.; BREAM, J. H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunol Res**, v. 47, n. 1-3, p. 185-206, Jul 2010.

HOFMANN, S. R.; ROSEN-WOLFF, A.; TSOKOS, G. C.; HEDRICH, C. M. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. **Clin Immunol**, v. 143, n. 2, p. 116-27, May 2012.

HOOIJKAAS, H.; BENNER, R.; PLEASANTS, J. R.; WOSTMANN, B. S. Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. **Eur J Immunol**, v. 14, n. 12, p. 1127-30, Dec 1984.

- HUBER, S.; GAGLIANI, N.; FLAVELL, R. A. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 9, p. 2238-45, Sep 2012.
- HUGHES, R.; MAGEE, E. A.; BINGHAM, S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. **Curr Issues Intest Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 51-8, Sep 2000.
- IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **J Clin Invest**, v. 116, n. 5, p. 1218-22, May 2006.
- IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 313-38, 2009.
- JEEJEEBHOY, K. N. Nutritional assessment. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 585-90, Jul-Aug 2000.
- JIN, W.; DONG, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerg Microbes Infect**, v. 2, n. 9, p. e60, Sep 2013.
- JIN, X.; ZIMMERS, T. A.; ZHANG, Z.; PIERCE, R. H.; KONIARIS, L. G. Interleukin-6 is an important in vivo inhibitor of intestinal epithelial cell death in mice. **Gut**, v. 59, n. 2, p. 186-96, Feb 2010.
- JONULEIT, H.; SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6323-7, Dec 15 2003.
- KAJIURA, T.; TAKEDA, T.; SAKATA, S.; SAKAMOTO, M.; HASHIMOTO, M.; SUZUKI, H., . . . BENNO, Y. Change of intestinal microbiota with elemental diet and its impact on therapeutic effects in a murine model of chronic colitis. **Dig Dis Sci**, v. 54, n. 9, p. 1892-900, Sep 2009.
- KANG, O. H.; KIM, D. K.; CHOI, Y. A.; PARK, H. J.; TAE, J.; KANG, C. S., . . . LEE, Y. M. Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. **Int J Mol Med**, v. 18, n. 5, p. 893-9, Nov 2006.
- KAVERI, S.V.; SILVERMAN, G.J.; BAYRY J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. **J Immunol**. 2012 Feb 1;188(3):939-45.
- KEATING, R.; MCGARGILL, M. A. mTOR Regulation of Lymphoid Cells in Immunity to Pathogens. **Front Immunol**, v. 7, p. 180, 2016.
- KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 307-17, Jun 16 2011.
- KIM, K. S.; HONG, S. W.; HAN, D.; YI, J.; JUNG, J.; YANG, B. G., . . . SURH, C. D. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. **Science**, v. 351, n. 6275, p. 858-63, Feb 19 2016.

- KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 12, n. 5, p. 319-30, Oct 2010.
- KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.; BETTELLI, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. **Semin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 362-71, Dec 2007.
- KOSTER, F.; GAFFAR, A.; JACKSON, T. M. Recovery of cellular immune competence during treatment of protein-calorie malnutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 34, n. 5, p. 887-91, May 1981.
- KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-74, Oct 22 1993.
- LEV, R.; SPICER, S. S. Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at Low Ph. **J Histochem Cytochem**, v. 12, p. 309, Apr 1964.
- LI, F.; YIN, Y.; TAN, B.; KONG, X.; WU, G. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1185-93, Nov 2011.
- LI, M. C.; HE, S. H. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 5, p. 620-5, Mar 1 2004.
- LI, M. O.; WAN, Y. Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A. K.; FLAVELL, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 99-146, 2006.
- LOCHS, H.; ALLISON, S. P.; MEIER, R.; PIRLICH, M.; KONDRUP, J.; SCHNEIDER, S., . . . PICHARD, C. Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, definitions and general topics. **Clin Nutr**, v. 25, n. 2, p. 180-6, Apr 2006.
- LUDVIGSSON, J. F.; KRANTZ, M.; BODIN, L.; STENHAMMAR, L.; LINDQUIST, B. Elemental versus polymeric enteral nutrition in paediatric Crohn's disease: a multicentre randomized controlled trial. **Acta Paediatr**, v. 93, n. 3, p. 327-35, Mar 2004.
- LYNCH, C. J. Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies. **J Nutr**, v. 131, n. 3, p. 861S-865S, Mar 2001.
- MACFARLANE, G. T.; ALLISON, C. Utilisation of protein by human gut bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 38, n. 1, p. 19-24, 1986.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 6, p. 478-85, Jun 2004.
- MAKKINK, C. A.; NEGULESCU, G. P.; QIN, G.; VERSTEGEN, M. W. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. **Br J Nutr**, v. 72, n. 3, p. 353-68, Sep 1994.

MARCAIS, A.; CHERFILS-VICINI, J.; VIANT, C.; DEGOUVE, S.; VIEL, S.; FENIS, A., . . .
WALZER, T. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling
during the development and activation of NK cells. **Nat Immunol**, v. 15, n. 8, p. 749-57,
Aug 2014.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned
by nutrition. **Eur J Clin Nutr**, v. 57 Suppl 1, p. S66-9, Sep 2003.

MARTINI, F. H.; TIMMONS, M. J.; TALLITSCH, R. B. **Anatomia Humana**. Porto Alegre:
2009. ISBN ISBN 978-85-363-2029-8.

MAZZINI, E.; MASSIMILIANO, L.; PENNA, G.; RESCIGNO, M. Oral tolerance can be
established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to
CD103(+) dendritic cells. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 248-61, Feb 20 2014.

MCCAFFERTY, D. M.; SIHOTA, E.; MUSCARA, M.; WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A.; KUBES,
P. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. **Am J
Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 1, p. G90-9, Jul 2000.

MCDOLE, J. R.; WHEELER, L. W.; MCDONALD, K. G.; WANG, B.; KONJUFCA, V.; KNOOP,
K. A., . . . MILLER, M. J. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in
the small intestine. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 345-9, Mar 15 2012.

MCINTURFF, A. M.; CODY, M. J.; ELLIOTT, E. A.; GLENN, J. W.; ROWLEY, J. W.;
RONDINA, M. T.; YOST, C. C. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil
extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha. **Blood**, v.
120, n. 15, p. 3118-25, Oct 11 2012.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate
sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation
between symptoms and inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288,
n. 6, p. G1328-38, Jun 2005.

MENEZES, J. S.; ANDRADE, M. C.; SENRA, B.; RODRIGUES, V. S.; VAZ, N. M.; FARIA, A.
M. Immunological activities are modulated by enteral administration of an elemental
diet in mice. **Clin Nutr**, v. 25, n. 4, p. 643-52, Aug 2006.

MENEZES, J. S.; MUCIDA, D. S.; CARA, D. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; RUSSO, M.; VAZ, N.
M.; DE FARIA, A. M. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation
of the immune system. **Int Immunol**, v. 15, n. 3, p. 447-55, Mar 2003.

MIDDLETON, S. J.; RUCKER, J. T.; KIRBY, G. A.; RIORDAN, A. M.; HUNTER, J. O. Long-
chain triglycerides reduce the efficacy of enteral feeds in patients with active Crohn's
disease. **Clin Nutr**, v. 14, n. 4, p. 229-36, Aug 1995.

MIJAC, D. D.; JANKOVIC, G. L.; JORGA, J.; KRSTIC, M. N. Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment. **Eur J Intern Med**, v. 21, n. 4, p. 315-9, Aug 2010.

MILLER, H.; ZHANG, J.; KUOLEE, R.; PATEL, G. B.; CHEN, W. Intestinal M cells: the fallible sentinels? **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 10, p. 1477-86, Mar 14 2007.

MIZOGUCHI, A. Animal models of inflammatory bowel disease. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 105, p. 263-320, 2012.

MORIARTY, K. J.; HEGARTY, J. E.; FAIRCLOUGH, P. D.; KELLY, M. J.; CLARK, M. L.; DAWSON, A. M. Relative nutritional value of whole protein, hydrolysed protein and free amino acids in man. **Gut**, v. 26, n. 7, p. 694-9, Jul 1985.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 331-41, Apr 2003.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 10, p. 667-85, Oct 2014.

MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256-60, Jul 13 2007.

MUCIDA, D. S.; RODRIGUEZ, D.; KELLER, A. C.; GOMES, E.; MENEZES, J. S.; DE FARIA, A. M.; RUSSO, M. Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1029, p. 361-5, Dec 2004.

MURTHY, A. K.; DUBOSE, C. N.; BANAS, J. A.; COALSON, J. J.; ARULANANDAM, B. P. Contribution of polymeric immunoglobulin receptor to regulation of intestinal inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 9, p. 1372-80, Sep 2006.

NAKAMURA, A.; HARA, K.; YAMAMOTO, K.; YASUDA, H.; MORIYAMA, H.; HIRAI, M., . . . YOKONO, K. Role of the mTOR complex 1 pathway in the in vivo maintenance of the intestinal mucosa by oral intake of amino acids. **Geriatr Gerontol Int**, v. 12, n. 1, p. 131-9, Jan 2012.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; FUSS, I.; PEDERSEN, A.; HARADA, N.; NAWATA, H.; STROBER, W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. **J Immunol**, v. 172, n. 2, p. 834-42, Jan 15 2004.

NICHOLSON, J. P.; WOLMARANS, M. R.; PARK, G. R. The role of albumin in critical illness. **Br J Anaesth**, v. 85, n. 4, p. 599-610, Oct 2000.

NICKLIN, P.; BERGMAN, P.; ZHANG, B.; TRIANTAFELLOW, E.; WANG, H.; NYFELER, B., . . .
. MURPHY, L. O. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 521-34, Feb 6 2009.

O'MORAIN, C.; SEGAL, A. W.; LEVI, A. J. Elemental diet as primary treatment of acute Crohn's disease: a controlled trial. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 288, n. 6434, p. 1859-62, Jun 23 1984.

OCHI, T.; FENG, Y.; KITAMOTO, S.; NAGAO-KITAMOTO, H.; KUFFA, P.; ATARASHI, K., . . .
KAMADA, N. Diet-dependent, microbiota-independent regulation of IL-10-producing lamina propria macrophages in the small intestine. **Sci Rep**, v. 6, p. 27634, 2016.

ODA, H. Functions of sulfur-containing amino acids in lipid metabolism. **J Nutr**, v. 136, n. 6 Suppl, p. 1666S-1669S, Jun 2006.

OHTANI, M.; HOSHII, T.; FUJII, H.; KOYASU, S.; HIRAO, A.; MATSUDA, S. Cutting edge: mTORC1 in intestinal CD11c+ CD11b+ dendritic cells regulates intestinal homeostasis by promoting IL-10 production. **J Immunol**, v. 188, n. 10, p. 4736-40, May 15 2012.

OIDA, T.; WEINER, H. L. TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15523, 2010.

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. 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.

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunol**, Feb 8 2012.

PAUL, G.; KHARE, V.; GASCHÉ, C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. **Eur J Clin Invest**, v. 42, n. 1, p. 95-109, Jan 2012.

PAULA-SILVA, J.; SANTIAGO, A. F.; OLIVEIRA, R. P.; ROSA, M. L.; CARVALHO, C. R.; AMARAL, J. F.; FARIA, A. M. Effect of a protein-free diet in the development of food allergy and oral tolerance in BALB/c mice. **Br J Nutr**, v. 113, n. 6, p. 935-43, Mar 28 2015.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 718617, 2012.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141-53, Mar 2014.

POWELL, J. D.; POLLIZZI, K. N.; HEIKAMP, E. B.; HORTON, M. R. Regulation of immune responses by mTOR. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 39-68, 2012.

- PRAKASH, S.; RODES, L.; COUSSA-CHARLEY, M.; TOMARO-DUCHESNEAU, C. **Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics.** *Biologics*, 5: 71-86 p. 2011.
- PYZIK, M.; PICCIRILLO, C. A. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. *J Leukoc Biol*, v. 82, n. 2, p. 335-46, Aug 2007.
- RAJENDRAN, N.; KUMAR, D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, v. 16, n. 12, p. 1442-8, Mar 28 2010.
- RAMMENSEE, H. G. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol*, v. 7, n. 1, p. 85-96, Feb 1995.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.
- RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R., . . . RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, v. 2, n. 4, p. 361-7, Apr 2001.
- REYNOLDS, J. M.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 21, n. 6, p. 413-23, Dec 2010.
- RIGAUD, D.; COSNES, J.; LE QUINTREC, Y.; RENE, E.; GENDRE, J. P.; MIGNON, M. Controlled trial comparing two types of enteral nutrition in treatment of active Crohn's disease: elemental versus polymeric diet. *Gut*, v. 32, n. 12, p. 1492-7, Dec 1991.
- RIMOLDI, M.; RESCIGNO, M. Uptake and presentation of orally administered antigens. *Vaccine*, v. 23, n. 15, p. 1793-6, Mar 7 2005.
- ROBINSON, M. K.; ZIEGLER, T. R.; WILMORE, D. W. Overview of intestinal adaptation and its stimulation. *Eur J Pediatr Surg*, v. 9, n. 4, p. 200-6, Aug 1999.
- ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*, v. 9, n. 5, p. 313-23, May 2009.
- _____. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 27, p. 12204-9, Jul 6 2010.
- SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, v. 1813, n. 5, p. 878-88, May 2011.

SHIGA, H.; KAJIURA, T.; SHINOZAKI, J.; TAKAGI, S.; KINOUCI, Y.; TAKAHASHI, S., . . . SHIMOSEGAWA, T. Changes of faecal microbiota in patients with Crohn's disease treated with an elemental diet and total parenteral nutrition. **Dig Liver Dis**, May 22 2012.

SILVA, J. P. **Efeito das proteínas da dieta no desenvolvimento de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos BALB/c**. 2010. 101 (Mestrado). Bioquímica e Imunologia - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

SMITH, D. W.; NAGLER-ANDERSON, C. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 3851-7, Apr 1 2005.

SMITH, E. A.; MACFARLANE, G. T. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 25, n. 4, p. 355-368, 1998.

SNYDERMAN, S. E.; HOLT, L. E., JR.; NORTN, P. M.; ROITMAN, E.; PHANSALKAR, S. V. The plasma aminogram. I. Influence of the level of protein intake and a comparison of whole protein and amino acid diets. **Pediatr Res**, v. 2, n. 2, p. 131-44, Mar 1968.

STROBEL, S.; MOWAT, A. M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunol Today**, v. 19, n. 4, p. 173-81, Apr 1998.

STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 514-21, Mar 2007.

STRUGNELL, R. A.; WIJBURG, O. L. The role of secretory antibodies in infection immunity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 656-67, Sep 2010.

SUGIYAMA, K.; MIZUNO, M.; MURAMATSU, K. Effect of individual amino acids on plasma cholesterol level in rats fed a high cholesterol diet. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 32, n. 6, p. 623-33, Dec 1986.

SUTHERLAND, D. B.; FAGARASAN, S. IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. **Curr Opin Immunol**, Apr 13 2012.

TANOUE, T.; ATARASHI, K.; HONDA, K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 5, p. 295-309, May 2016.

TAYLOR, A. W. Review of the activation of TGF-beta in immunity. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 1, p. 29-33, Jan 2009.

TERADA, T.; SAWADA, K.; SAITO, H.; HASHIMOTO, Y.; INUI, K. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. **Am J Physiol**, v. 276, n. 6 Pt 1, p. G1435-41, Jun 1999.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; MANDEL, L.; STEPANKOVA, R.; BARTOVA, J.; BAROT, R.; LECLERC, M., . . . TREBICHAVSKY, I. Autoimmunity: from physiology to pathology. Natural antibodies, mucosal immunity and development of B cell repertoire. **Folia Biol (Praha)**, v. 38, n. 3-4, p. 202-15, 1992.

UHLIG, H. H.; POWRIE, F. Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 8, p. 2021-6, Aug 2009.

VAZ, N. M.; MAIA, L. C.; HANSON, D. G.; LYNCH, J. M. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **J Allergy Clin Immunol**, v. 60, n. 2, p. 110-5, Aug 1977.

VERMA, S.; BROWN, S.; KIRKWOOD, B.; GIAFFER, M. H. Polymeric versus elemental diet as primary treatment in active Crohn's disease: a randomized, double-blind trial. **Am J Gastroenterol**, v. 95, n. 3, p. 735-9, Mar 2000.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 20-5, Jan-Mar 2009.

WANG, L.; WALIA, B.; EVANS, J.; GEWIRTZ, A. T.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S. V. IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 3194-201, Sep 15 2003.

WEINER, H. L.; DA CUNHA, A. P.; QUINTANA, F.; WU, H. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 241, n. 1, p. 241-59, May 2011.

WILSON, A.; REYES, E.; OFMAN, J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. **Am J Med**, v. 116 Suppl 7A, p. 44S-49S, Apr 5 2004.

WOODWARD, B. Protein, calories, and immune defenses. **Nutr Rev**, v. 56, n. 1 Pt 2, p. S84-92, Jan 1998.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, May 2009.

YAGI, H.; NOMURA, T.; NAKAMURA, K.; YAMAZAKI, S.; KITAWAKI, T.; HORI, S., . . . SAKAGUCHI, S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunol**, v. 16, n. 11, p. 1643-56, Nov 2004.

YAMAMOTO, T.; NAKAHIGASHI, M.; SANIABADI, A. R. Review article: diet and inflammatory bowel disease--epidemiology and treatment. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 30, n. 2, p. 99-112, Jul 1 2009.

YANG, H.; RUDGE, D. G.; KOOS, J. D.; VAIDIALINGAM, B.; YANG, H. J.; PAVLETICH, N. P. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 217-23, May 9 2013.

ZENG, H.; YANG, K.; CLOER, C.; NEALE, G.; VOGEL, P.; CHI, H. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 485-90, Jul 25 2013.

ZHANG, L.; TSCHUMI, B. O.; CORGNAC, S.; RUEGG, M. A.; HALL, M. N.; MACH, J. P., . . . DONDA, A. Mammalian target of rapamycin complex 1 orchestrates invariant NKT cell differentiation and effector function. **J Immunol**, v. 193, n. 4, p. 1759-65, Aug 15 2014.

ZHOU, Y.; RYCHAHOU, P.; WANG, Q.; WEISS, H. L.; EVERS, B. M. TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1631, 2015.

ZIMMER, K. P.; BUNING, J.; WEBER, P.; KAISERLIAN, D.; STROBEL, S. Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes. **Gastroenterology**, v. 118, n. 1, p. 128-37, Jan 2000.

11. Anexo 1 |



11. Anexo 1

Consumption of diets containing free amino acids leads to gut inflammation.

Adna Luciana Souza¹, Ana Cristina Gomes-Santos¹, Sarah Leão Fiorini Aguiar¹, Luísa Lemos¹, Mariana Camilla Gonçalves Miranda¹, Daniela Silva Reis¹; Ana Maria Caetano Faria¹.

¹ Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Key words: nutrition, amino acids, colitis, gut homeostasis

1. Introduction

Nutrients are important modulators of the immune system and can act by several ways, including the development and maintenance of immune homeostasis (Faria *et al.*, 2013). Dietary proteins are able to influence the maturation of the immune system, particularly the gut associated lymphoid tissue (GALT) when consumed from weaning to adulthood (Menezes *et al.*, 2003). Moreover, the presence of dietary proteins after weaning is important to modulate immune activities in response to infection (Amaral *et al.*, 2010), induction of nasal tolerance (Mucida *et al.*, 2004), oral tolerance and allergic responses (Paula-Silva *et al.*, 2015). Thus, the role of dietary protein in the immunological immaturity context, in the early stages of life, is clear. However, the influence of this nutrient in immune maturity situations, during adulthood, is not known. Thus, this study aims to investigate the role of dietary protein after immune maturation of the GALT and contribute to understand how this nutrient acts to maintain the morphology and immune responses in the intestine during life.

To understand the immune effects of the nitrogen source in the form of either intact protein or free amino acids is of great importance in clinical practice, especially in cases of intestinal inflammation. Nutritional therapy is an important point in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD), but there is no consensus about the most appropriate dietary formulation. Elemental formulations, which contain only free amino acids, are used on the grounds of promoting "bowel rest". However, some studies show that the polymeric diets, containing intact proteins, have greater benefits in the treatment of these diseases (Fernandez-Banares *et al.*, 1995; Griffiths *et al.*, 1995; Gassull, 2001). Thus, this work also aims to clarify the role of dietary amino acids in the intestinal inflammation, and contributes to understand the effects of elemental, semi elemental and polymeric diets in the intestinal inflammation.

2. Materials and methods

Ethics statement. Conventional male C57BL/6 mice were kept in an environmentally controlled room with a 12-h light-dark cycle in the conventional experimental animal facility of Laboratório de Imunobiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. At the end of the experiments, mice were sacrificed by cervical dislocation. All procedures were approved by the local ethical committee for animal research (Protocol no. 114/2010, CETEA-UFMG, Brazil).

Diets. The diet utilized in this work was based on the AIN 93 (Reeves *et al.*, 1993), but with changes in nitrogen source. The experimental diet containing free amino acid (AA diet) and the control diet containing whole casein (CAS diet), but the percentage of nitrogen was similar between diets. Diets were isocaloric and identical with respect to all other nutrients (Table 1).

Evaluation of diets in physiologic conditions. C57BL/6 mice at 7-8 weeks were introduced at experimental diet or control diet. These diet were maintained for five weeks. Mouse chow and water were administered ad libidum.

Biochemical tests. Total serum proteins, albumin, transferrin (Labtest[®]), glycemia (katal[®]), serum triglycerides and cholesterol (Doles[®]) were determined using enzymatic kits.

Intestinal lavage samples. For sIgA assays, intestinal contents of the small and large intestine were collected by carefully washing the intestinal lumen with respectively 10 ml and 5ml of cold PBS, transferred to a test tube, vigorously vortexed and centrifuged for 30 min at 850 g at 4°C. The resultant supernatant was transferred to a new test tube and freshly tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgA concentration as previously described (Elson *et al.*, 1984).

Analysis of secretory IgA and total serum immunoglobulin. Levels of isotype-specific Ig in intestinal lavage samples and serum were determined by ELISA. Briefly, 96-well plates (Nunc) were coated with 0.1 mg/ml goat anti-mouse Ig in coating buffer, pH

9.8. Wells were blocked with 200 μ l of PBS contain 0.25% casein for 1 h at room temperature. After washing the plates 6 times serial dilutions of samples were added to wells and incubated for 1 h at 37°C. Plates were washed 6 times again and 100 μ l biotinylated goat anti-mouse heavy chain-specific polyclonal antibodies were added, and then incubated for 1 h at 37°C. After six washes, a detection solution containing a 1/10000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated streptavidin was added and incubated for 45 min. After washing, the color reaction was developed at room temperature with 100 μ l/well of orthophenylenediamine (1 mg/ml), 0.04% H₂O₂ substrate in sodium citrate buffer. The reaction was interrupted by the addition of 20 μ l/well of 2 N H₂SO₂. Absorbance was measured at 492 nm by an ELISA reader (Expert plus, Asys) and Ig concentrations were determined using a standard curve

Intestinal Tissue Preparation and Cytokine Assay. Colon samples were weighed and homogenized in PBS containing 0.05% Tween-20, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU Aprotinin A using a tissue homogenizer (100 mg tissue/ml buffer). Suspensions were centrifuged at 12.000g for 20 min at 4°C and the supernatants were transferred to microtubes and stored at -80°C until analysis. Supernatants were collected for cytokine assay levels of IL-6, IL-12, IL-4, IL-10, IL-17A and TGF- β by capture ELISA. Briefly, plates were coated with purified monoclonal antibodies reactive with cytokines IL-6, IL-12, IL-4, IL-10, IL-17A and TGF- β (BD-Pharmingen) overnight at 4°C. In the following day, wells were washed, supernatants and standarts were added, and plate was incubated overnight at 4°C. In the third day, biotinylated monoclonal antibodies against cytokines were added and plates were incubated for 2 hours at room temperature. Color reaction was developed at room temperature with 100 μ L/well of orthophenylenediamine (1 mg/mL), 0.04% H₂O₂ substrate in sodium citrate buffer. Reaction was interrupted by the addition of 20 μ L/well of 2N H₂SO₄. Absorbance was measured at 492nm by ELISA reader (BIO-RAD).

Cell Preparation and Flow Cytometry Analysis. Following euthanasia, the small intestine and colon tissue was harvested and mesenteric and adipose tissue was removed. Next, the visible Peyer's patches were removed. The tissue was then cut

open longitudinally and drawn through a pair of curved forceps while applying gentle pressure to remove intestinal contents. Next the tissue was cut into 2–4 cm lengths then washed twice, to remove the feces, in calcium- and magnesium-free HBSS containing 2% FCS (at 4°C). This tissue was placed in 50-ml tubes and washed three times in HBSS containing 2% FCS at 4°C. The tissue was transferred to 25-cm³ tissue culture flasks and incubated at 37°C in HBSS containing 10% FCS, 0.2 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. After 20 min, the flasks were shaken vigorously for 30s, and the supernatant containing the IEL was separated from the tissue fragments using a stainless steel sieve. To isolate lamina propria lymphocytes, the remaining tissue was washed 3 times with cRPMI, and intestinal pieces were subsequently incubated 30 minutes at 37°C in cRPMI supplemented with 100 U/mL liberase. The cells were separated from tissue debris by purification through a 70-µm nylon filter. This step was repeated once with 40-µm nylon filter. After cells count the concentration of the suspensions were added required volumes of complete RPMI medium for give 10⁶ cels/ml. For surface antigen detection, the cells were labeled with monoclonal antibodies (anti-CD4 FITC, anti-CD44 PE, anti-IL-23 Percep 5.5) for 30 min at 4°C. For intracellular labeling, after this first step was used fixing kit / permeabilization (e-bioscience) and then the samples were incubated for thirty minutes with anti-Foxp3 antibodies or mouse anti-RORγt. After washes with PBS-wash, samples were fixed with 3% paraformaldehyde for 30 minutes, washed and stored in PBS at 4 ° C. Cells were acquired using a FACSCanto II (BECTON & DICKINSON) and data were analyzed by FlowJo (TREESTAR).

Histomorphometric analysis. Histological sections of small intestine and colon were obtained from casein and Aa mice. Tissues were fixed in 10% PBS-buffered formalin, embedded in paraffin, and 3-mm thick sections were obtained, stained with hematoxylin & eosin and examined under a light microscope. Images of histological slides were captured from a miniature camera JVC TK-1270 / RGB and analyzed using Image J. The parameters were measured using millimeter ruler.

Western blotting analysis. Total and phosphorylated mammalian target of rapamycin were evaluated by western blotting analysis. Samples of colon were weighed and

homogenized in buffer containing 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 120 mmol/L NaCl, 1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5 mmol/L ethylene glycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid (EGTA), 50 mmol/L b-glycerophosphate, 50 mmol/L NaF, 0.3% 3- (3-cholamidepropyl) dimethylammonio- 1-propanesulphonate (CHAPS), 1 mmol/L dithiothreitol, 4 mg/mL leupeptin, and 4 mg/mL aprotinin using a tissue homogenizer. The remaining homogenate was centrifuged at 12.000g for 20 min at 4°C. Cell lysates containing equal amounts of protein were separated on 4–12% tris-glycine polyacrylamide gels and then electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with specific antibody mTOR (L27D4), phospho-mtor (Ser2448) and phospho-p70 S6 kinase (Thr389) (Cell signaling Technology), then the immunoreactive bands were detected with Western Breeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit (Invitrogen).

Evaluation of diets in intestinal inflammation. In the first part, C57BL/6 mice at 7-8 weeks were introduced at experimental diet or control diet. All mice were kept on these diets during the period of colitis induction. Colitis was induced by three cycles of administration of 1% (w/vol) DSS (Dextran Sodium Sulphate; 40 kDa) in drinking water for 7 days, alternating with periods of recovery of 7 days. The control group received only water. Liquid consumption was monitored and all mice groups consumed similar volumes of DSS solution daily. After the last DSS cycle, animals were euthanized.

In the second part, to evaluated the effects of diets previously to colitis induction, mice received amino acid or casein diet during seven days. After this, the experimental diets were replaced by commercial feed and colitis was induced by DSS 1% consumption during seven days.

Beside evaluation of solid AIN93 diet, were evaluated enteral formulations during colitis. Elemental, semi elemental and polymeric diets were offered during seven days. After this, the formulations were replaced by commercial feed and colitis was induced by DSS 1% consumption during seven days.

Clinical and histological score. Clinical evaluation was assessed using a previously defined scoring system, which includes loss of body weight, diarrhea and the presence of blood in the stools. Each score was determined as follows, change in weight (0:<1%;

1: 1–5%; 2: 5–10%; 3: 11-15%; 4:>15%), diarrhea (0: negative; 2: moderate; 4: severe), and stool blood (0: absence; 2: hidden blood; 3: visible blood) as previously described (Cooper *et al.*, 1993). Weight change is expressed as percentage change in weight compared with the starting weight.

Histological examination was performed on samples of the distal colon, which were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in ethanol, and then embedded in paraffin. Sections were then prepared, stained with hematoxylin and eosin and were blindly scored based on a semiquantitative scoring system described previously (McCafferty *et al.*, 2000). Each score was determined as follows: extent of destruction of normal mucosal architecture (0: normal; 1: mild; 2: moderate; 3: extensive damage), presence and degree of cellular infiltration (0: normal; 1: mild; 2: moderate; 3: transmural infiltration), extent of muscle thickening (0: normal; 1: mild; 2: moderate; 3: extensive thickening), presence or absence of crypt abscesses (0: absent; 1: present) and the presence or absence of goblet cell depletion (0: absent; 1: present). Scores for each feature were summed up to a maximum possible score of 11.

Statistical Analysis. Results were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance of differences among groups was determined by Student's t-test or analysis of variance (ANOVA). Means were considered statistically different when $P < 0.05$.

3. Results

Amino acid diet consumption did not change nutritional parameters

Malnutrition affects several aspects of immune system (Marcos *et al.*, 2003) and is important to ensure that the immune alterations observed are not due to nutritional deficiencies. The results presented here show that amino acid diet is capable of maintaining the growth normal of animals and there was no difference in the body weight between groups (fig.1A). The diet consumption also was similar between amino acid and casein group (Fig. 1B). The levels of total serum protein, albumin, transferrin, triglycerides, cholesterol and glucose also was not affected by the consumption of diets containing free amino acids (Fig. 1C-H). These data demonstrate that amino acid diet is nutritionally equivalent to casein diet and does not alter the nutritional status.

Absence of intact proteins reduces immunoglobulins levels

The amino acid diet does not change the levels of total serum immunoglobulins (fig. 2A). However, compared to the casein group, serum IgA levels were lower in the amino group after seven days of diet consumption and serum IgG after 7 and 21 days of diet (Fig 2B-C). IgM levels were similar between groups on days 7 and 21 being lower in the amino acid group after 33 days of dietary intake (Fig 2D).

There was no difference between groups in the levels of sIgA in the small intestine. In the colon diet containing free amino acids caused no increase of sIgA after 35 days, when compared to the casein group (Fig. 2E-F).

Consumption of diet containing free amino acid affects cytokines production

The effects of diet containing free amino acids was observed mainly after the first week for most of the evaluated cytokines. After one week of consumption, the amino acid group showed, when compared to the casein group, lower concentrations of IL-10, IL-4, IFN- γ , IL-17A and TGF- β in the spleen (fig. 3A-G).

In the small intestine, the amino acid group showed higher IL-6 level, after seven days of consumption, and IL-17A after 7 and 14 days of diet (Fig. 4A-C). Similarly, in the colon, the amino group had higher levels of IL-6 and IL-17A after seven days of consumption of diets, as well as IL-10 and TGF- β (fig 5A-G).

Prolonged consumption of diet containing free amino acid promotes increase of intestinal cells

The number of cells in the lamina propria of the small intestine was similar between the groups after one week of diet. However, after five weeks, the amino group showed a large increase in the number of total cells compared to the casein group. Consumption of diet containing free amino acids also resulted in an increase of CD4⁺ T cells, CD4⁺ CD44⁺ T lymphocytes, CD4⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells and CD4⁺ RORγt⁺ T lymphocytes after five weeks (fig 6A-E). These differences were not observed in the colon (fig 7A-E).

Dietary amino acid alters intestinal morphology

The consumption of diets containing free amino acids caused important changes in the gut such as levels of sIgA, cytokines and cells in the lamina propria. Thus, it was assessed whether this diet also influences the intestinal morphology.

In the small intestine, consumption of AA diet caused increased villus size in all periods evaluated. Furthermore, the AA group had higher crypt depth after five weeks of consumption when compared to the casein group (Fig. 8A-E)

In the colon, the consumption of AA diet for one week did not cause morphological changes. However, after five weeks of dietary consumption, animals from AA group had histopathological changes such as increase of cellular infiltration in the mucosal layer, reduction of goblet cells and increase of edema of the submucosal layer (Fig. 9A-G).

Amino acid-based diet exacerbates dss-induced colitis

Consumption of diets containing free amino acids to replace intact proteins caused several immunological changes in the gut and systemically. Among them morphological changes in the gut and increased of cellular infiltration and edema of the submucosa, as evidenced by the histological images. Moreover, the consumption of diets containing free amino acids lead to changes in the profile of Th17 cells, which play an important role in intestinal immune responses. Thus, the results suggest an imbalance of intestinal homeostasis resulting from the consumption of free amino

acids. Therefore, the consumption of these diets was examined during intestinal inflammation.

As show in figure 10, amino-acid diet promoted greater severity of inflammation in all experimental times evaluated. Mice fed with this diet showed greater weight loss (fig 10A), beside bleeding and diarrhea more intense that animals fed the standard diet as evidenced by the highest clinical score in all cycles of colitis induction (Fig. 10B). The length of the colon, which is inversely proportional to inflammation, also was lower in the group fed the diet containing free amino acids (Fig. 10C). The amino group showed increased levels of sIgA in the colon when compared to the casein group. There were no differences in the sIgA levels in small intestine (Fig. 10D-E).

In addition, histological analysis showed increased cellular infiltration in the mucosal layer, destruction of the architecture mucosal and thickening of the muscular layer, as shown by the higher histological index (Figure 1C-G).

Histological analysis, performed at the end of the third cycle of inflammation induction, also showed higher severity of colitis in the group fed the diet containing free amino acids. The histological index in this group showed greater depletion of goblet cells, erosion of the mucosal layer, cellular infiltrate in the mucosa and submucosa layer and edema (Figure 11A-E).

These data demonstrate that the consumption of free amino acid during the induction of colitis has severe deleterious effects, contributing to increased severity of bowel inflammation.

Consumption of diet containing free amino acids prior to induction of colitis contributes to more severe inflammation

In the experimental protocol of colitis induction demonstrated above, the animals consumed casein and amino acid diets at same time of DSS ingestion. Here the question is if the consumption of diets prior to colitis induction has some effect on the severity of inflammation.

As show in figure 12, consumption of diet containing free amino acids prior to colitis induction also caused greater severity of inflammation. The amino group had a higher clinical score, lower length of the colon and increase of histological score when

compared to the casein group (Fig. 12A-D). Thus, the effects induced by diet containing free amino acids are early, long lasting and capable of influencing the development of inflammation even after diet withdrawal.

Our results show that diets containing free amino acids are nutritionally equivalent to diets containing intact proteins. However, its consumption causes various immunological changes, influencing the production of serum immunoglobulins, sIgA, cytokine levels, cell profile and intestinal morphology. These changes are dependent on time-consuming diets. In addition, AA diet intake during and prior to colitis induction causes exacerbation of inflammation.

4. Discussion

The immunological relevance of dietary proteins, studied by a model that replaces intact proteins by amino acids, has been previously described by our group (Menezes *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2006; Paula-Silva *et al.*, 2015). Menezes and coworkers (2003) showed that exposure to food proteins after weaning has a physiological role in the maturation of the immune system both locally and systemically (Menezes *et al.*, 2003). Furthermore, was demonstrated that mice fed with diet containing free amino acids from weaning to adulthood are resistant to the induction of nasal tolerance (Mucida *et al.*, 2004) and have lower susceptibility to induction of oral tolerance (Silva, 2010). However, the effects of these diets in animals as adults, who have GALT developed, are not known. The presente work contributes to the clarification of this issue.

We show that protein free diet causes immunological alterations in adult mice in physiological conditions. These alterations observed are not due to changes in the nutritional status of the animals. We showed the amino acid diet is nutritionally equivalent to casein diet and the parameters indicative of nutritional status such as weight, total serum proteins, albumin, trasnferrin, glycemia, triglycerides are similar between groups. Previous studies in humans and animals also showed nutritional equivalence between diets containing intact protein or free amino acids and confirm our results (Moriarty *et al.*, 1985; Menezes *et al.*, 2003; Silva, 2010; Gomes-Santos, 2011; Paula-Silva *et al.*, 2015).

The amino acid diet caused several immunological changes, including lower levels of IgA and serum IgG after one and three weeks of diet. This reduction also was observed when the diet is consumed after weaning (Menezes *et al.*, 2003) and this effect is reversible by the introduction of dietary proteins (Amaral *et al.*, 2006). This suggests that dietary proteins in contact with the intestinal mucosa stimulate the lymphocyte proliferation and differentiation into activated plasma cells in lymphoid organs (Amaral *et al.*, 2006). The removal of antigenic stimulation of the diet in adult animals is enough to promote the reduction of the stimulus for immunoglobulins production, although this effect is less intense when compared to animals with an immature immune system. Furthermore, the effect of reduction of antigen stimulation

seems to be more important in the first weeks of consumption (one week and, to a lesser degree three weeks). After five weeks, the presence of dietary amino acids appears to act through other mechanisms, being one hypothesis the stimulation of cell proliferation. This effect could compensate the absence of the initial stimulus, contributing to the similarity between the groups after five weeks of diet consumption.

Contrary to seric IgA and IgG, the IgM levels were similar in the initial stages, being reduced in the amino acid group only after five weeks of diet. IgM is considered a "natural antibody", spontaneously occurring in the absence of antigenic stimulation in germ-free and antigen-free animals (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1992; Coutinho *et al.*, 1995), which explains the initial behavior distinct from IgA and IgG isotypes.

The dietary nitrogen source did not affect the sIgA levels in the small intestine, but the consumption of diet containing free amino acids promote higher levels of this immunoglobulin in the colon after five weeks. One hypothesis for this result is the pro-inflammatory state observed in the colon, evidenced by increase of cell infiltration, reduction of goblet cells and edema of the submucosal layer after amino acid diet consumption for five weeks. Higher sIgA levels were also observed in the amino acid group submitted to intestinal inflammation, which is related to the greater severity of colitis seen in this group. Another hypothesis for the increase of sIgA in the colon of the amino acid group and not in the small intestine is by changing the microbiota. Several studies have shown that the composition of the diet can affect both the diversity and the number of intestinal bacteria (Conlon e Bird, 2015). The intestinal microbiota in turn, is capable of modulating the levels of sIgA in the intestine (Round e Mazmanian, 2009).

CD4+ naive lymphocytes can differentiate into Th17 cells, Th1 or Th2 depending on the cytokines present in the microenvironment. The differentiation to Th17 cells requires the expression of the transcription factor ROR γ t. Upregulation of this factor occurs in the presence of TGF- β and IL-6 (Jin e Dong, 2013). Thus, the initial increase in IL-6 and TGF- β levels in the amino group may have contributed to the increase in the number of CD4+ROR γ t+ T cells in this group.

The amino acid group had higher IL-17A concentrations in the intestine after one week of diet consumption. However, the increase of Th17 cells, one of cells responsible for the production of this cytokine, was only observed after five weeks of

consumption. Others cell population can produce IL-17, including $\gamma\delta$ T cells, innate Th17 (Geddes *et al.*, 2011), natural killer, macrophages and Paneth cells (Reynolds *et al.*, 2010; Jin e Dong, 2013). However, the role of dietary protein and amino acids in these cell types need to be evaluated.

The amino acid group showed an increase in total cells, CD4+ T lymphocytes, CD4+ CD44 + activated cells, Th17 cells and T regulatory Foxp3 cells in the lamina propria of the small intestine. The colon showed no difference in the number of these cells, suggesting that the effect is specific, since the small intestine is the primary site of digestion and absorption of nutrients. The significant increase in the number of cells in the small intestine suggests that the diet with free amino acids may act in cell activation and proliferation or migration of cells to the intestine.

Free amino acids are signaling molecules and modulate the immune system through pathways such as mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR is a conserved serine/threonine kinase that has a central role in the regulation of cell growth and metabolism, sensing and integrating diverse environmental signals, including nutrients and growth factors (Li *et al.*, 2011; Chi, 2012). The mTOR signals through two distinct multiprotein complexes called mTOR complex (mTORC)1 and mTORC2 which are sensitive and insensitive to rapamycin, respectively. The mTORC1 senses the changes in the ambient nutritional environment, including changes in amino acid concentration (Wullschleger *et al.*, 2006) mainly L-glutamine and L-asparagine e other essentials amino acids such as L-leucine, L- tryptophan, L-phenylalanine, L-arginine (Nicklin *et al.*, 2009).

The signaling through mTORC1 contributes to maintaining homeostasis of the intestinal epithelium (Nakamura *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2015) and regulates various cells of the innate and adaptive immune system (Powell *et al.*, 2012) such as dendritic cells (Ohtani *et al.*, 2012), macrophages (Zhou *et al.*, 2015), neutrophils (Mcinturff *et al.*, 2012) and regulatory T cells (Zeng *et al.*, 2013). The specific role of mTOR activation by diet containing free amino acids and intact protein remains to be investigated, as well as the role of this pathway in the modulation of immune cells during consumption of diets.

Amino acid diet consumption caused several histopathological changes in the colon such as cellular infiltration in the mucosal layer, reduction of goblet cells, edema

of the submucosal layer. These changes suggest that prolonged consumption of diets with free amino acids can be harmful, especially for the final portions of the intestine. The increase of lamina propria cells may be related to higher activation of mTOR in the amino acid group. Early changes in the concentration of intestinal cytokines may also be involved in the development of pathological changes after five weeks of consumption. Another possibility for this result specifically in the colon is the modulation of the microbiota by the diet.

Our results showed that the amino acid diet induces the development of a more severe form of experimental colitis. The mice fed with amino acid diet had, in all analyzed experimental times, higher clinical score, weight loss and lower colon length. Histological evaluation showed intense inflammatory infiltrate in the mucosa and submucosa, loss of mucosal architecture layer and thickening of the muscle layer. The histological index, reported in the third cycle, was higher in AA group when compared to casein group. Thus our results demonstrated that the presence of free amino acid in diet is deleterious in inflammatory situations.

Furthermore, the amino acid diet consumption prior to colitis induction also causes more severe inflammation. This suggests that the effects induced by diet containing free amino acids are long lasting and modify the course of inflammation even after discontinuation of use.

Elemental diets, which have in its composition only free amino acids, are often used in the nutritional treatment of patients with IBD. However, the role of elemental, oligomeric and polymeric diets in the treatment of IBDs is still controversy (Fernandez-Banares *et al.*, 1995; Griffiths *et al.*, 1995; Gassull, 2001). Some studies has shown that elemental diets are better for treating DC active when compared to polymeric (Giaffer *et al.*, 1990) and treatment with corticosteroids (O'morain *et al.*, 1984; Gorard *et al.*, 1993). Others showing no difference between the formulas used in the treatment of active DC (Rigaud *et al.*, 1991; Verma *et al.*, 2000). Farther some authors have demonstrated that polymeric formulations are the most suitable, since they have the same effects on remission rate that elemental diets, but promote greater weight gain (Ludvigsson *et al.*, 2004).

There are few studies that evaluated the effects of elemental diets in experimental models of colitis. In the model of colitis induced by transferring cells

from C57BL/6 mice deficient for IL-10 to CB-17 SCID mice, the elemental diet prevented weight loss and suppress intestinal inflammation, while the group fed with normal diet showed a severe form of colitis (Kajiura *et al.*, 2009). However, the elemental and polymeric diet used in the papers cited above contains, in addition to alterations in the protein source, altered composition of other nutrients that have effects on immune system. So, the exclusive roles of dietary amino acids are not clear. Our work contributes to clarify exclusively the role of stimulation by dietary proteins in colitis.

Several studies have demonstrated that blockade of activation mTOR, by inhibitors such as rapamycin and everolimus, reduces experimentally induced colitis. The administration of everolimus to interleukin-10 gene-deficient mice, which develops spontaneous colitis, inhibits the proliferation of activated T cells, decreases the number of Th1 cells and the production of inflammatory cytokines by Th1 cells in the lamina propria, and eventually ameliorates chronic colitis (Matsuda *et al.*, 2007). In model of colitis induced by DSS, the treatment with rapamycin decreases leukocyte migration and effectively reduces inflammation (Farkas *et al.*, 2006; Matsuda *et al.*, 2007). This suggests that the increase of mTOR activation by dietary amino acids may be responsible for colitis severity. However, it still needs to be better evaluated, being one of the prospects of this study.

This study demonstrates that the presence of free amino acids causes exacerbation of intestinal inflammation, when consumed prior or during inflammation. This reinforces the importance of conducting clinical studies to evaluate the effects of different enteral formulations in immunological parameters in patients with IBD.

Acknowledgments: We would like to thank Ilda Marçal de Souza for the excellent care of the animals. This work was supported by a grant from FAPEMIG (APQ). Some of the authors were recipients of scholarships (A.L.S.) and research fellowships from CNPq, Brasil (D.C.C., A.M.C.F.)

5. References

ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 361, n. 21, p. 2066-78, Nov 19 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923578>>.

ACOSTA ESCRIBANO, J.; GOMEZ-TELLO, V.; RUIZ SANTANA, S. [Nutritional assessment of the severely ill patient]. **Nutr Hosp**, v. 20 Suppl 2, p. 5-8, Jun 2005. ISSN 0212-1611 (Print)

0212-1611 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15981840> >.

ADIBI, S. A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 285, n. 5, p. G779-88, Nov 2003. ISSN 0193-1857 (Print)

0193-1857 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561585> >.

AMARAL, J. F. et al. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 12, p. 1581-6, Dec 2006. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160267> >.

AMARAL, J. F. et al. Antigenic dietary protein guides maturation of the host immune system promoting resistance to *Leishmania major* infection in C57BL/6 mice.

Immunology, v. 129, n. 3, p. 455-64, Mar 2010. ISSN 1365-2567 (Electronic)

0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002788> >.

AXELSSON, L. G.; LANDSTROM, E.; BYLUND-FELLENIOUS, A. C. Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, n. 9, p. 925-34, Sep 1998. ISSN 0269-2813 (Print)

0269-2813 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9768537> >.

BAMBA, T. et al. Dietary fat attenuates the benefits of an elemental diet in active Crohn's disease: a randomized, controlled trial. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 2, p. 151-7, Feb 2003. ISSN 0954-691X (Print)

0954-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560759> >.

BEATTIE, R. M.; BENTSEN, B. S.; MACDONALD, T. T. Childhood Crohn's disease and the efficacy of enteral diets. **Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 345-50, Apr 1998. ISSN 0899-9007 (Print)

0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9591305> >.

BELL, R. G.; HAZELL, L. A. Influence of dietary protein restriction on immune competence. I. Effect on the capacity of cells from various lymphoid organs to induce

graft-vs.-host reactions. **J Exp Med**, v. 141, n. 1, p. 127-37, Jan 1 1975. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/235002> >.

BELL, R. G.; HAZELL, L. A.; PRICE, P. Influence of dietary protein restriction on immune competence. II. Effect on lymphoid tissue. **Clin Exp Immunol**, v. 26, n. 2, p. 314-26, Nov 1976. ISSN 0009-9104 (Print)
0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1086755> >.

BHASKARAM, P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: an overview. **Nutr Rev**, v. 60, n. 5 Pt 2, p. S40-5, May 2002. ISSN 0029-6643 (Print)
0029-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035857> >.

BORRELLI, O. et al. Polymeric diet alone versus corticosteroids in the treatment of active pediatric Crohn's disease: a randomized controlled open-label trial. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 4, n. 6, p. 744-53, Jun 2006. ISSN 1542-3565 (Print)
1542-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682258> >.

BOS, N. A. et al. The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. **Cell Immunol**, v. 112, n. 2, p. 371-80, Apr 1 1988. ISSN 0008-8749 (Print)
0008-8749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2451571> >.

BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 7, p. 521-33, Jul 2003. ISSN 1474-1733 (Print)
1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12876555> >.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 6, p. 505-15, Dec 2009. ISSN 1365-3083 (Electronic)
0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906191> >.

_____. Update on mucosal immunoglobulin A in gastrointestinal disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 26, n. 6, p. 554-63, Nov 2010. ISSN 1531-7056 (Electronic)
0267-1379 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693891> >.

BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 249-86, Jan 2008. ISSN 0031-9333 (Print)
0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18195088> >.

BUDDINGTON, R. K. Nutrition and ontogenetic development of the intestine. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 72, n. 3, p. 251-9, Mar 1994. ISSN 0008-4212 (Print) 0008-4212 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069771> >.

CANTORNA, M. T. et al. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6 Suppl, p. 1717S-20S, Dec 2004. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585793> >.

CAZAC, B. B.; ROES, J. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 443-51, Oct 2000. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11070163> >.

CEBRA, J. J. et al. The secretory IgA system of the gut. **Ciba Found Symp**, n. 46, p. 5-28, Apr 26-28 1977. ISSN 0300-5208 (Print) 0300-5208 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/346328> >.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 2, p. 460S-463S, Aug 1997. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250133> >.

CHAPMAN-KIDDELL, C. A. et al. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, n. 1, p. 137-51, Jan 2010. ISSN 1536-4844 (Electronic) 1078-0998 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19462428> >.

CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 7, p. 445-56, Jul 2011. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21681197> >.

CHEROUTRE, H.; MADAKAMUTIL, L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 4, p. 290-300, 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri1333> >.

CHI, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 325-38, 2012. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517423> >.

CHINERY, R.; GOODLAD, R. A.; WRIGHT, N. A. Soy polysaccharide in an enteral diet: Effects on rat intestinal cell proliferation, morphology and metabolic function. **Clin Nutr**, v. 11, n. 5, p. 277-83, Oct 1992. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840009> >.

CONLON, M. A.; BIRD, A. R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 17-44, Jan 2015. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25545101> >.

COOPER, H. S. et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab Invest**, v. 69, n. 2, p. 238-49, Aug 1993. ISSN 0023-6837 (Print) 0023-6837 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350599> >.

CORR, S. C.; GAHAN, C. C.; HILL, C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 1, p. 2-12, Jan 2008. ISSN 0928-8244 (Print) 0928-8244 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18081850> >.

COUTINHO, A.; KAZATCHKINE, M. D.; AVRAMEAS, S. Natural autoantibodies. **Curr Opin Immunol**, v. 7, n. 6, p. 812-8, Dec 1995. ISSN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8679125> >.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, n. 6, p. 1119-28; quiz 1129, Jun 2005. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15940121> >.

DANGIN, M. et al. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 2, p. E340-8, Feb 2001. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158939> >.

DEL RIO, M. L. et al. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. **Immunol Rev**, v. 234, n. 1, p. 268-81, Mar 2010. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193025> >.

ELSON, C. O.; EALDING, W.; LEFKOWITZ, J. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. **Journal of**

Immunological Methods, v. 67, n. 1, p. 101-108, 2/24/ 1984. ISSN 0022-1759.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175984900899> >.

FARACHE, J. et al. Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 581-95, Mar 21 2013. ISSN 1097-4180 (Electronic)

1074-7613 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395676> >.

FARIA, A. M. et al. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Front Immunol**, v. 4, p. 102, 2013. ISSN 1664-3224 (Electronic)

1664-3224 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23730302> >.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 206, p. 232-59, Aug 2005. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16048553> >.

FARKAS, S. et al. Rapamycin decreases leukocyte migration in vivo and effectively reduces experimentally induced chronic colitis. **Int J Colorectal Dis**, v. 21, n. 8, p. 747-53, Dec 2006. ISSN 0179-1958 (Print)

0179-1958 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16228179> >.

FERGUSON, A.; GLEN, M.; GHOSH, S. Crohn's disease: nutrition and nutritional therapy. **Baillieres Clin Gastroenterol**, v. 12, n. 1, p. 93-114, Mar 1998. ISSN 0950-3528 (Print)

0950-3528 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704157>

>.

FERGUSON, L. R. et al. Uncoupling gene-diet interactions in inflammatory bowel disease (IBD). **Genes Nutr**, v. 2, n. 1, p. 71-3, Oct 2007. ISSN 1555-8932 (Print)

1555-8932 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18850145> >.

FERGUSON, L. R. et al. Genes, diet and inflammatory bowel disease. **Mutat Res**, v. 622, n. 1-2, p. 70-83, Sep 1 2007. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628615> >.

FERNANDEZ-BANARES, F. et al. How effective is enteral nutrition in inducing clinical remission in active Crohn's disease? A meta-analysis of the randomized clinical trials.

JPEN J Parenter Enteral Nutr, v. 19, n. 5, p. 356-64, Sep-Oct 1995. ISSN 0148-6071 (Print)

0148-6071 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577011>

>.

FRAKER, P. J. et al. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1399S-406S, May 2000. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801951> >.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R. C. [Mechanisms of absorption of amino acids and oligopeptides. Control and implications in human diet therapy]. **Arq Gastroenterol**, v. 36, n. 4, p. 227-37, Oct-Dec 1999. ISSN 0004-2803 (Print)

0004-2803 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10883316> >.

FRISWELL, M.; CAMPBELL, B.; RHODES, J. The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Gut Liver**, v. 4, n. 3, p. 295-306, Sep 2010. ISSN 1976-2283 (Print)

1976-2283 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981205> >.

FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C. M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **J Am Diet Assoc**, v. 104, n. 8, p. 1258-64, Aug 2004. ISSN 0002-8223 (Print)

0002-8223 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15281044> >.

GASSULL, M. A. New insights in nutritional therapy in inflammatory bowel disease. **Clinical Nutrition**, v. 20, Supplement 1, n. 0, p. 113-121, 2001. ISSN 0261-5614.

Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561401800169> >.

_____. Nutrition and inflammatory bowel disease: its relation to pathophysiology, outcome and therapy. **Dig Dis**, v. 21, n. 3, p. 220-7, 2003. ISSN 0257-2753 (Print)

0257-2753 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14571095> >.

GEDDES, K. et al. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. **Nat Med**, v. 17, n. 7, p. 837-44, Jul 2011. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666695> >.

GEISS-FRIEDLANDER, R. et al. The cytoplasmic peptidase DPP9 is rate-limiting for degradation of proline-containing peptides. **J Biol Chem**, v. 284, n. 40, p. 27211-9, Oct 2 2009. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19667070> >.

GIAFFER, M. H.; NORTH, G.; HOLDSWORTH, C. D. Controlled trial of polymeric versus elemental diet in treatment of active Crohn's disease. **Lancet**, v. 335, n. 8693, p. 816-9, Apr 7 1990. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1969560> >.

GILBERT, E. R.; WONG, E. A.; WEBB, K. E., JR. Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. **J Anim Sci**, v. 86, n. 9, p. 2135-55, Sep 2008. ISSN 1525-3163 (Electronic) 0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441086> >.

GOMES-SANTOS, A. C. **Estratégias alternativas de imuno- modulação nas doenças inflamatórias intestinais**. 2011. 144 Doutorado (Doutorado). Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

GOMES-SANTOS, A. C. et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 560817, 2012. ISSN 1740-2530 (Electronic) 1740-2522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22400037> >.

GOMES-SANTOS, AC, FONSECA, RC, LUISA L, REIS DS, MOREIRA TG, SOUZA AL, SILVA MR, SILVESTRE MP, CARA DC, FARIA AM. Hydrolyzed whey protein prevents the development of food allergy to β -lactoglobulin in sensitized mice. **Cell Immunol**. 2015 Nov-Dec;298(1-2):47-53. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.09.001. Epub 2015 Sep 5.

GORARD, D. A. Enteral nutrition in Crohn's disease: fat in the formula. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 2, p. 115-8, Feb 2003. ISSN 0954-691X (Print) 0954-691X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560753> >.

GORARD, D. A. et al. Initial response and subsequent course of Crohn's disease treated with elemental diet or prednisolone. **Gut**, v. 34, n. 9, p. 1198-202, Sep 1993. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8406153> >.

GRIFFITHS, A. M. et al. Meta-analysis of enteral nutrition as a primary treatment of active Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. 1056-67, Apr 1995. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7698572> >.

GRIMBLE, G. K. The significance of peptides in clinical nutrition. **Annu Rev Nutr**, v. 14, p. 419-47, 1994. ISSN 0199-9885 (Print)
0199-9885 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7946528> >.

HAMADA, H. et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. **J Immunol**, v. 168, n. 1, p. 57-64, Jan 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751946> >.

HAMADA, S. et al. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver. **J Immunol**, v. 181, n. 5, p. 3456-63, Sep 1 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18714018> >.

HASHIMOTO, K. et al. Germfree mice reared on an "antigen-free" diet. **Lab Anim Sci**, v. 28, n. 1, p. 38-45, Feb 1978. ISSN 0023-6764 (Print)
0023-6764 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/633838> >.

HEDRICH, C. M.; BREAM, J. H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunol Res**, v. 47, n. 1-3, p. 185-206, Jul 2010. ISSN 1559-0755 (Electronic)
0257-277X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20087682> >.

HOFMANN, S. R. et al. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. **Clin Immunol**, v. 143, n. 2, p. 116-27, May 2012. ISSN 1521-7035 (Electronic)
1521-6616 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459704> >.

HOOIJKAAS, H. et al. Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. **Eur J Immunol**, v. 14, n. 12, p. 1127-30, Dec 1984. ISSN 0014-2980 (Print)
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6083871> >.

HUBER, S.; GAGLIANI, N.; FLAVELL, R. A. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 9, p. 2238-45, Sep 2012. ISSN 1521-4141 (Electronic)
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949322> >.

HUGHES, R.; MAGEE, E. A.; BINGHAM, S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. **Curr Issues Intest Microbiol**, v. 1, n. 2, p. 51-8, Sep 2000. ISSN 1466-531X (Print)
1466-531X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709869>>.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **J Clin Invest**, v. 116, n. 5, p. 1218-22, May 2006. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670765>>.

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 313-38, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302043>>.

JEEJEBHOY, K. N. Nutritional assessment. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 585-90, Jul-Aug 2000. ISSN 0899-9007 (Print)
0899-9007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906564>>.

JIN, W.; DONG, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerg Microbes Infect**, v. 2, n. 9, p. e60, Sep 2013. ISSN 2222-1751 (Electronic)
2222-1751 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038490>>.

JIN, X. et al. Interleukin-6 is an important in vivo inhibitor of intestinal epithelial cell death in mice. **Gut**, v. 59, n. 2, p. 186-96, Feb 2010. ISSN 1468-3288 (Electronic)
0017-5749 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074180>>.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **J Immunol**, v. 171, n. 12, p. 6323-7, Dec 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662827>>.

KAJIURA, T. et al. Change of intestinal microbiota with elemental diet and its impact on therapeutic effects in a murine model of chronic colitis. **Dig Dis Sci**, v. 54, n. 9, p. 1892-900, Sep 2009. ISSN 1573-2568 (Electronic)
0163-2116 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19058004>>.

KANG, O. H. et al. Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. **Int J Mol Med**, v. 18, n. 5, p. 893-9, Nov 2006. ISSN 1107-3756 (Print)
1107-3756 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016619>>.

KEATING, R.; MCGARGILL, M. A. mTOR Regulation of Lymphoid Cells in Immunity to Pathogens. **Front Immunol**, v. 7, p. 180, 2016. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27242787> >.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 307-17, Jun 16 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677747> >.

KIM, K. S. et al. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. **Science**, v. 351, n. 6275, p. 858-63, Feb 19 2016. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26822607> >.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 12, n. 5, p. 319-30, Oct 2010. ISSN 1534-312X (Electronic) 1522-8037 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703838> >.

KORN, T. et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. **Semin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 362-71, Dec 2007. ISSN 1044-5323 (Print) 1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035554> >.

KOSTER, F.; GAFFAR, A.; JACKSON, T. M. Recovery of cellular immune competence during treatment of protein-calorie malnutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 34, n. 5, p. 887-91, May 1981. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6786071> >.

KUHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-74, Oct 22 1993. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402911> >.

LEV, R.; SPICER, S. S. Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at Low Ph. **J Histochem Cytochem**, v. 12, p. 309, Apr 1964. ISSN 0022-1554 (Print) 0022-1554 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14187344> >.

LI, F. et al. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1185-93, Nov 2011. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21773813>>.

LI, M. C.; HE, S. H. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 5, p. 620-5, Mar 1 2004. ISSN 1007-9327 (Print)
1007-9327 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991925>>.

LI, M. O. et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 99-146, 2006. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551245>>.

LOCHS, H. et al. Introductory to the ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Terminology, definitions and general topics. **Clin Nutr**, v. 25, n. 2, p. 180-6, Apr 2006. ISSN 0261-5614 (Print)
0261-5614 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697086>>.

LUDVIGSSON, J. F. et al. Elemental versus polymeric enteral nutrition in paediatric Crohn's disease: a multicentre randomized controlled trial. **Acta Paediatr**, v. 93, n. 3, p. 327-35, Mar 2004. ISSN 0803-5253 (Print)
0803-5253 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15124834>>.

LYNCH, C. J. Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies. **J Nutr**, v. 131, n. 3, p. 861S-865S, Mar 2001. ISSN 0022-3166 (Print)
0022-3166 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238775>>.

MACFARLANE, G. T.; ALLISON, C. Utilisation of protein by human gut bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 38, n. 1, p. 19-24, 1986. ISSN 0378-1097. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378109786900376>>.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 6, p. 478-85, Jun 2004. ISSN 1474-1733 (Print)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173836>>.

MAKKINK, C. A. et al. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. **Br J Nutr**, v. 72, n. 3, p. 353-68, Sep 1994. ISSN 0007-1145 (Print)
0007-1145 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7947652>>.

MARCAIS, A. et al. The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. **Nat Immunol**, v. 15, n. 8, p. 749-57, Aug 2014. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973821> >.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **Eur J Clin Nutr**, v. 57 Suppl 1, p. S66-9, Sep 2003. ISSN 0954-3007 (Print) 0954-3007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12947457> >.

MARTINI, F. H.; TIMMONS, M. J.; TALLITSCH, R. B. **Anatomia Humana**. Porto Alegre: 2009. ISBN ISBN 978-85-363-2029-8.

MATSUDA, C. et al. Therapeutic effect of a new immunosuppressive agent, everolimus, on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. **Clin Exp Immunol**, v. 148, n. 2, p. 348-59, May 2007. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437423> >.

MAZZINI, E. et al. Oral tolerance can be established via gap junction transfer of fed antigens from CX3CR1(+) macrophages to CD103(+) dendritic cells. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 248-61, Feb 20 2014. ISSN 1097-4180 (Electronic) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462723> >.

MCCAFFERTY, D. M. et al. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 1, p. G90-9, Jul 2000. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898750> >.

MCDOLE, J. R. et al. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 345-9, Mar 15 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22422267> >.

MCINTURFF, A. M. et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha. **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3118-25, Oct 11 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919032> >.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation

between symptoms and inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 6, p. G1328-38, Jun 2005. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637179> >.

MENEZES, J. S. et al. Immunological activities are modulated by enteral administration of an elemental diet in mice. **Clin Nutr**, v. 25, n. 4, p. 643-52, Aug 2006. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687195> >.

MENEZES, J. S. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **Int Immunol**, v. 15, n. 3, p. 447-55, Mar 2003. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618489> >.

MIDDLETON, S. J. et al. Long-chain triglycerides reduce the efficacy of enteral feeds in patients with active Crohn's disease. **Clin Nutr**, v. 14, n. 4, p. 229-36, Aug 1995. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843936> >.

MIJAC, D. D. et al. Nutritional status in patients with active inflammatory bowel disease: prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional assessment. **Eur J Intern Med**, v. 21, n. 4, p. 315-9, Aug 2010. ISSN 1879-0828 (Electronic) 0953-6205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603043> >.

MILLER, H. et al. Intestinal M cells: the fallible sentinels? **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 10, p. 1477-86, Mar 14 2007. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17461437> >.

MIZOGUCHI, A. Animal models of inflammatory bowel disease. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 105, p. 263-320, 2012. ISSN 1878-0814 (Electronic) 1877-1173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137435> >.

MORIARTY, K. J. et al. Relative nutritional value of whole protein, hydrolysed protein and free amino acids in man. **Gut**, v. 26, n. 7, p. 694-9, Jul 1985. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4018632> >.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 4, p. 331-41, Apr 2003. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669023>>.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 10, p. 667-85, Oct 2014. ISSN 1474-1741 (Electronic)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234148>>.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256-60, Jul 13 2007. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17569825>>.

MUCIDA, D. S. et al. Decreased nasal tolerance to allergic asthma in mice fed an amino acid-based protein-free diet. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1029, p. 361-5, Dec 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681782>>.

MURTHY, A. K. et al. Contribution of polymeric immunoglobulin receptor to regulation of intestinal inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 9, p. 1372-80, Sep 2006. ISSN 0815-9319 (Print)

0815-9319 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16911679>>.

NAKAMURA, A. et al. Role of the mTOR complex 1 pathway in the in vivo maintenance of the intestinal mucosa by oral intake of amino acids. **Geriatr Gerontol Int**, v. 12, n. 1, p. 131-9, Jan 2012. ISSN 1447-0594 (Electronic)

1447-0594 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21794051>>.

NAKAMURA, K. et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. **J Immunol**, v. 172, n. 2, p. 834-42, Jan 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707053>>.

NICHOLSON, J. P.; WOLMARANS, M. R.; PARK, G. R. The role of albumin in critical illness. **Br J Anaesth**, v. 85, n. 4, p. 599-610, Oct 2000. ISSN 0007-0912 (Print)

0007-0912 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11064620>>.

NICKLIN, P. et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 521-34, Feb 6 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203585>>.

O'MORAIN, C.; SEGAL, A. W.; LEVI, A. J. Elemental diet as primary treatment of acute Crohn's disease: a controlled trial. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 288, n. 6434, p. 1859-62, Jun 23 1984. ISSN 0267-0623 (Print)
0267-0623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6428577> >.

OCHI, T. et al. Diet-dependent, microbiota-independent regulation of IL-10-producing lamina propria macrophages in the small intestine. **Sci Rep**, v. 6, p. 27634, 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic)
2045-2322 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27302484>>.

OHTANI, M. et al. Cutting edge: mTORC1 in intestinal CD11c+ CD11b+ dendritic cells regulates intestinal homeostasis by promoting IL-10 production. **J Immunol**, v. 188, n. 10, p. 4736-40, May 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504639>>.

OIDA, T.; WEINER, H. L. TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15523, 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124798>>.

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 (Print)
0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688816> >.

PABST, O.; MOWAT, A. M. Oral tolerance to food protein. **Mucosal Immunol**, Feb 8 2012. ISSN 1935-3456 (Electronic)
1933-0219 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22318493>>.

PAUL, G.; KHARE, V.; GASCHÉ, C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. **Eur J Clin Invest**, v. 42, n. 1, p. 95-109, Jan 2012. ISSN 1365-2362 (Electronic)
0014-2972 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21631466>>.

PAULA-SILVA, J. et al. Effect of a protein-free diet in the development of food allergy and oral tolerance in BALB/c mice. **Br J Nutr**, v. 113, n. 6, p. 935-43, Mar 28 2015. ISSN 1475-2662 (Electronic)

0007-1145 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25759975> >.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 718617, 2012. ISSN 1110-7251 (Electronic) 1110-7243 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665990> >.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141-53, Mar 2014. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24566914> >.

POWELL, J. D. et al. Regulation of immune responses by mTOR. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 39-68, 2012. ISSN 1545-3278 (Electronic) 0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22136167> >.

PRAKASH, S. et al. **Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics**. *Biologics*. 5: 71-86 p. 2011.

PYZIK, M.; PICCIRILLO, C. A. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 2, p. 335-46, Aug 2007. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475784> >.

RAJENDRAN, N.; KUMAR, D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 12, p. 1442-8, Mar 28 2010. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20333783> >.

RAMMENSEE, H. G. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. **Curr Opin Immunol**, v. 7, n. 1, p. 85-96, Feb 1995. ISSN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7772286> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nat Immunol**, v. 2, n. 4, p. 361-7, Apr 2001. ISSN 1529-2908 (Print) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276208> >.

REYNOLDS, J. M.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 6, p. 413-23, Dec 2010. ISSN 1879-0305 (Electronic) 1359-6101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074482> >.

RIGAUD, D. et al. Controlled trial comparing two types of enteral nutrition in treatment of active Crohn's disease: elemental versus polymeric diet. **Gut**, v. 32, n. 12, p. 1492-7, Dec 1991. ISSN 0017-5749 (Print) 0017-5749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1773955> >.

RIMOLDI, M.; RESCIGNO, M. Uptake and presentation of orally administered antigens. **Vaccine**, v. 23, n. 15, p. 1793-6, Mar 7 2005. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734043> >.

ROBINSON, M. K.; ZIEGLER, T. R.; WILMORE, D. W. Overview of intestinal adaptation and its stimulation. **Eur J Pediatr Surg**, v. 9, n. 4, p. 200-6, Aug 1999. ISSN 0939-7248 (Print) 0939-7248 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10532257> >.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 313-23, May 2009. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343057> >.

_____. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 27, p. 12204-9, Jul 6 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20566854> >.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878-88, May 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296109> >.

SHIGA, H. et al. Changes of faecal microbiota in patients with Crohn's disease treated with an elemental diet and total parenteral nutrition. **Dig Liver Dis**, May 22 2012. ISSN 1878-3562 (Electronic) 1590-8658 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22622202> >.

SILVA, J. P. **Efeito das proteínas da dieta no desenvolvimento de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos BALB/c**. 2010. 101 (Mestrado). Bioquímica e Imunologia - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

SMITH, D. W.; NAGLER-ANDERSON, C. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. **J Immunol**, v. 174, n. 7, p. 3851-7, Apr 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778338> >.

SMITH, E. A.; MACFARLANE, G. T. Enumeration of amino acid fermenting bacteria in the human large intestine: effects of pH and starch on peptide metabolism and dissimilation of amino acids. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 25, n. 4, p. 355-368, 1998. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00487.x> >.

SNYDERMAN, S. E. et al. The plasma aminogram. I. Influence of the level of protein intake and a comparison of whole protein and amino acid diets. **Pediatr Res**, v. 2, n. 2, p. 131-44, Mar 1968. ISSN 0031-3998 (Print) 0031-3998 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5659211> >.

STROBEL, S.; MOWAT, A. M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. **Immunol Today**, v. 19, n. 4, p. 173-81, Apr 1998. ISSN 0167-5699 (Print) 0167-5699 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9577094> >.

STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 514-21, Mar 2007. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332878> >.

STRUGNELL, R. A.; WIJBURG, O. L. The role of secretory antibodies in infection immunity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 656-67, Sep 2010. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694027> >.

SUTHERLAND, D. B.; FAGARASAN, S. IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. **Curr Opin Immunol**, Apr 13 2012. ISSN 1879-0372 (Electronic)

0952-7915 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503962>>.

TANOUE, T.; ATARASHI, K.; HONDA, K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 5, p. 295-309, May 2016. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27087661>>.

TAYLOR, A. W. Review of the activation of TGF-beta in immunity. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 1, p. 29-33, Jan 2009. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818372>>.

TERADA, T. et al. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. **Am J Physiol**, v. 276, n. 6 Pt 1, p. G1435-41, Jun 1999. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362647>>.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H. et al. Autoimmunity: from physiology to pathology. Natural antibodies, mucosal immunity and development of B cell repertoire. **Folia Biol (Praha)**, v. 38, n. 3-4, p. 202-15, 1992. ISSN 0015-5500 (Print)
0015-5500 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1426416>>.

UHLIG, H. H.; POWRIE, F. Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 8, p. 2021-6, Aug 2009. ISSN 1521-4141 (Electronic)
0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672896>>.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **J Allergy Clin Immunol**, v. 60, n. 2, p. 110-5, Aug 1977. ISSN 0091-6749 (Print)
0091-6749 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874210>>.

VERMA, S. et al. Polymeric versus elemental diet as primary treatment in active Crohn's disease: a randomized, double-blind trial. **Am J Gastroenterol**, v. 95, n. 3, p. 735-9, Mar 2000. ISSN 0002-9270 (Print)
0002-9270 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10710067>>.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol**, v. 46, n. 1, p. 20-5, Jan-Mar 2009. ISSN 1678-4219 (Electronic)

0004-2803 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466305> >.

WANG, L. et al. IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 3194-201, Sep 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960348> >.

VEENBERGEN, S. and SAMSON, J.N. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets. **Curr Opin Immunol**. 2012 Jun;24(3):269-76.

WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 241, n. 1, p. 241-59, May 2011. ISSN 1600-065X (Electronic)
0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21488901> >.

WILSON, A.; REYES, E.; OFMAN, J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. **Am J Med**, v. 116 Suppl 7A, p. 44S-49S, Apr 5 2004. ISSN 0002-9343 (Print)
0002-9343 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050885> >.

WOODWARD, B. Protein, calories, and immune defenses. **Nutr Rev**, v. 56, n. 1 Pt 2, p. S84-92, Jan 1998. ISSN 0029-6643 (Print)
0029-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9481128> >.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, May 2009. ISSN 1438-2199 (Electronic)
0939-4451 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19301095> >.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-84, Feb 10 2006. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469695>
[http://ac.els-cdn.com/S0092867406001085/1-s2.0-S0092867406001085-main.pdf? tid=985347fc-8d99-11e3-8e54-0000aab0f6c&acdnat=1391517837_57e5f2784ef0f148583ea3f67240c867](http://ac.els-cdn.com/S0092867406001085/1-s2.0-S0092867406001085-main.pdf?tid=985347fc-8d99-11e3-8e54-0000aab0f6c&acdnat=1391517837_57e5f2784ef0f148583ea3f67240c867) >.

YAGI, H. et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunol**, v. 16, n. 11, p. 1643-56, Nov 2004. ISSN 0953-8178 (Print)
0953-8178 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466453> >.

YAMAMOTO, T.; NAKAHIGASHI, M.; SANIABADI, A. R. Review article: diet and inflammatory bowel disease--epidemiology and treatment. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 30, n. 2, p. 99-112, Jul 1 2009. ISSN 1365-2036 (Electronic) 0269-2813 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19438426> >.

YANG, H. et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 217-23, May 9 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636326> >.

ZENG, H. et al. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 485-90, Jul 25 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812589> >.

ZHANG, L. et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 orchestrates invariant NKT cell differentiation and effector function. **J Immunol**, v. 193, n. 4, p. 1759-65, Aug 15 2014. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25015820> >.

ZHOU, Y. et al. TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1631, 2015. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25654764> >.

ZIMMER, K. P. et al. Modulation of antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes. **Gastroenterology**, v. 118, n. 1, p. 128-37, Jan 2000. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611161> >.

Table 1. Composition of the control diet (Casein) and experimental diet containing free amino acid (AA diet)

Components (g/100g)	Control diet (Casein)	Experimental diet (AA)
Casein	17,9	-
Free amino acid	-	17,9
Corn starch	39,75	39,75
Dextrinized corn starch	13,2	13,2
Sucrose	10,0	10,0
Soybean oil	7,0	7,0
Cellulose	5,0	5,0
Mineral mix	3,5	3,5
Vitamin mix	1,0	1,0
Supplementation of L-cystine	0,3	0,3
Choline bitartrate	0,25	0,25
Tert-butylhydroquinone	0,0014	0,0014

The composition is presented by g/100g and is in accordance with AIN 93G diets. Total energy 376,7Kcal/100g; 16,7% as fat; 64% as carbohydrates and 19,3% as nitrogen source (casein or amino acid).

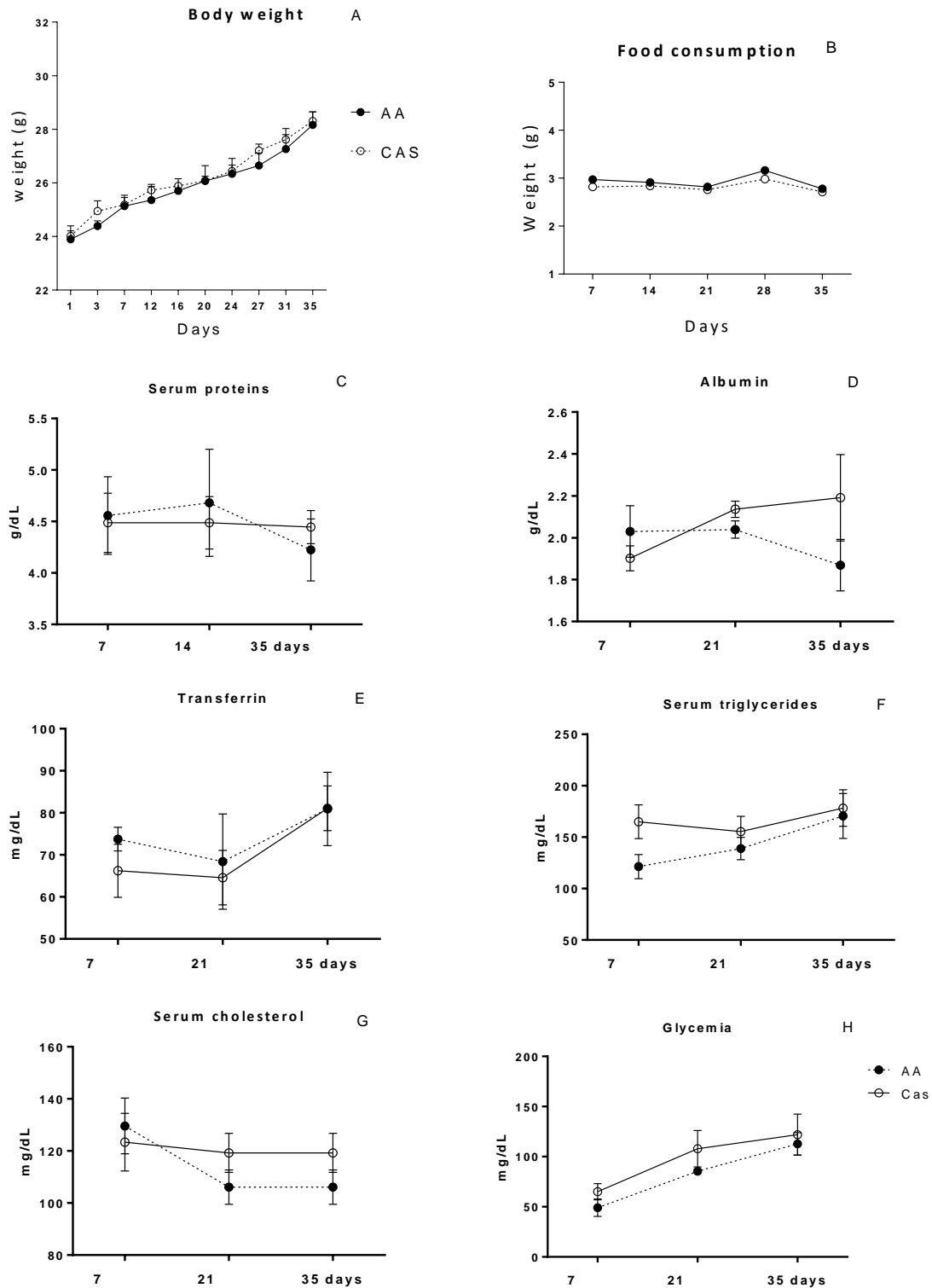


Figure 123. Body weight, food consumption and biochemical exams.

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were fed with casein or amino acid diet during 5 weeks. Growth curve (A) and food consumption (B) were evaluated during the experimental protocol. The biochemical exams total serum proteins (C), albumin (D), transferrin (E), serum triglycerides (F), serum cholesterol (G) and glycemia (H) were evaluated at the end of first, third and fifth week. N= 5 to 10. Statistic analysis was performed between casein and amino acid group at the end of each experimental time. Statistic test: teste t de Student. P<0,05.

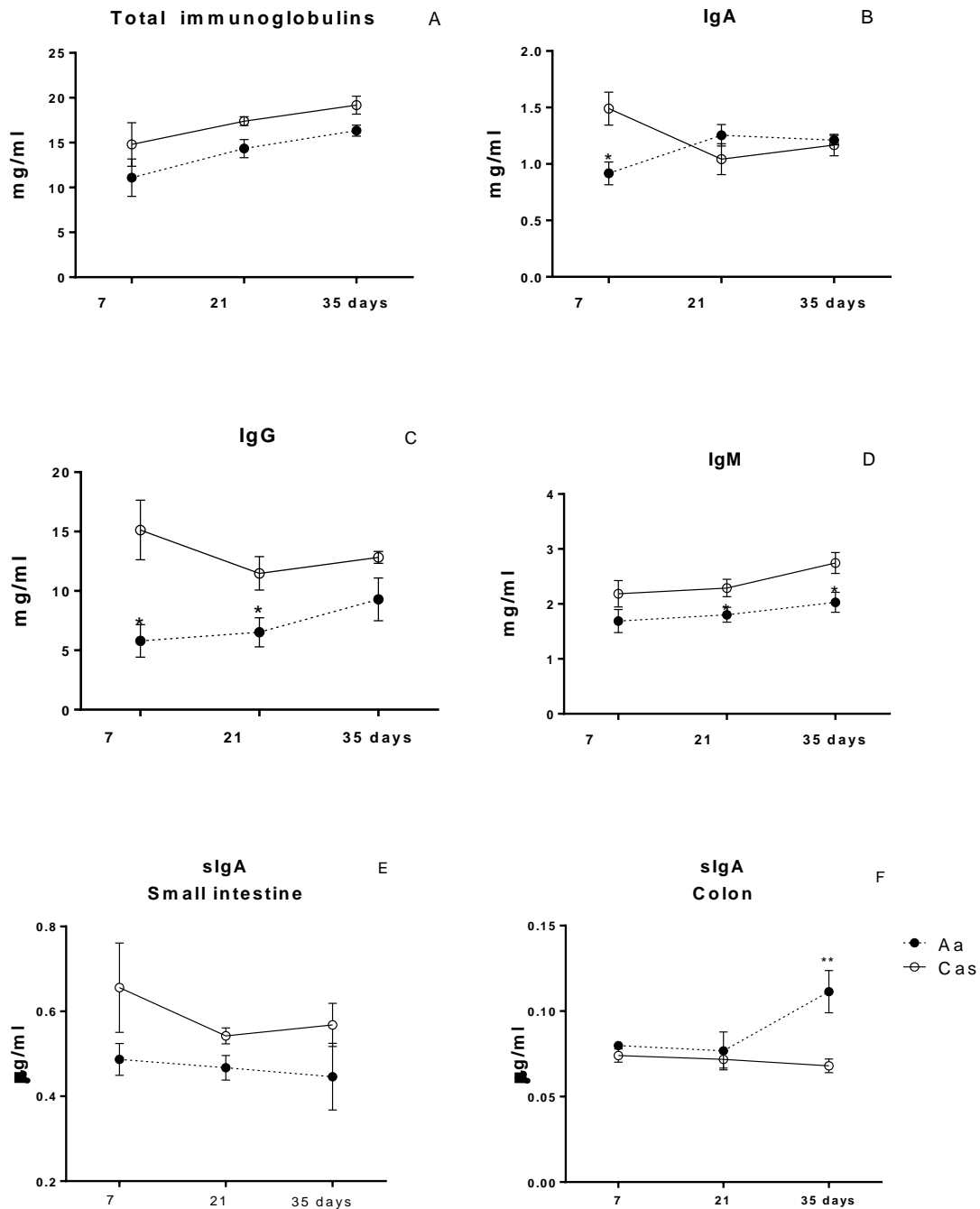


Figure 24. Levels of immunoglobulins

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were fed with casein or amino acid diet during 5 weeks. Levels of total serum immunoglobulins (A), seric IgA (B), seric IgG (C), seric IgM (D), sIgA in the small intestine (E) and sIgA in the colon (F) were measured at the end of 1, 3 and 5 weeks by ELISA. N= 5. The statistic analysis was performed between casein and amino acid group at the end of each experimental time. Statistical test: teste t de Student. P<0,05

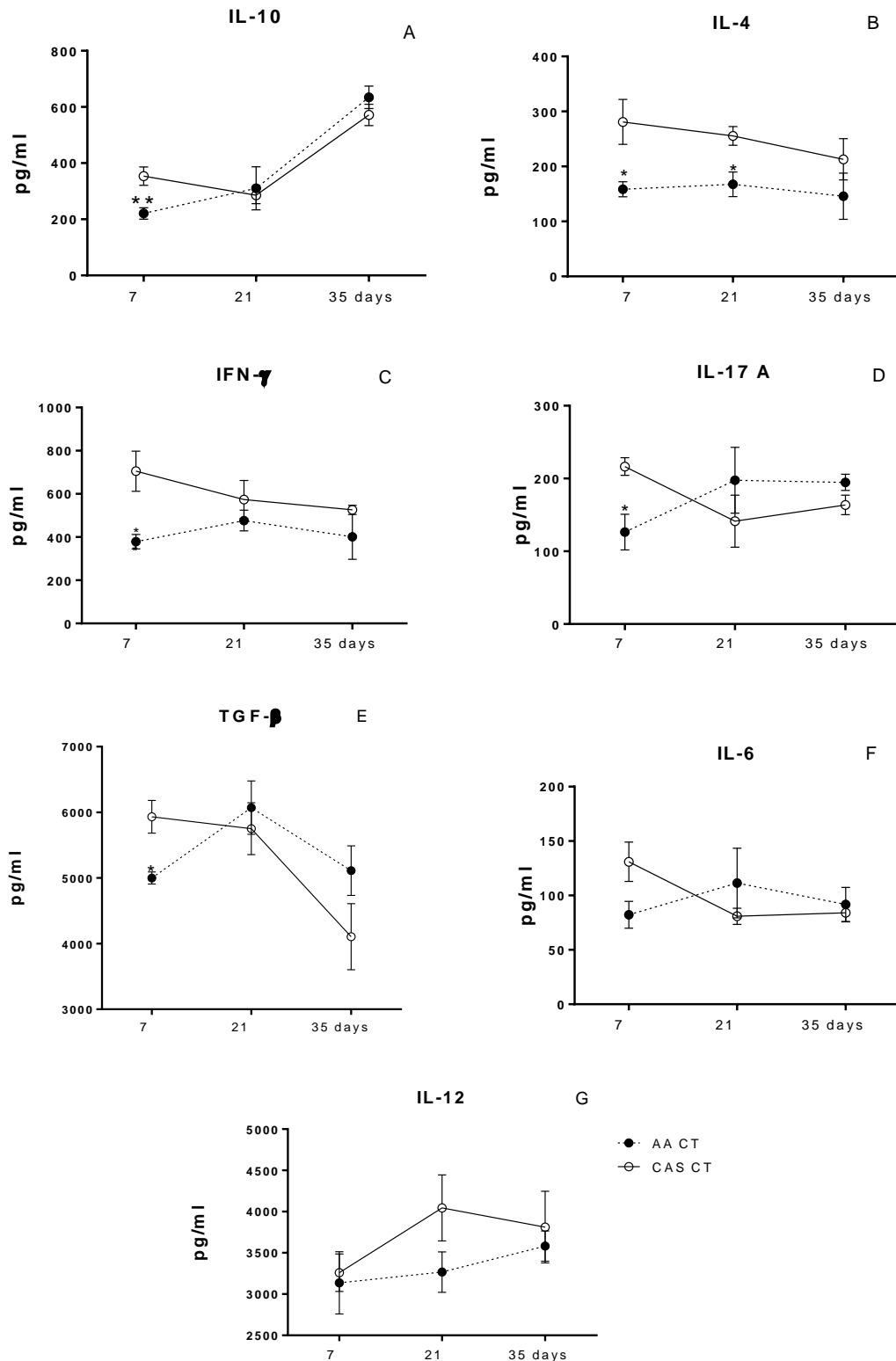


Figure 25. Cytokines levels in the spleen

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were fed with casein or amino acid diet during 5 weeks. Levels of IL-10 (A), IL-4 (B), IFN- γ (C), IL-17A (D), TGF- β (E), IL-6 (F) and IL-12 (G) were measured in the spleen by ELISA after 1, 3 and 5 weeks of diet. N=4-7. Statistic analysis was performed between casein and amino acid group at the end of each experimental time. Statistic test: teste t de Student. P<0,05.

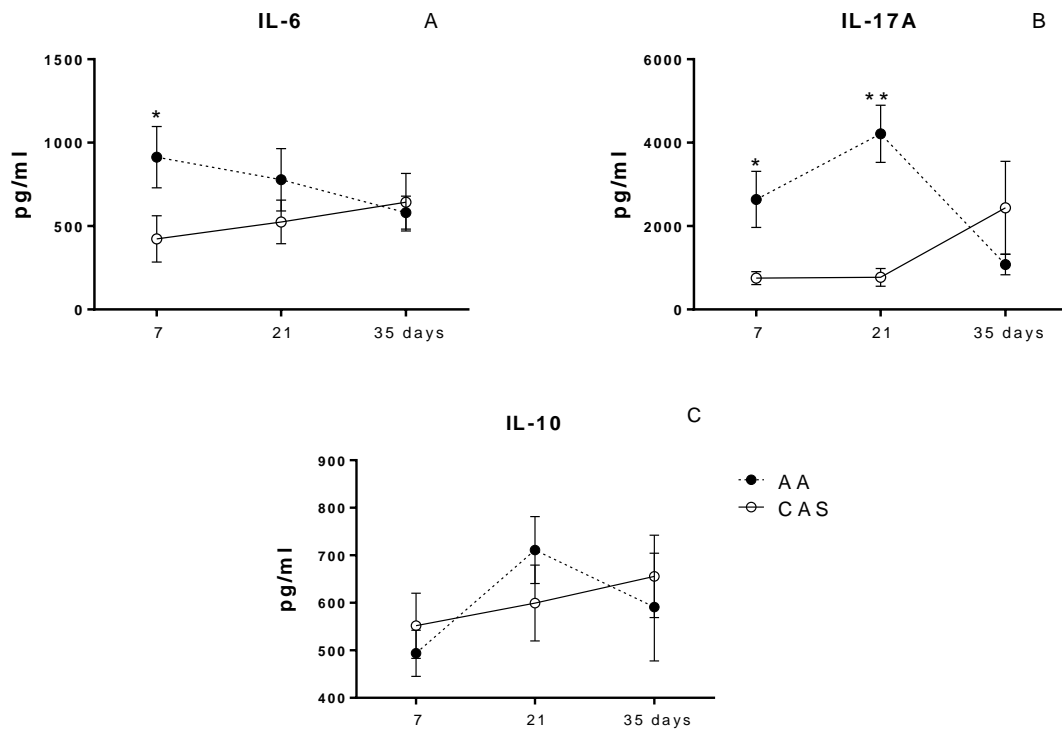


Figure 26. Cytokines levels in the small intestine

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were fed with casein or amino acid diet during 5 weeks. Levels of IL-6 (A), IL-17A (B) and IL-10 (C) were measured in the spleen by ELISA after 1, 3 and 5 weeks of diet. N=4-7. Statistic analysis was performed between casein and amino acid group at the end of each experimental time. Statistic test: teste t de Student. $P < 0,05$.

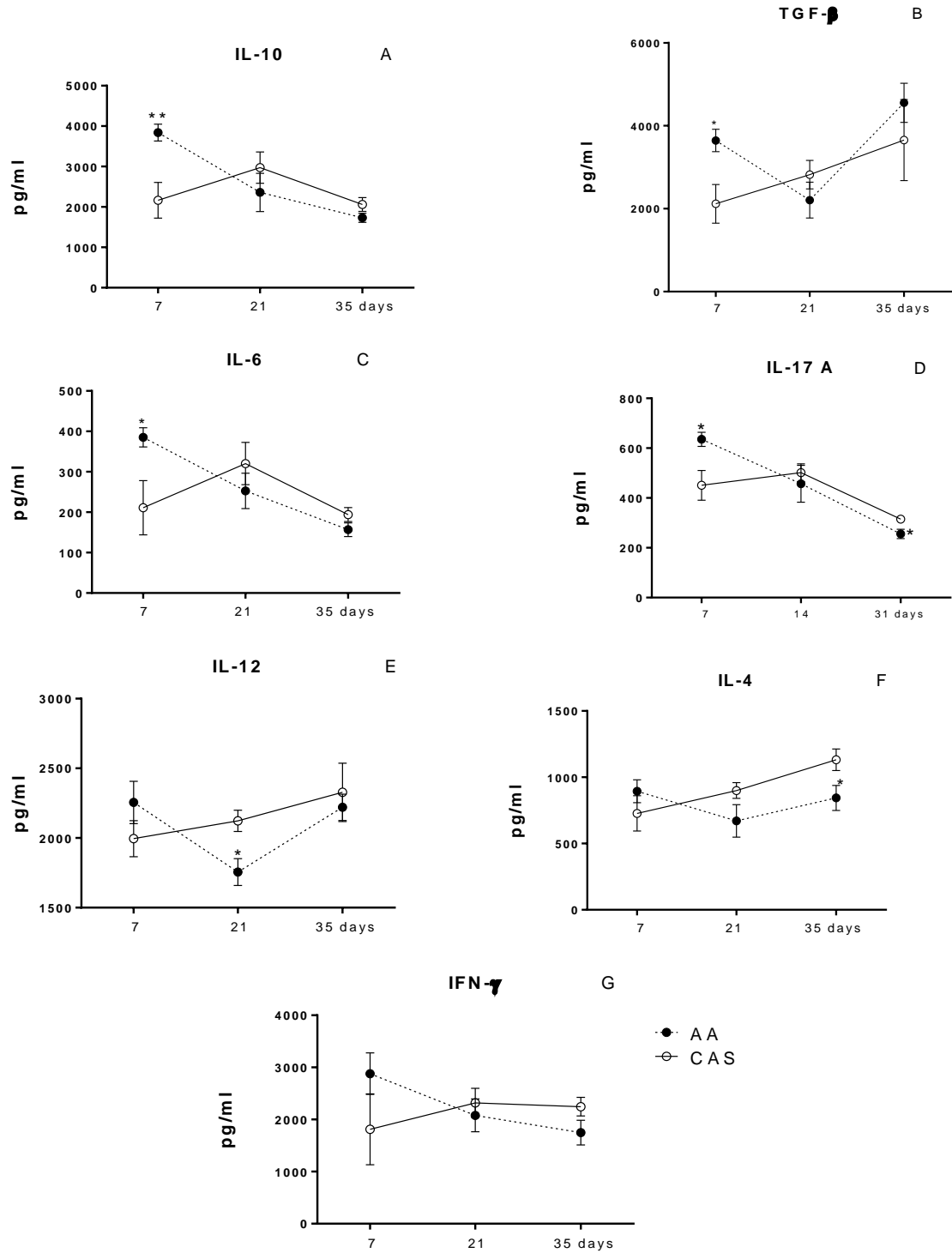


Figura 27. Cytokines levels in the colon

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were fed with casein or amino acid diet during 5 weeks. The levels of IL-10 (A), TGF-β (B), IL-6 (C), IL-17A (D), IL-12 (E), IL-4 (F) and IFN-γ (G) were measured in the colon by ELISA after 1, 3 and 5 weeks of diet. N=4-7. Statistic analysis was performed between casein and amino acid group at the end of each experimental time. Statistic test: teste t de Student. P<0,05.

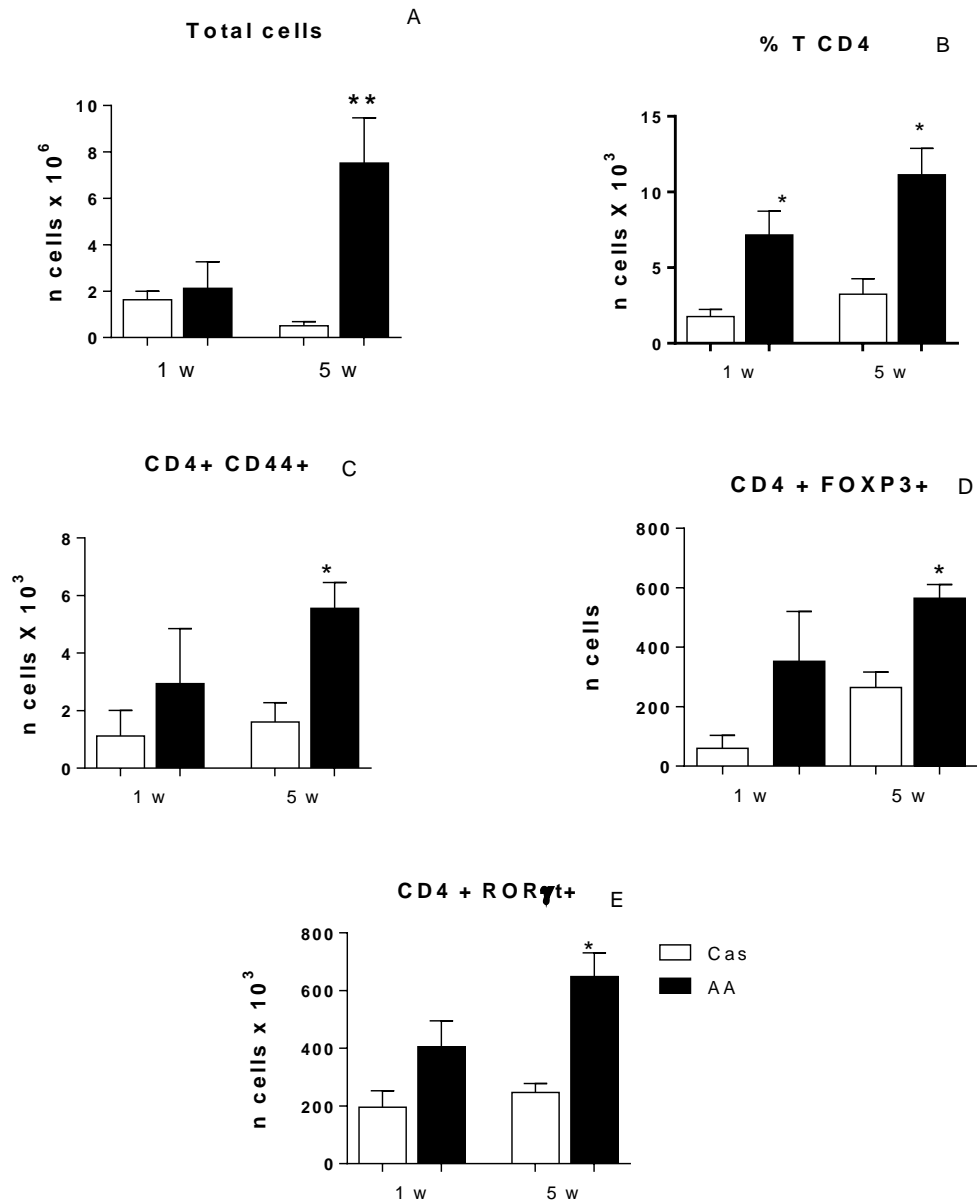


Figura 28. Profile cells in the lamina propria of small intestine

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were fed with casein or amino acid diet during 5 weeks. The profile of total cells (A), lymphocytes T CD4+ (B), activated cells TCD4+CD44+ (C), regulatory T cells CD4+FoXP3+ (D) and CD4+RORγt+ (E) were evaluated by flow cytometry after 1, 3 and 5 weeks of diets. Statistic analysis was performed between casein and amino acid group at the end of each experimental time. N=3 to 5. Statistic test: teste t de Student. P<0,05.

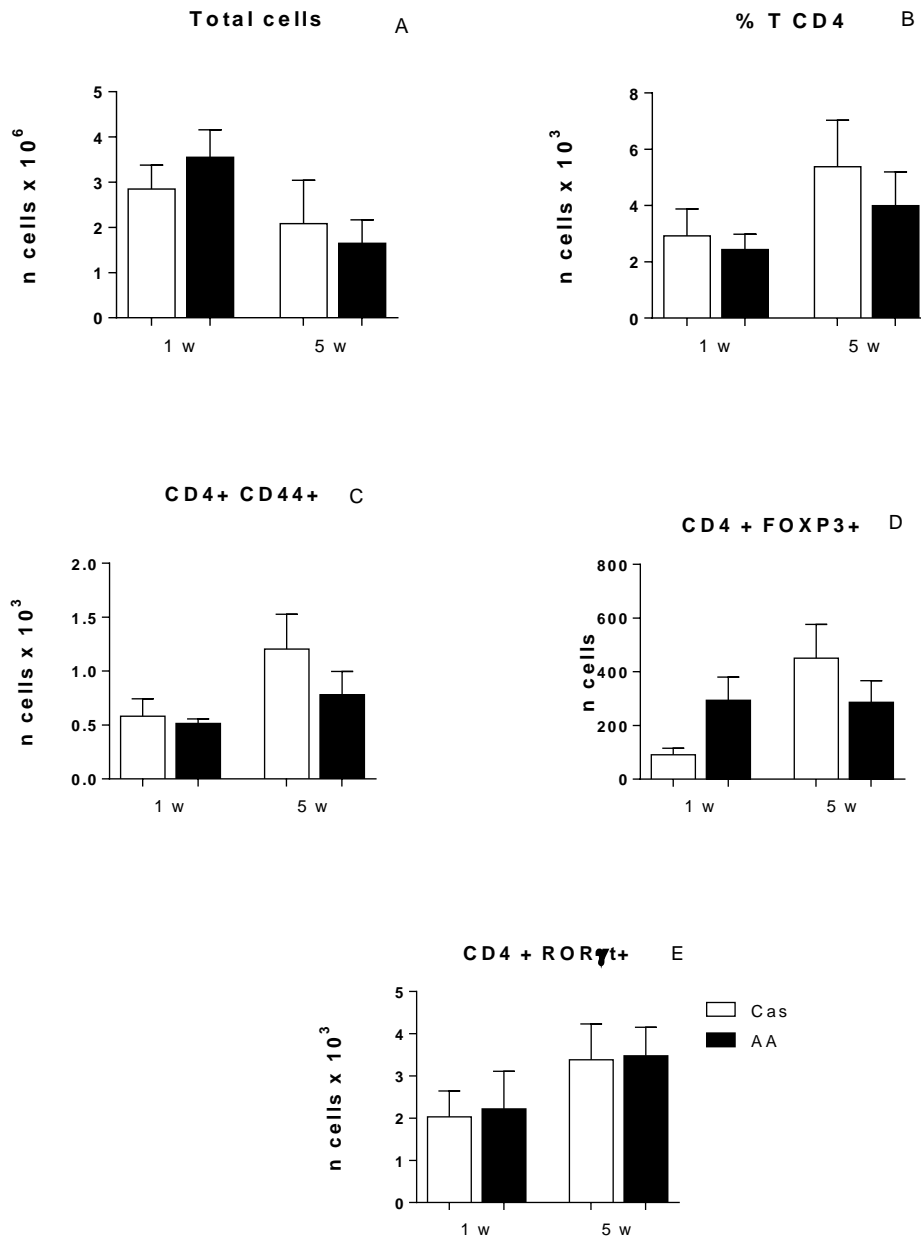
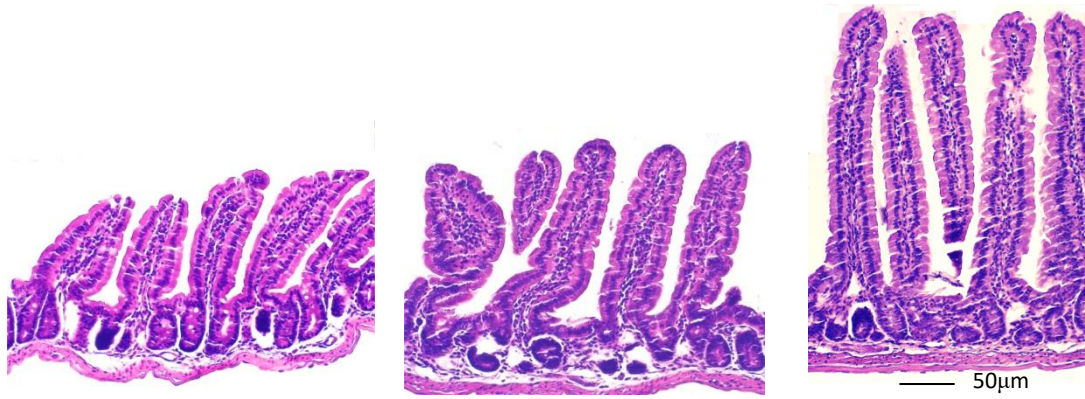


Figura 29. Profile cells in the lamina propria of colon

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were fed with casein or amino acid diet during 5 weeks. The profile of total cells (A), lymphocytes T CD4+ (B), activated cells TCD4+CD44+ (C), regulatory T cells CD4+Foxp3+ (D) and CD4+RORγt+ (E) were evaluated by flow cytometry after 1, 3 and 5 weeks of diets. Statistic analysis was performed between casein and amino acid group at the end of each experimental time. N=3 to 5. Statistic test: teste t de Student. P<0,05.



A) CAS

B) AA 1 week

C) AA 5 week

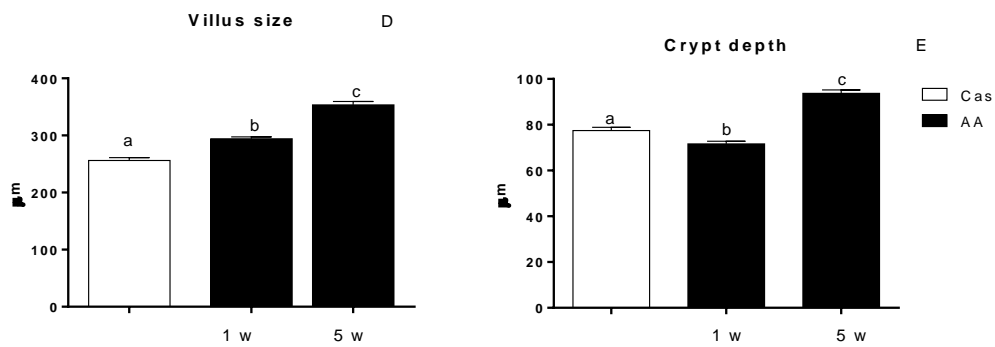


Figura 30. Histological analysis of the small intestine

Representative images of casein (A) and amino acid group after 1 week (B) and 5 weeks of diet (C). To perform morphometric analysis villus size (D) and crypt depth (E) was considered at least 3 mice per group. Analysis was performed with magnification of 10x. Statistic test. ANOVA. $P < 0,05$.

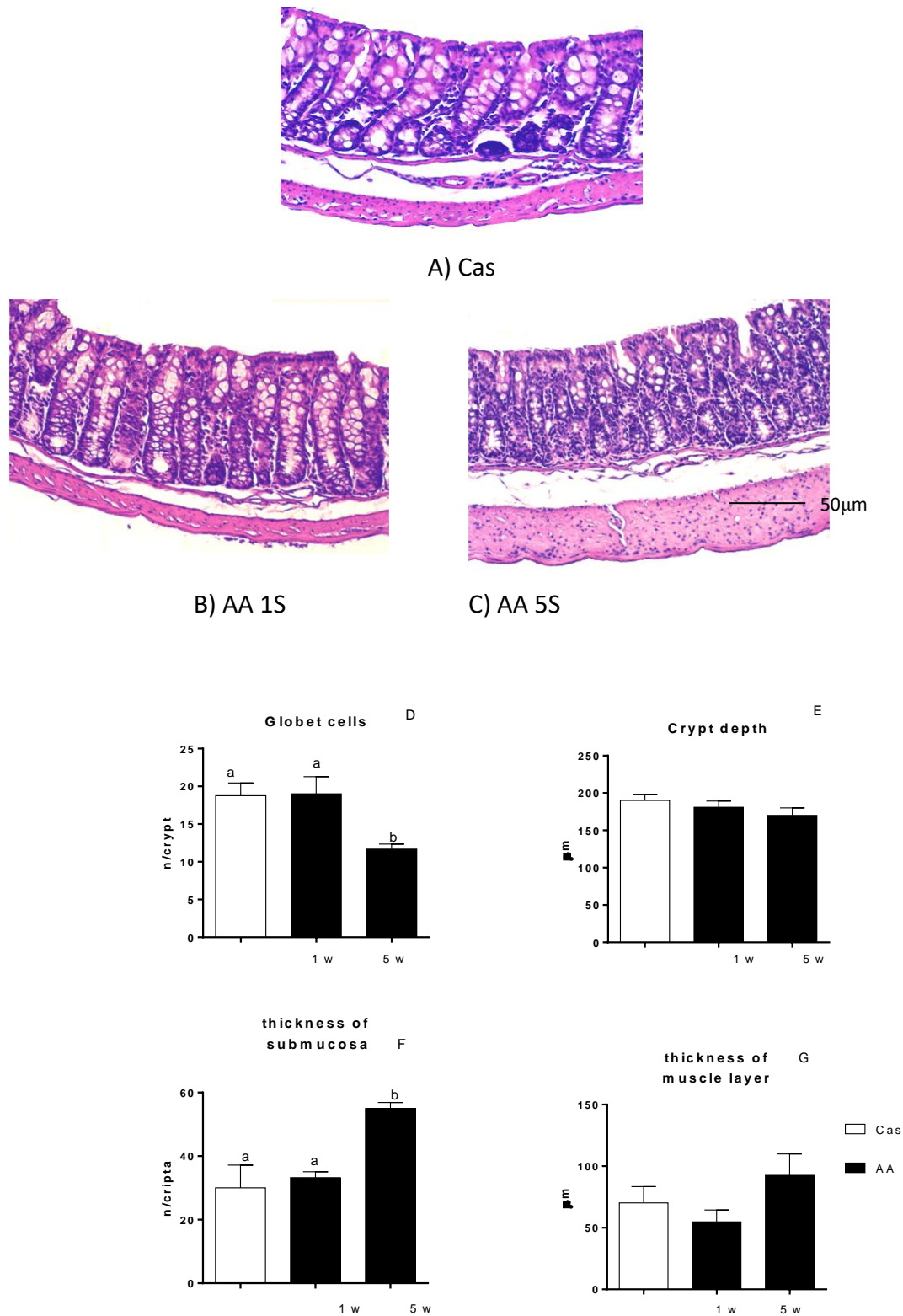


Figura 31. Histological analysis of the small intestine

Representative images of casein (A) and amino acid group after 1 week (B) and 5 weeks of diet (C). To perform analysis of goblet cells number (D) crypt depth (E), thickness of submucosa (F) and thickness of muscle layer (G) was considered at least 3 mice per group. The analysis were performed with increase of 40x. Statistic test. ANOVA. $P < 0,05$.

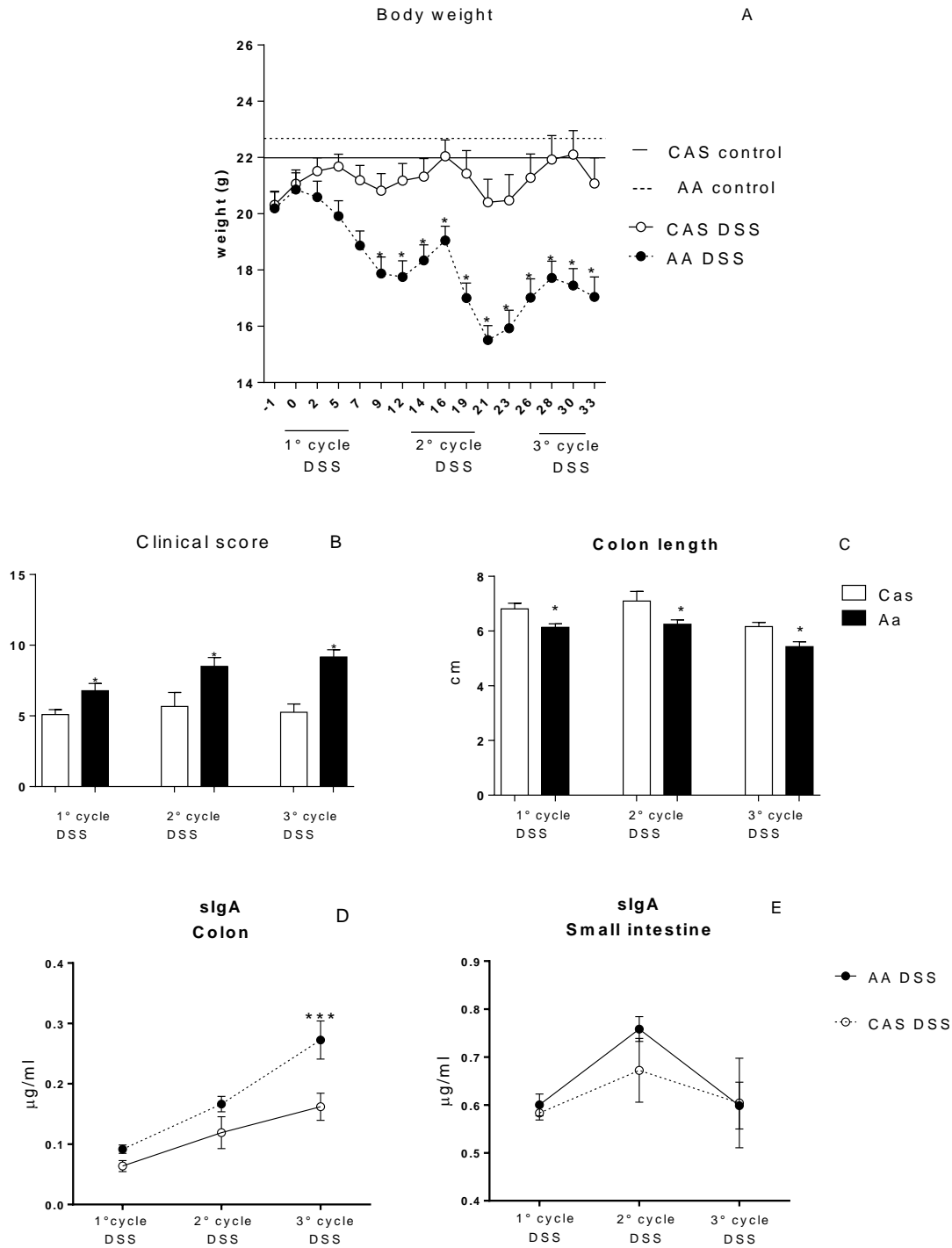


Figure 32. Body weight, clinical parameters and sIgA levels during intestinal inflammation
 C57BL/6 mice at 7-8 weeks were introduced at experimental diet or control diet. All mice were kept on these diets during the period of colitis induction. Colitis was induced by three cycles of administration of 1% (w/vol) DSS in drinking water for 7 days, alternating with periods of recovery of 7 days. The control group received only water. A) Weight loss during colitis. B) Clinical score of groups with colitis induced by DSS. Clinical assessment of the colitis was performed using a scoring system, which includes loss of body weight, diarrhea and the presence of blood in the stools. C) Colon length. sIgA in the colon (D) and small intestine (E) were measured at the end of 1, 3 and 5 weeks by ELISA. N=5-12. Statistic test: teste t de Student. P<0,05.

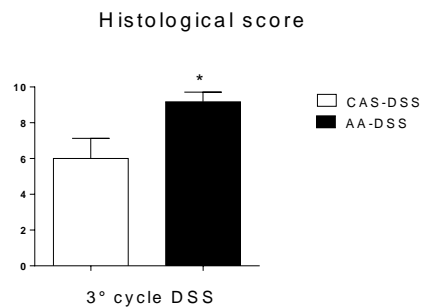
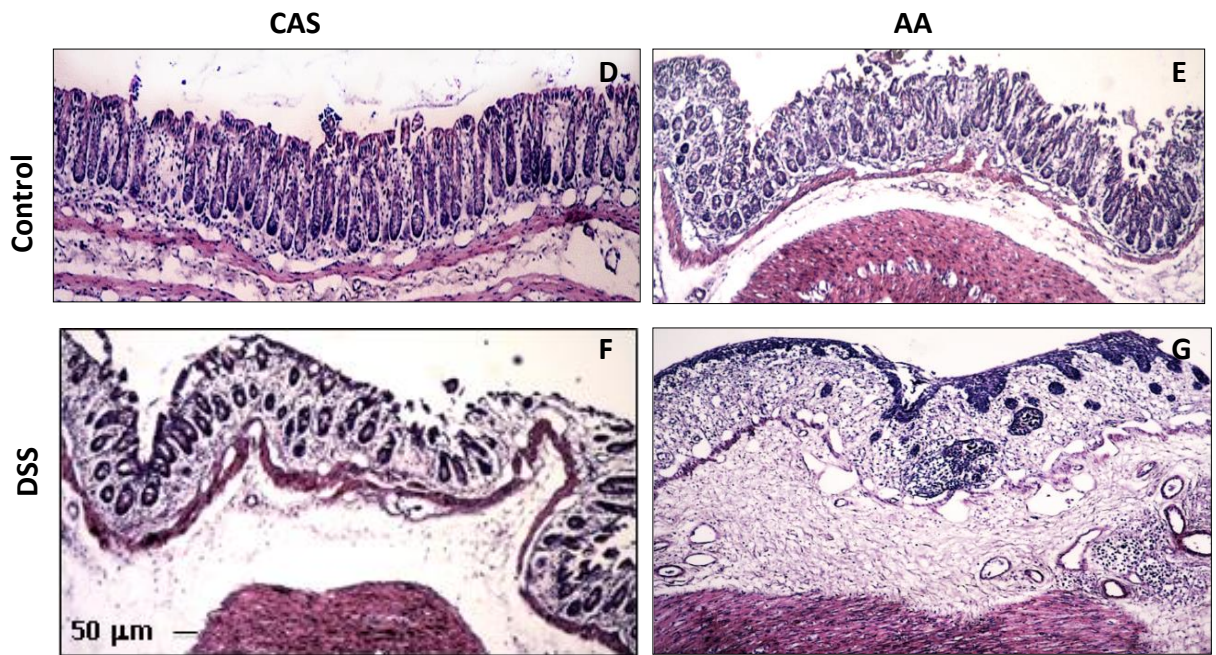


Figure 33. Histologic evaluation of intestinal inflammation

C57BL/6 mice at 7-8 weeks were introduced to experimental diet or control diet. All mice were kept on these diets during the period of colitis induction. Colitis was induced by three cycles of administration of 1% (w/vol) DSS in drinking water for 7 days, alternating with periods of recovery of 7 days. The control group received only water. The histological analysis was performed at the end of third cycle of DSS. N=6. Statistic test: teste t de Student. P<0,05.

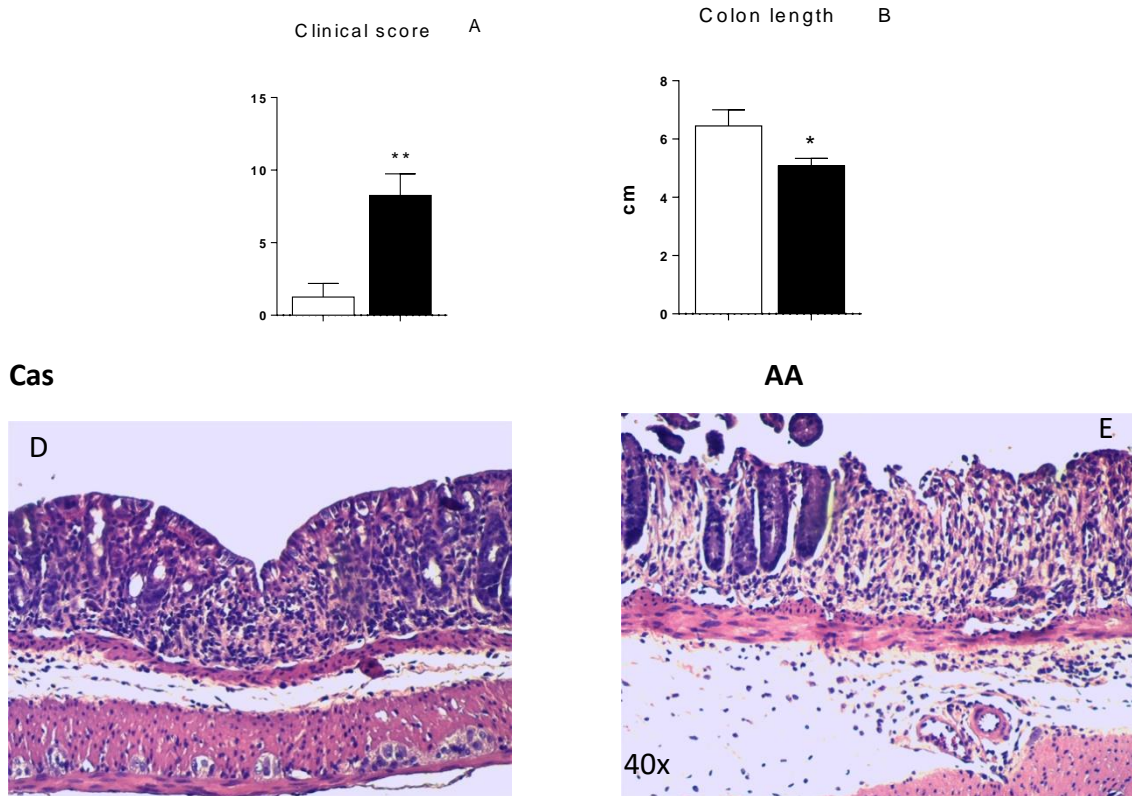


Figure 34. Clinical and histologic evaluation of intestinal inflammation

C57BL/6 mice at 7-8 weeks received casein or amino acid diet during seven days. After this time, the experimental diets were replaced by commercial feed and then the colitis was induced by DSS consumption at 1% during seven days. During colitis induction, the mice received commercial feed. A) Clinical score of groups with colitis induced by DSS. Clinical assessment of the colitis was performed using a scoring system, which includes loss of body weight, diarrhea and the presence of blood in the stools. B) Colon length. C) Histological analysis. Representative images of casein (D) and amino acid group (E). Statistic test: teste t de Student. $P < 0,05$.