

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**

**JAQUELINE MARQUES SANTOS**

**INFLUÊNCIA DE DIETA DESBALANCEADA HIPOPROTEICA NA  
IMUNIDADE TECIDO-ESPECÍFICA DA MUCOSA INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**

**JAQUELINE MARQUES SANTOS**

**INFLUÊNCIA DE DIETA DESBALANCEADA HIPOPROTEICA NA  
IMUNIDADE TECIDO-ESPECÍFICA DA MUCOSA INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Morais da Fonseca

Versão original

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marques Santos, Jaqueline  
Influência de dieta desbalanceada hipoproteica  
na imunidade tecido-específica da mucosa intestinal  
/ Jaqueline Marques Santos; orientador Denise  
Morais da Fonseca. -- São Paulo, 2020.  
112 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Dieta hipoproteica . 2. Mucosa intestinal. 3.  
Infecção. 4. Microbiota. 5. Tolerância oral. I.  
Morais da Fonseca, Denise, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: Jaqueline Marques Santos

Título da Dissertação: **Influência de dieta desbalanceada hipoproteica na imunidade tecido-específica da mucosa intestinal**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Morais da Fonseca

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Tese de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou a candidata:

**Aprovada**

**Reprovada**

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Cicatriz Imunológica' pós-infecção intestinal aguda e desenvolvimento de desordens metabólicas: estudo das interações entre a microbiota e sistema imunológico do mesentério*", registrado sob o protocolo nº **49/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/06/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Denise Moraes da Fonseca**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Ricardo Wesley Alberca Custódio (Pós-graduando), Momtchilo Russo (Pesquisador colaborador), Niels Olsen Saraiva Câmara (Pesquisador colaborador), Fernanda Peixoto Barbosa Nunes (Pesquisador colaborador), Eliane Aparecida Gomes de Mello Nascimento (Especialista em laboratório)*

Após o final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Impact of infection-induced immunological scarring on the long-term host metabolic homeostasis*", protocol nº **49/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **6/14/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

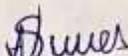
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Denise Moraes da Fonseca**

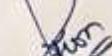
- Team members: *Ricardo Wesley Alberca Custódio (Graduate Student), Momtchilo Russo (Collaborator Researcher), Niels Olsen Saraiva Câmara (Collaborator Researcher), Fernanda Peixoto Barbosa Nunes (Collaborator Researcher), Eliane Aparecida Gomes de Mello Nascimento (Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	CS7BL/6	Fêmea/female	4-6 semanas/weeks	1538

São Paulo, 16 de junho de 2016.

  
Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador CEUA-ICB/USP

  
Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Vice-secretário CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP – Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.2.2018

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **49/2016/CEUA**, válido até 14/06/2020, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Denise Moraes da Fonseca**, do Departamento de **Imunologia**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Jaqueline Marques Santos** ao Projeto de Pesquisa "*Cicatriz Imunológica' pós-infecção intestinal aguda e desenvolvimento de desordens metabólicas: estudo das interações entre a microbiota e sistema imunológico do mesentério*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 02 de fevereiro de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

*Que esse trabalho glorifique ao meu Deus,  
autor e consumidor da minha fé.  
Dedico também aos meus pais,  
João Moura e Orenildes Moreira,  
pelo amor, proteção e dedicação,  
e a cada uma das pessoas amadas  
que acompanham a minha caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, a minha rocha e segurança, por toda sabedoria e graça que vem do alto, e por me fortalecer nos momentos de dificuldade.

Aos meus amados pais, **João Moura e Orenildes Moreira**, e **irmãos**, por todo carinho, compreensão, apoio emocional e financeiro durante esse período. Vocês são o meu alicerce.

Ao meu companheiro de todas as horas, **Anderson Antunes**, por sempre estar ao meu lado, e por tornar a caminhada bem mais prazerosa.

À minha amiga, **Thalita Paranhos**, por acreditar em mim e me incentivar a perseguir os meus sonhos.

À minha orientadora, **Dra. Denise Morais da Fonseca**, pela oportunidade e apoio durante o desenvolvimento de todo o projeto. Pelo companheirismo e paciência em todos os experimentos. E sobretudo, pelos ensinamentos, me possibilitando crescer profissionalmente.

Às antigas companheiras (amigas) de laboratório, **Dra. Marcela Davoli e Ma. Mirian Krystel de Siqueira**, por transformarem o laboratório em um lar, com todo companheirismo, generosidade, alegria, e por todos os ensinamentos, desde as técnicas básicas até as mais complexas.

Ao grande time (como diria o Caio) do **Laboratório de Imunologia de Mucosas**, principalmente às alunas **Bela. Bárbara Pizzolante, Ma. Marina Ayupe**, por estarem sempre tão presentes, no meu trabalho e na minha vida, mostrando que o laboratório é muito mais que um lugar onde se faz e discute ciência; e a **Bela. Luísa Menezes Silva** (Lulita), que esteve comigo desde o início da caminhada, compartilhando momentos felizes e tristes, e ao **Me. Caio Loureiro**, por todo auxílio nos experimentos, análises e pelo companheirismo diário.

Também agradeço aos alunos, **Bernardo de Castro Oliveira, Maria Tereza Martinez e Leonardo Mandu**. Foi um prazer conviver com vocês e espero que essa paixão por novas descobertas nunca se apague.

Agradeço imensamente o auxílio do **Dr. Walter Miguel Turato** nas análises dos tecidos ósseo e adiposo periférico. E por sua disponibilidade e simpatia.

Ao **Prof. Dr. Momtchilo Russo, Dr. Ricardo Alberca Custódio, e Bela. Eliane Gomes** pela gentileza em nos permitir usar seu laboratório e pelo apoio científico e técnico durante os experimentos.

Ao **Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, e a Ma. Josiani Betim** pelos momentos científicos, por toda a atenção e disponibilidade e também por ter me permitido usar o seu laboratório como uma segunda “casa”.

Aos meus queridos amigos do andar superior, **Bruna, Débora, Paulo, Gislane e Joaquim**, por todo companheirismo nas disciplinas, trabalhos e discussões. Pessoas encantadoras, capazes de arrancar as maiores gargalhadas e de trazer sol para os momentos mais chuvosos. Sempre que eu precisar citar as maravilhas do convívio na pós-graduação, o nome de vocês estará lá.

Aos baianos da microbiologia e parasitologia, **Alexia, Bianca, Naty, Lennon e Samuel**. Mais que colegas da pós-graduação, amigos, companheiros, inspirações que carrego desde a graduação. Os biomédicos que ensinaram a enfermeira a se apaixonar pela pesquisa.

Aos amigos, irmãos em Cristo, e familiares de perto e de longe, que se fazem presentes por meio de orações, conselhos e que sempre estão tão dispostos a ouvir.

Agradeço também à equipe do **CEFAP**, pelo auxílio nos experimentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Imunologia.

Aos colegas de pós-graduação pelo convívio e pela troca de experiências e aprendizados.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Morais da Fonseca, no Laboratório de Imunologia de Mucosas (LabIM), no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro dos processos nº 2015/25364-0 e 2018/00458-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*Grandes são as obras do Senhor, dignas de estudo para quem as ama.*

*Salmos 111.2*

## RESUMO

SANTOS, J. M. **Influência de dieta desbalanceada hipoproteica na imunidade tecido-específica da mucosa intestinal**. 2020. 112p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A manutenção da homeostase nos tecidos de mucosa requer a presença de uma rede de mecanismos imunológicos tecido-específicos que possuem a capacidade de manter a tolerância a antígenos inócuos ambientais e, ao mesmo tempo, induzir respostas efetoras eficientes para prevenir a invasão por patógenos. No intestino, em particular, diversos elementos mantêm interações bidimensionais para a manutenção destas respostas imunes homeostáticas tecido-específicas, incluindo a microbiota residente e componentes da dieta alimentar. No entanto, microrganismos (comensais, patobiontes e patógenos) e fatores ambientais, como a dieta (pré-bióticos, suplementos ou nutrientes), podem causar a quebra da homeostase intestinal. Alterações na dieta, por exemplo, pode promover mudanças na microbiota comensal, acarretando alteração da resposta imune local. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma dieta desbalanceada baseada em carboidratos e deficiente em proteínas e lipídeos (que vamos chamar de dieta hipoproteica) na homeostase imunológica intestinal tecido-específica. Para este estudo, camundongos C57BL/6 foram tratados com a dieta hipoproteica *ad libitum* durante 6 semanas para avaliação do infiltrado celular na lâmina própria. Os resultados obtidos mostram que o uso de uma dieta hipoproteica, embora não acarrete um quadro de comprometimento significativo, desnutrição ou déficit do desenvolvimento corpóreo do animal, parece alterar a homeostase da mucosa intestinal. Esta alteração foi mais evidente na porção proximal do intestino delgado e foi caracterizada por aumento da presença de um subtipo de DC associado às respostas canônicas intestinais (CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), assim como aumento da presença de células Treg, Th17 e células associadas a uma resposta do tipo 2 (Eosinófilos, ILC2 e macrófagos M2). Além disso, a dieta estava associada a uma redução de populações celulares de caráter mais inflamatório, como neutrófilos, monócitos, macrófagos M1, ILC3 e células Th1. Para avaliar o impacto funcional destas alterações, os camundongos foram infectados com um inóculo subclínico da bactéria *Yersinia pseudotuberculosis* que não causou doença nos animais alimentados com a dieta controle, mas levou ao déficit de crescimento e desenvolvimento de processo inflamatório crônico na mucosa intestinal. Este efeito não foi dependente da presença de infecção ativa e nem da microbiota alterada pela infecção. Além do comprometimento das respostas contra antígenos de origem infecciosa, o tratamento com a dieta também afetou a maneira como o animal respondeu a antígenos de origem alimentar. Animais tratados com a dieta hipoproteica, quando expostos a Ovalbumina (OVA) pela via oral, exibiram a ativação de linfócitos T específicos para OVA de padrão Treg, Th17 e Th2, ao contrário do grupo controle onde existiu uma polarização exclusiva para um perfil de Tregs. Em conjunto, estes resultados mostram que o uso de uma dieta desbalanceada, mesmo que não cause um quadro de desnutrição aparente, pode levar ao comprometimento da ativação adequada da resposta imune tecido-específica da mucosa intestinal e desenvolvimento de doenças sistêmicas.

**Palavras-Chave:** Dieta Hipoproteica, Mucosa Intestinal, Infecção, Microbiota, Tolerância oral

## ABSTRACT

SANTOS, J. M. **Local and systemic effects of low-protein unbalanced diets in the gut-mucosa tissue-specific immunity.** 2020. 112p. Master's thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Maintaining homeostasis in mucosal tissues requires the presence of a network of tissue-specific immune mechanisms endowed with the ability to maintain tolerance to environmental antigens and, at the same time, to induce efficient effector responses to prevent invasion by pathogens. In the intestine, in particular, several elements maintain bi-dimensional interactions to maintain the tissue-specific immunity, including the resident microbiota and components of the diet. However, microorganisms (commensals, pathobionts and pathogens) and environmental factors, such as diet (prebiotics, supplements or nutrients), can cause the breakdown of intestinal immune-homeostasis. For instance, changes in diet can modify the composition of commensal microbiota, impacting on the local immune response. Thus, this study aimed to evaluate the effects of an unbalanced diet based on carbohydrates and deficient in proteins and lipids (which we will call a low-protein diet) in tissue-specific intestinal immune homeostasis. For this study, C57BL/6 mice were treated with a low-protein diet ad libitum for 6 weeks to assess the cellular infiltrate in the lamina propria. The results obtained show that the treatment with a low-protein diet, although it seems not to result in significant malnutrition or deficit in the animal's body development, seems to alter the intestinal mucosal homeostasis. This change was more evident in the proximal portion of the small intestine and was characterized by an increase in the presence of DC subsets associated with canonical intestinal responses (CD103+ CD11b+), as well as an increase in the presence of Treg and Th17 cells in parallel with a type 2 innate cell infiltration (Eosinophils, ILC2 and M2 macrophages). In addition, the diet was associated with a reduction in cell populations of a more inflammatory character, such as neutrophils, monocytes, M1 macrophages, ILC3 and Th1 cells. To assess the functional impact of such changes, mice were infected with a subclinical inoculum of the bacterium *Yersinia pseudotuberculosis* that did not caused disease in animals fed the control diet, but led to deficit in growth and development of a chronic inflammatory process in the gut mucosa. This effect was not dependent nor on the presence of active infection or the microbiota altered by the infection. In addition to the impaired responses to infectious antigens, treatment with the diet also affected responses to food-borne antigens. Animals treated with the low protein diet, when exposed to oral Ovalbumin (OVA), exhibited activation of specific T lymphocytes for OVA of the Treg, Th17 and Th2 pattern, unlike the control group where there was an exclusive polarization for a Treg profile. Together, these results show that the use of an unbalanced diet, even if it does not cause an apparent malnutrition, can lead to impaired activation of the tissue-specific immune response of the intestinal mucosa and the development of systemic diseases.

**Keywords:** Low-Protein Diet, Gut Mucosa, Infection, Microbiota, Oral Tolerance



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Esquema representativo do sistema imunológico associado à mucosa gastrointestinal.....	<b>21</b>
<b>Figura 2:</b> Relação entre as propriedades da barreira epitelial do intestino e o processo inflamatório.....	<b>29</b>
<b>Figura 3:</b> Etapas utilizadas por espécies de <i>Yersinia</i> enteropatogênicas para translocação do epitélio intestinal e desenvolvimento do processo infeccioso que leva à linfadenite mesentérica.....	<b>30</b>
<b>Figura 4:</b> Análise “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE).....	<b>44</b>
<b>Figura 5:</b> Avaliação do crescimento e desenvolvimento corporal de animais submetidos à dieta hipoproteica.....	<b>49</b>
<b>Figura 6:</b> Remodelamento dos compartimentos de tecido adiposo após alteração na dieta.....	<b>50</b>
<b>Figura 7:</b> Alterações nos parâmetros hematológicos pós-ingestão de dieta com baixa quantidade de proteínas. ....	<b>52</b>
<b>Figura 8:</b> Análise do infiltrado de células mieloides da lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>53</b>
<b>Figura 9:</b> Análise do infiltrado de células mieloides da lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>55</b>
<b>Figura10:</b> Análise do infiltrado de células linfoides na lâmina própria intestinal de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>56</b>
<b>Figura 11:</b> Remodelamento das vilosidades do intestino delgado após a alteração na dieta.....	<b>58</b>
<b>Figura 12:</b> Influência do tratamento com dieta hipoproteica sobre o infiltrado celular da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado.....	<b>59</b>
<b>Figura 13:</b> Análise do infiltrado de leucócitos na lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>63</b>
<b>Figura 14:</b> Análise do infiltrado de células linfoides da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>65</b>

<b>Figura 15:</b> Análise do infiltrado <b>linfoide adaptativo</b> da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>67</b>
<b>Figura 16:</b> Análise do infiltrado linfoide inato da lâmina própria das diferentes porções intestinais de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>68</b>
<b>Figura 17:</b> Análise da produção de citocinas por leucócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>69</b>
<b>Figura 18:</b> Análise da produção de citocinas por linfócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino de animais tratados com dieta hipoproteica.....	<b>70</b>
<b>Figura 19:</b> Produção muco nas porções proximais e distais do intestino delgado após a alteração na dieta.....	<b>71</b>
<b>Figura 20:</b> Sobrevida de animais submetidos à dieta hipoproteica na presença de infecção aguda da mucosa intestinal.....	<b>72</b>
<b>Figura 21:</b> Avaliação do crescimento, desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal de animais submetidos à dieta hipoproteica e infectados com <i>Y. pseudotuberculosis</i> .....	<b>74</b>
<b>Figura 22:</b> Avaliação das alterações estruturais na porção distal do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica pós infecção.....	<b>76</b>
<b>Figura 23:</b> Análise do infiltrado de leucócitos da lâmina própria do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção subclínica recorrente.....	<b>78</b>
<b>Figura 24:</b> Análise do infiltrado de leucócitos da imunidade inata na lâmina própria do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção subclínica.....	<b>80</b>
<b>Figura 25:</b> Análise do infiltrado de células linfoides na lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção.....	<b>82</b>
<b>Figura 26:</b> Análise do infiltrado linfoide da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção.....	<b>83</b>

**Figura 27:** Análise da produção de citocinas por linfócitos da lâmina própria das diferentes porções do intestino delgado de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e infecção.....**85**

**Figura 28:** Avaliação da presença de infecção ativa e de translocação bacteriana em camundongos submetidos à dieta hipoproteica e posteriormente infectados com *Y. pseudotuberculosis*.....**86**

**Figura 29:** Avaliação do crescimento, desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal de animais que receberam transplante fecal de camundongos previamente infectados com *Y. pseudotuberculosis* e submetidos à dieta hipoproteica.....**89**

**Figura 30:** Avaliação da presença contra antígenos alimentares em animais tratados com dieta hipoproteica.....**92**

**Tabela 1.** Principais componentes das dietas controle e hipoproteica. ....**37**

**Tabela 2.** Anticorpos monoclonais utilizados.....**42**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

‰: porcentagem

°C: graus celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

AUC: Área Sob a Curva (do inglês, *Area Under the Curve*)

BHI: do inglês, *Brain Heart Infusion*

CD: do inglês, *Custer Differentiation*

CD: Doença de Crohn (do inglês, *Crohn's Disease*)

CEFAP: Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa

CG: Centro Germinativo do folículo linfóide

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (concentração RDW-CV – Coeficiente de Variação da Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos

DC: Célula Dendrítica (do inglês, *Dendritic Cell*)

EE: do inglês, *Environmental Enteropathy*

ETBF: do inglês, *Enterotoxigenic Fragilis Bacteroides*

FMT: Transplante de Matéria Fecal (do inglês, *Fecal Matter Transplantation*)

GALT: Tecido Linfóide Associado ao Intestino (do inglês, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*)

h: hora

HBSS: do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*

HCT: Hematócrito

HE: Hematoxilina e Eosina

HGB: Hemoglobina

IFN-γ: *Interferon-gama*

IL-1: Interleucina-1

IL-13: Interleucina-13

IL-17: Interleucina-17

IL-22: Interleucina-22

IL-4: Interleucina-4

IL-5: Interleucina-5

ILC: Célula Linfóide Inata (do inglês, *Innate Lymphoid Cell*)

ILC1: Célula Linfóide Inata Tipo 1 (do inglês, *Type 1 Innate Lymphoid Cell*)  
ILC2: Célula Linfóide Inata Tipo 2 (do inglês, *Type 2 Innate Lymphoid Cell*)  
ILC3: Célula Linfóide Inata Tipo 3 (do inglês, *Type 3 Innate Lymphoid Cell*)  
LB: Linfócito B  
LT: Linfócito T  
LTi: Célula Indutora de Tecido Linfóide (do inglês, *Lymphoid Tissue Inducer cell*)  
MCH: Hemoglobina Corpuscular Média (do inglês, *Mean Corpuscular Hemoglobin*)  
MCV: Volume Corpuscular Médio (do inglês, *Mean Corpuscular Volume*)  
mesAT: Tecido Adiposo Mesentérico (do inglês, *mesenteric Adipose Tissue*)  
min: minutos  
mLN: Linfonodo Mesentérico (do inglês, *Mesenteric Lymph Node*)  
MPV: Volume Plaquetário Médio (do inglês, *Mean Platelet Volume*)  
MUC2: mucina 2  
NCR: Receptor de Citotoxicidade Natural (do inglês, *Natural Cytotoxicity Receptor*)  
NTBF: do inglês, *Non-toxigenic Bacteroides fragilis*  
OVA: Ovoalbumina  
PAS: Reativo Periódico de Schiff (do inglês, *Periodic Acid of Schiff*)  
PBS: Tampão Fosfato Salino (do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*)  
PCT: Plaquetócrito  
PDW: Amplitude da Distribuição de Plaquetas (do inglês, *Platelet Distribution Width*)  
PLT: Plaquetas  
PMA: do inglês, *Phorbol Myristate Acetate*  
PP: Placas de Peyer  
prgAT: Tecido Adiposo Perigonadal (do inglês, *perigonadal Adipose Tissue*)  
RBC: Glóbulos Vermelhos ou Eritrócitos (do inglês, *Red Blood Cells*)  
RDW: Desvio Padrão da Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês, *Red Cell Distribution Width High*)  
rpm: rotações por minuto  
RPMI: do inglês, *Roswell Park Memorial Institute Medium*  
scAT: Tecido Adiposo Subcutâneo (do inglês, *subcutaneous Adipose Tissue*)  
SFB: Soro Fetal Bovino

SPF: Animais Livres de Patógenos Específicos (do inglês, *Specific pathogen-Free*)

TGI: Trato Gastrointestinal

Th: Linfócitos T Helper

TLR: Receptores Semelhantes a Toll (do inglês, *Toll-Like Receptors*)

TNF: Fator de Necrose Tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*)

Treg: Linfócito T Regulador (do inglês, *Regulatory T cell*)

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

WBC: Leucócitos (do inglês, *White Blood cells*)

YOPs: do inglês, *Yersinia Outer Proteins*

YP: *Yersinia pseudotuberculosis*

ZM: Zona Marginal Do Folículo Linfóide

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	15
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 Imunologia da mucosa gastrointestinal .....	20
1.2 Interação entre a dieta hipoproteica, a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro .....	24
1.3 Infecções intestinais e sua contribuição para a ruptura da homeostase imunológica e metabólica nas mucosas.....	27
2. OBJETIVOS .....	36
2.1 Objetivos específicos .....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3.1 Camundongos.....	38
3.2 Dietas Especiais.....	38
3.3 Pesagem semanal .....	39
3.4 Infecção Oral.....	39
3.5 Transplante de conteúdo fecal .....	39
3.6 Avaliação do desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal.....	40
3.7 Histologia .....	40
3.8 Obtenção de células do intestino .....	40
3.9 Marcação de células para análise fenotípica e funcional por citometria de fluxo .....	41
3.10 Anticorpos utilizados .....	43
3.11 Estratégias de análise dos resultados de citometria de fluxo.....	44
3.12 Análise de tSNE .....	45
3.13 Translocação bacteriana.....	46
3.14 Hemograma .....	47
3.15 Transferência celular e marcação com Cell Tracer Violet.....	47
3.16 Ensaio de rastreamento da resposta específica para antígenos orais..	48
3.17 Análise estatística .....	48
7. BIBLIOGRAFIA .....	50

## **INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Imunologia da mucosa gastrointestinal

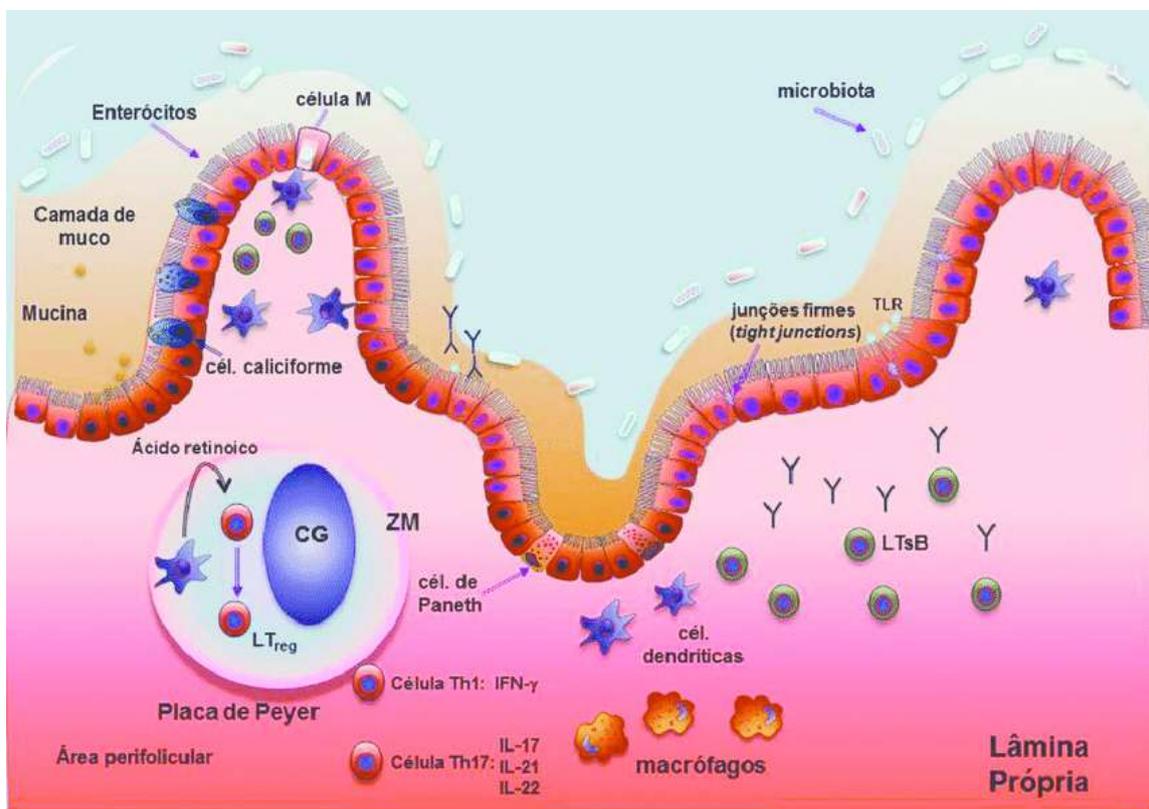
A manutenção da homeostase em órgãos de alta exposição antigênica, como a pele, o pulmão e a mucosa gastrointestinal, requer a existência de um sistema imunológico altamente especializado, que permita ao hospedeiro estabelecer uma relação de mutualismo com a microbiota residente e, ao mesmo tempo, induzir imunidade contra patógenos (LI, Y. et al, 2020; DAVID, R.S.L. et al, 2020).

O trato gastrointestinal, especificamente, é constantemente desafiado pelos conteúdos luminais que abrigam inúmeros microrganismos e antígenos alimentares. Para manter o equilíbrio homeostático, é fundamental que o sistema imunológico local seja capaz de identificar se os estímulos recebidos estão relacionados a uma quebra de homeostase ou não e de elaborar uma resposta adequada, resultando em um processo de inflamação ou de tolerância (RAPOZO et al. 2017).

Em condições de homeostase em indivíduos saudáveis diversos mecanismos de imunidade de barreira atuam para conter a proliferação exacerbada dos componentes da microbiota intestinal, a entrada de patógenos e prevenir lesão tecidual causada por ativação excessiva do sistema imune (**Figura 1**). Tais mecanismos incluem: a produção de muco, presença de junções intraepiteliais que impedem a translocação de bactérias, produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas e anticorpos (TURNER, 2009, MARCHIANDO, G. et al. 2010, MARCHIANDO, S. et al. 2010, BELKAID; HAND, 2014).

O tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT - do inglês, *Gastrointestinal Associated Lymphoid Tissue*) pode ser dividido em locais efetores dispersos, como a lâmina própria e os linfócitos intraepiteliais, e estruturas linfoides organizadas, como linfonodos mesentéricos (mLNs - do inglês, *Mesenteric Lymph Nodes*), placas de Peyer (PPs) e os folículos linfoides isolados. Estas estruturas organizadas no trato gastrointestinal desempenham o papel de órgãos linfoides secundários, envolvidos na indução da resposta imunológica da mucosa (SCHENK, M., 2008).

O sistema imunológico associado à mucosa intestinal e ao mesentério possui ainda um componente importante formado por uma rede complexa de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, do inglês, *Dendritic Cells* - DCs) e vasos linfáticos coletores responsáveis pelo transporte de antígenos e células para órgãos linfóides secundários onde são elaboradas as respostas imunes adaptativas efetoras e tolerogênicas (MACPHERSON; UHR, 2004, MACPHERSON; UHR, 2004, HAMMERSCHMIDT, A. et al. 2008, CONG, F. et al. 2009, IVANOV, A. et al. 2009, MACPHERSON, S. et al. 2009, FONSECA; HAND et al. 2015).



**Figura 1: Esquema representativo do sistema imunológico associado à mucosa gastrointestinal. Modificado de GONÇALVES, J. et al, 2016.** Arranjo nodular encapsulado da placa de Peyer. Epitélio intestinal, composto por enterócitos organizados e unidos pelas junções de oclusão ou tight junctions, formando uma barreira contra a translocação de microrganismos do lúmen para a lâmina própria. Expressão de receptores TLR (do inglês, *toll-like receptors*) e presença de células caliciformes no epitélio intestinal, que também compõem a barreira paracelular. Camada de muco e de peptídeos antimicrobianos responsáveis por restringir a translocação de microrganismos. Linfócitos B (LTsB) e T, incluindo linfócitos polarizados para respostas Th1 e Th17 e suas respectivas citocinas na lâmina própria. Células M, que desempenham um papel importante no transporte de antígenos não processados para células dendríticas e linfócitos da lâmina própria. Macrófagos e células dendríticas, apresentadoras de antígenos, que também se encontram dispersos na lâmina própria. Linfócitos T reguladores (LTreg), encontrados principalmente nas placas de Peyer e induzidos pela presença do ácido retinóico e da citocina TGF- $\beta$ . CG=centro germinativo do folículo linfóide; ZM= zona marginal do folículo linfóide.

Acredita-se que as DCs intestinais sejam principalmente derivadas de precursores da medula óssea comprometidos com a diferenciação dessas células e também por monócitos que podem migrar para a mucosa, por meio de gradientes de quimiocina, e diferenciar-se em DCs no tecido. As DCs são encontradas tanto nas placas de Peyer, onde podem acessar antígenos transportados através das células M e dispersas por todo o trato gastrointestinal, onde foi relatado que, pelo menos no íleo terminal, podem modular a expressão das proteínas de junção intercelulares no epitélio para obter acesso por meio dos seus dendritos, ao lúmen intestinal (GONÇALVES, J. et al, 2016).

Os diferentes subtipos de DCs podem ser descritos com base na expressão das integrinas CD11b e CD103. Na lâmina própria intestinal, encontramos DCs CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>. As funções destes diferentes subtipos celulares estão diretamente relacionadas com o microambiente celular, que pode diferenciá-los como subtipos mais tolerogênicos ou inflamatórios. Estudos demonstram que as DCs CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> estão intimamente envolvidas na manutenção da homeostase intestinal, principalmente por meio da síntese de ácido retinóico e TGF- $\beta$ , induzindo a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em linfócitos T reguladores (Tregs) e Th17, bem como a produção de IgA pelos plasmócitos, tanto de maneira T-dependente como T-independente (JOERIS, T. et al, 2017; VAROL, C. et al, 2009; OWEN, J.L, 2013).

As DCs que expressam CD103 são capazes de emitir prolongamentos pelo epitélio intestinal, capturando antígenos. Além disso, estas células possuem relação com a tolerância a microrganismos comensais por sua capacidade de induzir Tregs (OWEN, J.L, 2013; RESCIGNO, M., 2010). Quanto às células CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>, alguns estudos descrevem a sua capacidade de induzir a reposta Th17, que no intestino, pode estar relacionada com o aumento da secreção de peptídeos antimicrobianos, reforço da barreira epitelial, indução de respostas neutrofílicas, dentre outros, dependendo do microambiente tecidual (ATARASHI, K., 2010; UEMATSU, S. 2008).

A lâmina própria também conta com macrófagos, localizados na região subepitelial. Microrganismos comensais e patógenos que ocasionalmente obtêm

acesso à lâmina própria são rapidamente fagocitados por esses macrófagos, posicionados preferencialmente nos locais de entrada do antígeno. Apesar da proximidade entre antígenos luminais e macrófagos intestinais, a mucosa intestinal normalmente exibe sinais mínimos de inflamação (SCHENK, M., 2008). Grande parte dessa tolerância se deve à natureza dos macrófagos residentes da mucosa, que não possuem caráter inflamatório.

Para que as respostas imunológicas sejam desencadeadas na lâmina própria, é necessário que o antígeno seja apresentado às células T que serão posteriormente ativadas. As células M figuram entre os vários mecanismos de transporte de antígenos luminais. Estas células são enterócitos modificados, localizados no epitélio intestinal associado às placas de Peyer, principalmente na porção distal do intestino delgado. Elas formam bolsos na camada epitelial permitindo o contato do antígeno com DCs, macrófagos e linfócitos B, e a apresentação do mesmo para os linfócitos T (DILLON, A; LO, D.D, 2019). De acordo com a natureza do antígeno, o tipo de célula a qual o antígeno é apresentado e com o microambiente onde o mesmo se encontra, pode ser desencadeada uma resposta imunológica inflamatória ou tolerogênica.

Além disso, a composição da microbiota intestinal, por sua vez, também molda o sistema imunológico inato e adaptativo da mucosa. O desenvolvimento e a adaptação da microbiota intestinal representam um processo contínuo que ocorre ao longo da vida. A este respeito, vários fatores ambientais contribuem para a colonização microbiana do trato gastrointestinal, como alimentação, higiene, estresse e uso de medicamentos (HAND, T.W., 2016).

A composição da microbiota intestinal é afetada desde muito cedo na vida, começando com a via de parto. Pouco depois do nascimento, a amamentação, a exposição a alimentos e outros fatores ambientais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da microbiota intestinal. A microbiota comensal é distribuída em todo o trato gastrointestinal, com um aumento característico e progressivo tanto da diversidade quanto da densidade dos segmentos superiores aos inferiores (DOMINGUEZ-BELLO et al, 2011; MARTIN et al, 2010). Estudos do microbioma humano identificaram mais de 3 milhões de genes únicos dentro do intestino, superando amplamente o genoma humano e contendo mais de mil espécies bacterianas, sendo a maioria dos filós *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (ZHU et al, 2010; ARUMUGAM et al, 2011).

Após o estabelecimento da microbiota comensal, fatores intrínsecos (como componentes genéticos) e extrínsecos (fatores ambientais) podem atuar sobre a sua composição, moldando o sistema imunológico residente da mucosa e conseqüentemente levando a condições de homeostase ou disbiose intestinal.

## **1.2 Interação entre a dieta hipoproteica, a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro**

Atualmente foram demonstradas diversas evidências da existência de uma relação cruzada entre o hospedeiro e a microbiota comensal do intestino. Os nutrientes desempenham um papel importante nesta relação, de forma direta, interagindo com o hospedeiro através do epitélio ou do sistema imunológico intestinal, ou indiretamente, modulando a composição da microbiota comensal que, por sua vez, irá interagir com o sistema imunológico e *vice-versa* (MA, N. et al, 2017).

O sistema imunológico intestinal, quando em contato com diferentes tipos de microrganismos e nutrientes, pode reagir ou adaptar-se. O tipo de resposta (inflamatória ou tolerogênica) está diretamente relacionada com a natureza do microrganismo (comensais, patobiontes e patógenos), mas também a fatores ambientais, como a dieta (pré-bióticos, suplementos ou nutrientes) (STATOVCI, D. et al, 2017).

Com relação aos macronutrientes da dieta, as proteínas são essenciais para o organismo e estão envolvidas em praticamente todas as funções fisiológicas. Vários estudos demonstram que peptídeos e aminoácidos presentes na dieta podem modular as funções imunes intestinais e influenciar nas respostas inflamatórias (LI, Z. et al, 2016). A ingestão de altas quantidades de proteínas, por exemplo, especialmente de origem animal, está associada a um risco aumentado de Doença de Crohn (CD - do inglês, *Crohn's Disease*). Por outro lado, a suplementação com o dipeptídeo alanina-glutamina leva à diminuição da expressão de mediadores inflamatórios e aumenta a expressão da mucina 2 (MUC2) promovendo a recuperação da mucosa em modelo murino de colite induzida por DSS (do inglês *Dextran Sulfate Sodium- sulfato de sódio dextrano*) (HOU, Y.C. et al, 2013). Outros trabalhos, mostram que a alimentação com dieta baseada em aminoácidos, livre de proteínas, está associada a um estado de imaturidade do sistema imunológico da mucosa intestinal e

incapacidade de indução de tolerância nasal a alérgenos aéreos (MENEZES, J. S. et al, 2003; MUCIDA, D.S. et al, 2007)

Além disso, foi mostrado que a diminuição nos níveis de triptofano sérico está associada à patogênese da CD. Complementarmente, a suplementação com triptofano apresentou efeitos benéficos no modelo de doença inflamatória intestinal induzida por DSS, causando apoptose de células T e inibindo as respostas imunes mediadas por Th1 e conseqüentemente reduzindo a inflamação (KIM, C.J., 2009).

Além dos efeitos na resposta imunológica do hospedeiro, a baixa ingestão de proteínas pode promover mudanças na microbiota intestinal. Estudo de coorte com amostras de microbiota fecal coletadas mensalmente de crianças com fenótipo de crescimento saudável identificou mudanças associadas à idade na representação de espécies bacterianas durante os dois primeiros anos de vida pós-natal. Estas espécies foram incorporadas a um modelo que calcula o "índice de maturidade relativo da microbiota" e "o parâmetro de microbiota relacionada a idade", que comparam o desenvolvimento das crianças com a maturação da microbiota fecal.

Esses dados definem um programa de desenvolvimento de microbiota que é compartilhado entre bebês e crianças de Bangladesh, não relacionados biologicamente. As crianças que habitam nesse local, geralmente são acometidas por desnutrição moderada ou grave e apresentam perturbações na microbiota comensal, resultando em uma imaturidade nas comunidades microbianas. Essa desnutrição se deve principalmente à baixa ingestão proteica relacionada ao fator socioeconômico desfavorável (SUBRAMANIAN et al, 2014).

Um trabalho publicado em 2016, utilizando camundongos C57BL/6 alimentados com dietas controle, hipoproteica ou deficiente em zinco, mostrou mudanças consideráveis da microbiota intestinal entre 14 e 24 dias após o desmame nos camundongos que foram mantidos em dieta controle, incluindo aumento de *Proteobacteria* e redução de *Bacteroidetes*. A microbiota dos camundongos que foram alimentados com a dieta deficiente em zinco foi comparável ao perfil da microbiota de animais nutridos adequadamente e com a mesma idade, já a restrição de proteínas causou uma diminuição do filo *Bacteroidetes* nesses animais (PERXACHS et al, 2016). Além disso, aumento de *Verrucomicrobia* (predominantemente *Akkermansia muciniphila*) foi

observado tanto em camundongos nutridos quanto em camundongos que receberam a dieta deficiente em proteínas, 14 dias após o desmame. A desnutrição proteica também prejudicou o crescimento, muito mais do que a deficiência de zinco, e causou alterações energéticas e no metabolismo de poliamina, purinas e pirimidinas dos camundongos (PERXACHS et al, 2016).

Para elucidar as interações entre enteropatógenos e membros da comunidade microbiana do intestino e, como essas interações contribuem para a função absorptiva do epitélio intestinal e desnutrição, um grupo de pesquisadores colonizou camundongos gnotobióticos, alimentados com dietas representativas de Bangladesh, com cepas bacterianas sequenciadas e cultivadas a partir da microbiota fecal de dois gêmeos de 24 meses de idade, residentes em Bangladesh, um saudável e outro abaixo do peso (WAGNER, et al., 2016). A microbiota do doador com desnutrição proteica continha uma cepa de *Bacteroides fragilis enterotoxigênica* (ETBF - do inglês, *Enterotoxigenic Fragilis Bacteroides*), enquanto a microbiota do doador saudável continha duas cepas não toxigênicas de *B. fragilis* (NTBF - do inglês, *non-toxigenic Bacteroides fragilis*). Análises de camundongos que receberam as culturas não manipuladas ou sistematicamente manipuladas destas cepas revelaram que a ETBF estava relacionada à perda de peso no contexto de desnutrição, mas não quando introduzida na comunidade de doadores saudáveis. A presença de NTBF reduziu a expressão da ETBF e mitigou os efeitos da ETBF quando transferida para membros saudáveis.

Este fenótipo foi transmissível e associado a transtornos no metabolismo do hospedeiro, manifestado por alterações na atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, prejudicando a utilização de acil-CoA (WAGNER, et al., 2016). Portanto, a baixa ingestão proteica, comumente encontrada na população de Bangladesh, é capaz de modular a microbiota comensal do intestino, consequentemente interferindo nos processos metabólicos e na resposta imunológica local.

Dentro deste contexto, a interação entre dieta, microbiota e resposta imunológica do hospedeiro é extremamente complexa, principalmente no que se refere ao agravamento das respostas inflamatórias mediante ao consumo excessivo ou à diminuição drástica de certos nutrientes presentes na dieta (STATOVCI, D. et al, 2017).

Além da dieta, diferentes tipos de infecções podem interferir na composição da microbiota intestinal. Estas infecções geralmente são causadas por microrganismos gastrointestinais não comensais e podem ser agudas (autolimitantes) ou crônicas. As espécies bacterianas *Shiguela* spp., *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp. são as principais causadoras de doenças em humanos, e dentre as causas de afecções intestinais destaca-se a infecção por *Salmonella* spp. (AHERN, P.P; MALOY, K.J, 2019). Atualmente, vários modelos murinos de infecções gastrointestinais bacterianas estão sendo utilizados para mimetizar os processos envolvidos na resposta imunológica durante a interação hospedeiro-patógeno. No entanto, a resposta do animal nem sempre reproduz a patologia humana, especialmente nos casos de modelo de infecção aguda.

### **1.3 Infecções intestinais e sua contribuição para a ruptura da homeostase imunológica e metabólica nas mucosas**

Infecções intestinais por bactérias, protozoários, fungos, vírus e helmintos são comuns na população mundial e afetam indivíduos de diferentes faixas etárias. Os agentes causadores, a gravidade, o desfecho e a incidência das infecções gastrointestinais estão associadas ao grau de exposição aos agentes patogênicos, ao desenvolvimento socioeconômico e à integridade do sistema imunológico do hospedeiro (SANSONETTI, J.P, 2004).

A homeostase e a integridade tecidual nos tecidos de barreira são mantidas em função da capacidade do sistema imunológico local em reconhecer e processar os sinais ambientais e endógenos para elaborar respostas apropriadas e finamente reguladas contra patógenos. Entretanto, determinadas infecções do trato gastrointestinal ou infecções recorrentes podem levar à quebra da homeostase intestinal, promovendo imunidade contra componentes próprios ou da microbiota e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (KASER, ZEISSIG et al. 2010, HAND, T.W. et al. 2012, KORPE; PETRI, 2012, KORPE; STOTT et al. 2012, MONDAL, M. et al. 2012).

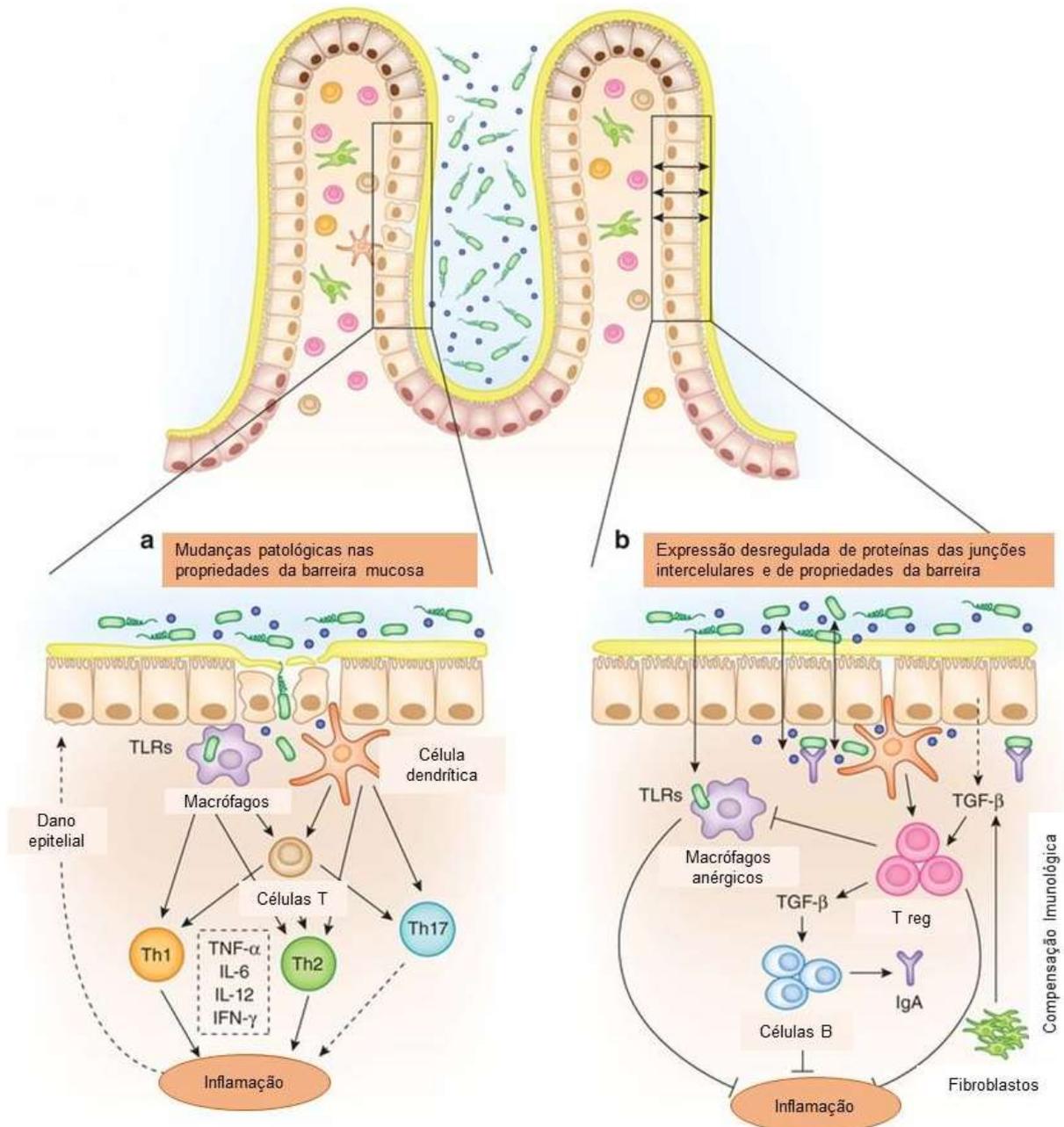
Infecções gastrointestinais podem ainda interferir na homeostase entre a microbiota-sistema endócrino-sistema imunológico por diferentes vias: indução de disbiose com conseqüente proliferação exacerbada/opportunística de enterobactérias, indução de imunidade contra microrganismos comensais e indução de alterações morfológicas e estruturais da mucosa intestinal e dos tecidos linfoides associados (HEIMESAAT, B. et al. 2006, LUPP, R. et al. 2007,

CRAVEN, E. et al. 2012, HAND, T.W. et al. 2012, BELKAID; BOULADOUX, et al. 2013, MOLLOY, G. et al. 2013).

Após determinados episódios de infecção aguda, é comum encontrarmos alterações estruturais do trato gastrointestinal. Essas complicações podem persistir por anos, mesmo após a eliminação do patógeno. Tais alterações são também encontradas em pacientes com doenças inflamatórias intestinais e caracterizam-se pela presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria, fibrose, calcificações, alterações na organização da estrutura dos linfonodos drenantes e aumento da permeabilidade intestinal (HAND, T.W., 2016).

Conforme descrito anteriormente, a barreira epitelial intestinal é formada por células epiteliais altamente adaptadas, que estão interconectados com junções interepiteliais e são cobertos com muco e peptídeos bactericidas. Isso permite que apenas um número muito pequeno de microrganismos penetre no epitélio intestinal. No entanto, existem muitos agentes físicos e químicos que podem danificar essa barreira, permitindo que conteúdos luminais entrem na lâmina própria e desencadeiem uma inflamação (LINDEN, S.K., et al, 2008). Neste caso, DCs teciduais capturam e apresentam antígenos para os linfócitos T auxiliares que se diferenciam nos perfis Th1, Th2 e Th17 e produzem citocinas importantes no processo de inflamação, causando dano tecidual, caso não haja contrabalanceamento por uma resposta de células Treg (**Figura 2A**). No entanto, as investigações que utilizam proteínas das junções intercelulares manipuladas por meios genéticos mostraram que mecanismos imunes compensatórios agem para proteger a barreira intestinal, mesmo quando há permeabilidade intestinal aumentada, mostrando o papel dessas proteínas na regulação da homeostase imunológica, na lesão epitelial e no reparo da inflamação da mucosa (AHMAD, R. et al, 2017; SANSONETTI, J.P, 2004).

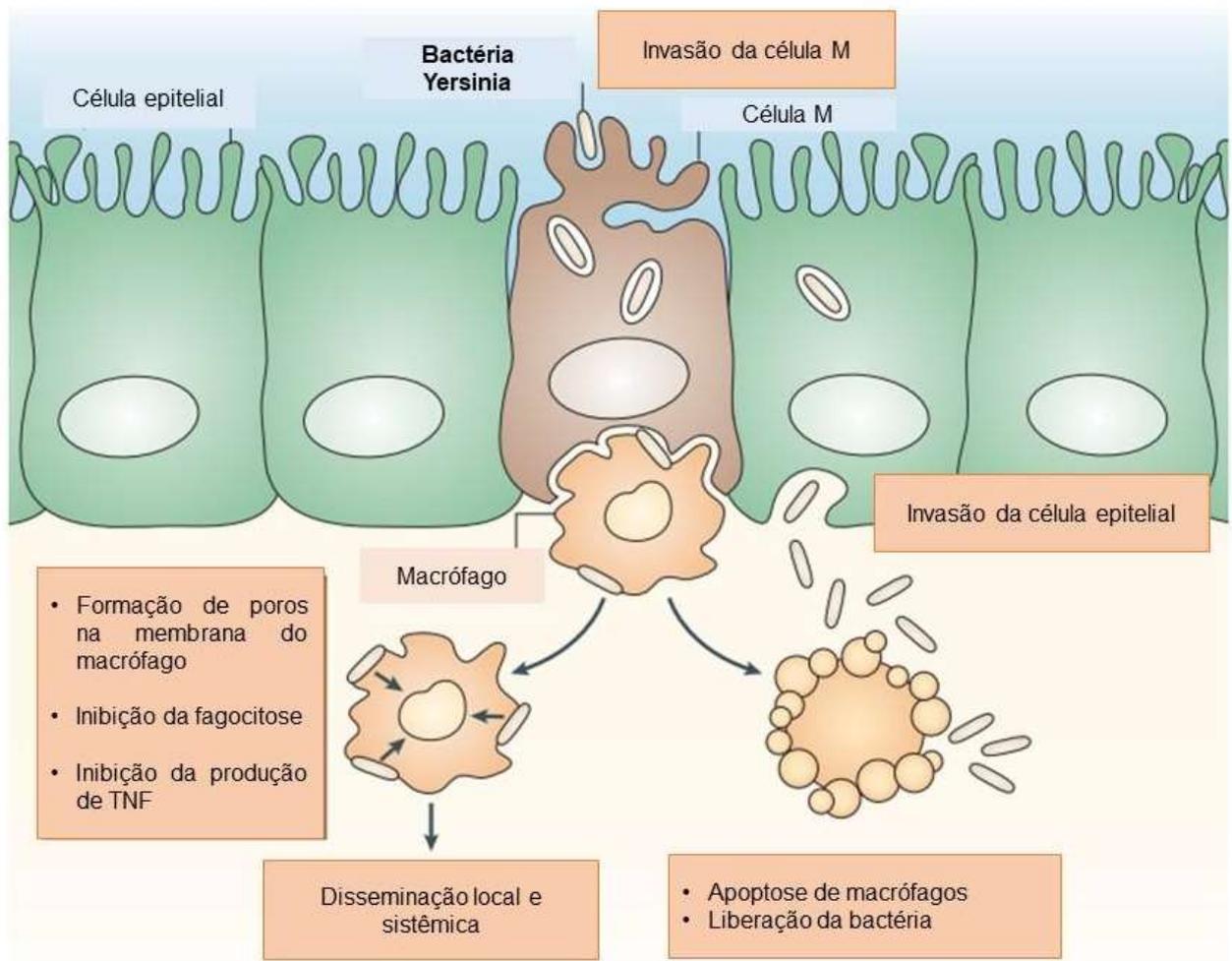
Ocasionalmente, a microbiota comensal e os antígenos luminais podem romper a barreira epitelial e invadir a lâmina própria. No entanto, componentes imunes inatos e adaptativos, localizados predominantemente na lâmina própria subepitelial, são normalmente capazes de prevenir reações inflamatórias excessivas (**Figura 2B**). Estes componentes incluem a presença de macrófagos com propriedades reguladoras, a produção de TGF- $\beta$  e a indução de células Treg, além da produção de IgA pelos linfócitos B (AHMAD, R. et al, 2017).



**Figura 2: Relação entre as propriedades da barreira epitelial do intestino e o processo inflamatório. Modificada de Ahmad, R. et al, 2017.** O epitélio intestinal constitui uma barreira física e bioquímica para separar efetivamente os antígenos luminais e o sistema imunológico da mucosa. Uma quebra de homeostase induzida por patógenos na barreira da mucosa pode induzir a hiperativação do sistema imunológico e inflamação crônica (A). Componentes imunes inatos e adaptativos, como macrófagos reguladores, produção de TGF- $\beta$ , indução de células Treg, e produção de IgA pelos linfócitos B, são normalmente capazes de prevenir reações inflamatórias excessivas (B).

Entender os mecanismos envolvidos nas respostas imunológicas do intestino tem sido um grande desafio, principalmente em contextos de exposições a patógenos intestinais. Para tal, se faz necessário o uso de modelos experimentais.

Recentemente, nosso grupo estabeleceu um modelo experimental murino de infecção intestinal por *Yersinia pseudotuberculosis*, capaz de quebrar a barreira imunológica intestinal. A infecção se dá pela via oral e a bactéria atravessa o intestino através das placas de Peyer, utilizando as células M como um mecanismo de transporte (**Figura 3**). A bactéria tem predileção pelo íleo, apêndice, linfonodos mesentéricos e fígado, causando linfadenite granulomatosa, ileíte e gastroenterite aguda febril com sintomas que mimetizam uma apendicite (TAUXE, 2004, ZIPPI, C. et al. 2006).



**Figura 3: Etapas utilizadas por espécies de *Yersinia* enteropatogênicas para translocação do epitélio intestinal e desenvolvimento do processo infeccioso que leva à linfadenite mesentérica. Modificado de Sansonetti, J.P, 2004. *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica* atravessam a barreira epitelial através das células M do epitélio associado às placas de Peyer, principalmente na porção distal do intestino delgado. Estas bactérias resistem à fagocitose dos macrófagos através da injeção de fatores de virulência nestas células (YOPs, do inglês *Yersinia Outer Proteins*), usando um sistema secretor tipo III, levando à paralisa do citoesqueleto de actina. *Yersinia* também regula a inflamação, evitando assim os efeitos humorais e celulares da resposta imune inata. Outro tipo de mecanismo é a apoptose de macrófagos e a inibição da produção de TNF (do inglês tumor necrosis factor - fator de necrose tumoral). Como resultado, a bactéria resiste às defesas imunológicas do hospedeiro nos tecidos subepiteliais, permitindo-lhes invadir o epitélio e infectar os linfonodos mesentéricos.**

Vários trabalhos sugerem a existência de uma associação entre a infecção por *Y. pseudotuberculosis* e o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, visto que DNA bacteriano e anticorpos específicos foram detectados em pacientes com formas graves da CD e existem ainda pacientes infectados por *Y. pseudotuberculosis* que desenvolvem CD anos após a eliminação da bactéria (SWARBRICK, K. et al. 1979, LAMPS, M. et al. 2003, ZIPPI, C. et al. 2006, IJICHI, K. et al. 2012).

Neste contexto, nosso grupo vem estudando, em modelo experimental, como esta bactéria pode interferir na homeostase imunológica da mucosa intestinal. Os resultados obtidos pelo nosso grupo mostram que camundongos infectados pela via oral com *Y. pseudotuberculosis* desenvolvem uma resposta inflamatória intensa no intestino, baço e linfonodos mesentéricos, caracterizada pela ativação de linfócitos específicos tanto para a bactéria, quanto para antígenos da microbiota comensal (Fonseca, Hand et al. 2015 e dados não publicados). Esta resposta inflamatória persiste por meses após a eliminação da bactéria, que ocorre entre 2-3 semanas após a infecção. Como consequência da inflamação crônica, ocorre um remodelamento do mesentério que inclui a presença de linfadenopatia mesentérica crônica, caracterizada pelo desenvolvimento de fibrose, necrose e lesões granulomatosas, além de aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos e inflamação crônica no tecido adiposo mesentérico.

Tais alterações se desenvolvem após a eliminação completa da bactéria e persistem por mais de um ano, sugerindo que seriam lesões permanentes. Como consequência deste remodelamento, células dendríticas do subtipo CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, que em situações normais migrariam do intestino para os linfonodos mesentéricos, não têm mais acesso a estes órgãos e ficam retidas no tecido adiposo mesentérico, por onde passam os vasos linfáticos que conectam o intestino aos linfonodos (FONSECA, HAND et al. 2015). Deste modo, a indução de respostas imunes intestinais canônicas (Treg, Th17 e IgA) encontra-se prejudicada, incluindo o desenvolvimento de imunidade contra vacinas orais. Isto ocorre porque após a resolução da infecção, há um aumento da permeabilidade dos vasos linfáticos intestinais, promovendo o extravasamento de produtos da microbiota intestinal, que se acumulam no tecido mesentérico adiposo, sustentando uma inflamação crônica.

A microbiota é essencial para esse fenômeno, que chamamos de “cicatriz imunológica”, visto que animais *germ-free* não apresentam tais defeitos e, em camundongos SPF (*specific pathogen-free*), essas alterações são acompanhadas de disbiose intestinal e limitação na capacidade de produção de IgA em resposta à imunização pela via oral. Este fenótipo pode ser revertido após a eliminação da microbiota por antibióticos de amplo espectro e ocorre apenas mediante infecção com carga bacteriana mínima, ou seja, inóculos baixos não causam tais alterações e a bactéria é rapidamente eliminada pelo hospedeiro.

Considerando-se que os vasos linfáticos intestinais possuem uma função importante na captação, transporte e absorção de nutrientes, é possível que estes animais possam ser mais susceptíveis à desnutrição e a doenças entéricas frente a alterações de dieta e exposição a patógenos intestinais.

Acreditamos que tais efeitos não sejam específicos para esta bactéria e que determinadas infecções do trato gastrointestinal ou infecções recorrentes podem levar à quebra da homeostase intestinal, promovendo imunidade contra componentes próprios ou da microbiota e o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (KASER, ZEISSIG et al. 2010, HAND, T.W. et al. 2012, KORPE; PETRI, 2012, KORPE; STOTT et al. 2012, MONDAL, M. et al. 2012).

Neste contexto, acredita-se que infecções possam atuar como gatilhos no desenvolvimento dessas doenças, em particular na Enteropatia Ambiental (EE - do inglês, *Environmental Enteropathy*). A EE é um distúrbio intestinal predominante entre habitantes de países de baixa renda *per capita*, que geralmente vivem em ambientes com saneamento e higiene precários, e conseqüentemente estão expostos, de forma crônica, a diversos tipos de contaminantes, como patógenos fecais, por exemplo (PETRI, et al, 2014).

Esta tem sido a hipótese mais bem aceita para a etiologia da EE, crianças expostas a quadros recorrentes de infecção intestinal desenvolveriam inflamação crônica local que levaria à perda da integridade da barreira mucosa, associada com translocação de microbiota e sistematização da inflamação, que juntamente com a perda da função do epitélio intestinal, levaria à dificuldade de absorção de nutrientes. Este quadro de desnutrição, por sua vez, aumentaria a predisposição a novas infecções, fechando o ciclo (KORPE;PETRI, 2012, PRENDERGAST; KELLY, 2016).

Esta constante exposição a contaminantes pode levar a quadros de inflamações recorrentes, causando alterações estruturais no intestino delgado que podem resultar em mudanças funcionais. Estas mudanças incluem achatamento e atrofia das vilosidades intestinais, presença de infiltrado inflamatório, hiperplasia das criptas intestinais, rompimento da barreira, com aumento da permeabilidade intestinal e translocação da microbiota comensal para a lâmina própria (KELLY et al. 2016).

Indivíduos acometidos por EE, possuem uma deficiência na absorção de diversos nutrientes e apresentam inflamação crônica, que podem contribuir para uma resposta imunológica intestinal deficiente, culminando em falhas nas respostas às vacinas orais, como a vacina *Sabin* contra a poliomielite. Além disso, estes indivíduos, principalmente crianças, possuem crescimento e desenvolvimento prejudicados (GILMARTIN et al, 2015). Por isso, vários grupos de pesquisa em todo o mundo têm estudado a fisiopatogenia desta doença, com ênfase nos estudos envolvendo: o efeito de infecções agudas subclínicas recorrentes, efeito da microbiota alterada (disbiose) e contribuição de dietas desbalanceadas para tais doenças.

Diante do exposto, acreditamos que condições que causem (1) alteração na função do sistema imune residente da mucosa intestinal, (2) alteração da composição da microbiota e (3) quebra da barreira intestinal podem estar associadas ao desenvolvimento de um amplo espectro de patologias que afetam o trato gastrointestinal, incluindo as doenças inflamatórias intestinais, EE e as alergias alimentares. Tais condições podem ser de origem infecciosa ou não, como no caso das alterações alimentares.

Sabemos que mudanças na dieta são capazes de alterar a microbiota comensal, e que essa alteração pode interferir no tônus imunológico tecidual. Essa mudança na resposta imunológica pode desencadear um processo inflamatório crônico no intestino que, pode tanto influenciar no metabolismo e interferir no crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, principalmente em um contexto de déficit proteico (desnutrição), quanto comprometer a capacidade do indivíduo de responder às vacinas e combater patógenos orais.

Dessa forma, a hipótese do nosso trabalho foi que o consumo de dietas desbalanceadas pode interferir na homeostase imunológica da mucosa intestinal e conseqüentemente levar a alterações permanentes da forma como esse

sistema comporta-se mediante desafios ambientais como, por exemplo, infecções e exposição a antígenos alimentares. Entender os motivos que impedem o retorno da função intestinal após a eliminação dos agentes estressores é o grande desafio para a erradicação de patologias intestinais mediadas pelo sistema imunológico.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito de uma dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos na homeostase imunológica intestinal e as consequências sistêmicas deste efeito.

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Determinar o efeito da alteração da dieta sobre o crescimento e desenvolvimento ósseo dos animais, assim como sobre a estrutura morfológica e o infiltrado leucocitário no intestino delgado;
2. Caracterizar o efeito diferencial da dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos sobre as diferentes porções do intestino delgado;
3. Estudar o efeito do uso de dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos sobre a resposta contra infecções intestinais subclínicas;
4. Estudar o efeito do uso de dieta desbalanceada hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos sobre a resposta contra antígenos alimentares;
5. Determinar a contribuição da microbiota alterada por infecção e da dieta para o déficit do desenvolvimento e inflamação desenvolvidos frente à infecção intestinal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6, OTII/Rag<sup>-/-</sup> (CD45.2<sup>+</sup>), com 4 semanas de idade, obtidos do Biotério de Criação de Animais da Faculdade de Medicina – USP e do biotério de Criação de Animais Transgênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos, com ciclos alternados de 12h claro/escuro e foram fornecidos água e ração *ad libitum*. Todos os camundongos foram acondicionados no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, protocolo nº49/2016 (**ANEXO I**). A eutanásia dos animais foi realizada pela inoculação de dose excessiva de anestésico cetamina (375 mg/Kg) e xilazina (37,5 mg/Kg) por via intraperitoneal.

#### 3.2 Dietas Especiais

Diferentes grupos de camundongos foram submetidos à dieta controle e à dieta desbalanceada imediatamente após o desmame. Esta dieta consistiu em uma composição hipoproteica/hipolipídica e baseada em carboidratos (**Tabela 1**), contudo para facilitar a descrição dos resultados, a partir deste momento, a dieta será apenas denominada como hipoproteica. As dietas foram obtidas junto à empresa RHOSTER.

	Dieta hipoproteica	Dieta Controle
Proteínas (% / peso)	5.8	17.7
Carboidratos (% / peso)	72.8	57.1
Lipídeos (% / peso)	1.9	5.9
Kcal/g	3.3	3.5

**Tabela 1. Principais componentes das dietas controle e hipoproteica.** Porcentagem dos principais constituintes das dietas controle e hipoproteica.

### **3.3 Pesagem semanal**

Os animais foram identificados individualmente e, durante o tratamento com a dieta, os animais foram pesados semanalmente. Conforme indicado nas figuras, os animais submetidos à infecção foram pesados semanalmente, obedecendo sempre a um mesmo dia e horário na semana. Os animais que foram submetidos à transplante fecal, foram pesados a cada três dias até completarem duas semanas após o transplante, e após este período, foram pesados semanalmente, também obedecendo a um mesmo dia e horário na semana.

### **3.4 Infecção Oral**

Para a infecção, a bactéria *Y. pseudotuberculosis* (cepa IP32777) foi cultivada em meio líquido 2XYT (*Becton, Dickinson and Company*), a 25°C por 18h, sob agitação vigorosa. Após crescimento, a concentração de bactérias foi quantificada de acordo com a densidade óptica da cultura (obtida em 600nm), interpolada em uma curva de crescimento bacteriano previamente padronizada no laboratório. Os camundongos foram mantidos em jejum de 12h antes da infecção, que foi realizada por gavagem de 200µL de solução salina contendo  $1 \times 10^7$  ou  $1 \times 10^5$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Y. pseudotuberculosis*, conforme indicado nas figuras.

### **3.5 Transplante de conteúdo fecal**

Camundongos C57BL/6 com 6-8 semanas de idade foram infectados com a bactéria *Y. pseudotuberculosis*. Após o período de infecção ativa (4 semanas) os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésicos e os intestinos coletados em condições anaeróbicas. O conteúdo cecal foi retirado, homogeneizado em PBS (200mg/mL) e, após repouso de 10 min, foi congelado em tampão fosfato salino (PBS, do inglês phosphate buffered saline) anaeróbico, contendo 10% de glicerol (Sigma Life Sciences). Camundongos desmamados com 3 semanas de idade receberam 200µL desse conteúdo por gavagem, uma vez ao dia, por três dias consecutivos.

### **3.6 Avaliação do desenvolvimento ósseo e da distribuição de gordura corporal**

Para avaliar a distribuição corporal da gordura, os animais foram expostos ao In-Vivo Imaging System FX PRO no Centro de Facilidades para Pesquisa (CEFAP) -ICB / USP. Foram utilizados raio X com alta energia (filtro de 0.8mm) e raio X total (sem filtro – 0.0). A razão entre as duas imagens adquiridas foi calculada para avaliar a gordura corpórea nos animais. Para a mensuração do desenvolvimento ósseo foi utilizado o software ImageJ para mensurar fêmur, cauda e altura corporal na imagem de Raio X.

### **3.7 Histologia**

A coloração de hematoxilina e eosina (HE) foi utilizada para avaliar a estrutura histológica do intestino, previamente fixado em Formaldeído 10% (Synth). O intestino também foi corado com ácido periódico-Schiff- PAS (do inglês *Periodicacid-Schiff*), para avaliação da quantidade de muco. As peças foram enviadas à empresa Histocell para processamento em parafina, seguido de coloração, sendo preconizado uma espessura de 5 micrômetros para cada corte.

### **3.8 Obtenção de células do intestino**

As células da Lâmina Própria intestinal foram obtidas de acordo com protocolo previamente padronizado (FONSECA, HAND et al. 2015). Para tal, o intestino foi coletado e lavado em PBS; as células intraepiteliais foram removidas por meio de agitação manual vigorosa em meio RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Sigma-Aldrich) contendo 2mM de EDTA (LGC Biotecnologia).

Para extração das células da lâmina própria intestinal, o tecido adiposo mesentérico foi removido e o conteúdo do interior do intestino foi lavado duas vezes em PBS (1X). As amostras foram transferidas para uma placa de 6 poços, preenchidas com RPMI contendo 3% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após este processo, as amostras foram transferidas para tubo cônico, onde passaram por três etapas de agitação vigorosa por 30 segundos em RPMI/SFB/EDTA. Essa etapa é importante para que haja remoção do muco.

Depois da etapa de agitação, os intestinos foram transferidos para um Erlenmeyer contendo RPMI incompleto, 5mM EDTA e 0,145mg/mL de DTT, e incubados por 25min, a 37°C e 220 rpm, etapa na qual as junções epiteliais começam a ser desfeitas.

Após a etapa de incubação, os intestinos foram filtrados e transferidos para tubo cônico contendo meio RPMI incompleto (não suplementado) e 2mM de EDTA. Esse conteúdo foi novamente agitado por 30 segundos e este procedimento foi repetido três vezes, sendo que entre cada repetição, os intestinos foram filtrados em peneira metálica.

Para a etapa de digestão, o tecido foi transferido para um béquer contendo solução de digestão grau IV (0,75mg/mL) (Sigma-Aldrich) e DNase I (0,5mg/mL) (Sigma-Aldrich) e incubou-se por 25min, a 37°C e 180rpm. Após o processo de digestão, as amostras foram filtradas em *Cell Strainer* (NEST Scientific) de 70µm e em seguida foram adicionados 10mL de meio RPMI contendo 3% de SFB. A suspensão celular foi centrifugada por 6 minutos, a 4°C, e a 1600 rpm. Após a centrifugação as amostras foram novamente filtradas em *Cell Strainer* de 70µm centrifugas e ressuspensas em meio RPMI contendo 5% de SFB, penicilina/estreptomicina (Hyclone), L-glutamina (Sigma-Aldrich), betamercaptoetanol (Sigma-Aldrich), aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich) e de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich). As amostras foram mantidas em gelo para realização da marcação fenotípica por citometria de fluxo.

### **3.9 Marcação de células para análise fenotípica e funcional por citometria de fluxo**

As diferentes amostras de suspensão celular foram processadas para identificação de moléculas de superfície, intracelulares e intranucleares, de acordo com o protocolo descrito abaixo.

Para a marcação de moléculas extracelulares (superfície) as seguintes etapas foram seguidas: 100 µL ( $2 \times 10^6$  células) das células extraídas foram transferidas para uma placa de fundo "U" de 96 poços; o volume foi completado com solução salina balanceada de Hanks (HBSS, do inglês *Hank's Balanced Salt Solution*) (LGC Biotecnologia). As células foram marcadas com corante de viabilidade celular LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stains (LD, Thermo Fisher Scientific), (L/D 1:1000), e lavadas com tampão de FACS (PBS + 2% de SFB).

Para lavagem, as células foram centrifugadas durante 2 minutos, a 1600 rpm e ressuspensas em 30µL da mistura de anticorpos, juntamente com anticorpos anti-receptor para porção Fc de anticorpos (anti-CD16/32), para bloqueio. Em seguida, as células foram incubadas por 30min, a 4°C, protegidas da luz. As células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS e fixadas com paraformaldeído 2% (Electron Microscopy Sciences) (100 µL por poço) por 20 min, à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram lavadas com tampão FACS, centrifugadas durante 2 minutos, a 1600 rpm e finalmente ressuspensas em 200 µL de tampão de FACS. As amostras foram mantidas a 4°C, protegidas da luz até a leitura no equipamento BD LSRFortessa- BD Biosciences.

Para a marcação intranuclear de fatores de transcrição, as seguintes etapas foram seguidas: 100 µL ( $2 \times 10^6$  células) foram transferidas para uma placa de fundo “U” de 96 poços, centrifugadas durante 2 min, a 1600 rpm, ressuspensas em 30 µL de corante L/D (1:1000 em HBSS) e incubadas por 20min, a 4°C, protegidas da luz.

Após a primeira incubação, as células foram lavadas duas vezes com HBSS (200 µL/poço); ressuspensas em 30 µL da mistura de anticorpos de superfície; incubadas novamente por 30 min, a 4°C. Após a segunda incubação, foram lavadas duas vezes com tampão FACS (200 µL/poço), ressuspensas (100 µL/poço) em tampão de fixação (EbioScience) diluído (1 parte do tampão + 3 partes do diluente) e incubadas por 30min, a 4°C. Todo o procedimento após a incubação com os anticorpos foi realizado protegido da luz.

Depois dessas etapas, as células foram lavadas duas vezes com 200 µL/poço do tampão de permeabilização *Perm Wash* (EbioScience) diluído em água Milli-qQ (1x); ressuspensas com a mistura de anticorpos contra moléculas intra-nucleares diluídos em *Perm wash* (30 µL/poço); incubadas por 1h, a 4°C; lavadas duas vezes com *Perm Wash* (200 µL/poço); lavadas uma vez com tampão de FACS e por fim, ressuspensas em 100 µL de tampão de FACS.

Para avaliar a produção de citocinas,  $2 \times 10^6$  células (100 µL ) foram transferidas para uma placa de fundo “reto” de 96 poços e incubadas com 200 µL/poço de uma solução meio RPMI completo contendo estímulo: acetato miristato de forbol (PMA, do inglês, *Phorbol Myristate Acetate*) (50µg/mL)

(Invitrogen), Ionomicina (500µ/mL) (Sigma-Aldrich) e Brefeldina A (BD Biosciences), por 4 horas em estufa com controle de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação o conteúdo foi transferido para uma placa de fundo “U” de 96 poços, centrifugado durante 3 min, a 1600 rpm, ressuspensão em HBSS (procedimento realizado duas vezes). Em seguida, a suspensão celular foi incubada com 30 µL/ poço da mistura de anticorpos de superfície, juntamente com anticorpo anti-receptor para porção Fc de anticorpos (anti-CD16/32) durante 30 minutos a 4°C, protegido da luz.

Após esta etapa, as células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS (200 µL/poço), ressuspensas em 50 µL de tampão *Citofix/Citoperm* (BD Biosciences) e incubadas por 20 min, a 4°C, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com o tampão *Perm Wash* (BD Biosciences) e foram adicionados 30 µL/poço da mistura de anticorpos intracelulares e as amostras foram incubadas por 2 h, a 4°C, protegidas da luz. Ao final da incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão *Perm Wash* (BD Biosciences), uma vez com tampão de FACS e finalmente, ressuspensas em 100 µL/poço de tampão de FACS.

Todos os clones dos anticorpos utilizados estão descritos na **Tabela 2**. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences), e todas as análises de citometria foram realizadas com o auxílio do software FlowJo® (BD-Biosciences).

### 3.10 Anticorpos utilizados

Anticorpo	Marca	Clone	Anticorpo	Marca	Clone
B220	Ebioscience	47-0452-82	IL-5	Biologend	TRFK5
CCR2	RD	FAB5538P-100	IL-13	Ebioscience	Ebio13a
CD4	Biologend	100547	IL-17	Ebioscience	Ebio17B7
CD8b	Biologend	YTS156.7.7	IL-22	Biologend	Poly5164
CD11b	Biologend	M1/70	LD	Invitrogen	N/A
CD11c	Biologend	117336	Ly6C	Biologend	HK1.4
CD44	Biologend	IM7	Ly6G	Biologend	127626
CD45	Biologend	30-F11	Ki67	Biologend	652426
CD64	Biologend	X54-5/7.1	MHC II	Biologend	M5/114.15.2
CD103	Ebioscience	46-1031-82	NK1.1	Biologend	108736

CD206	Biolegend	C068C2	RORvt	Ebioscience	46-6981-82
FC Block (anti-CD16/32)	Bioxcell	2.4G2	SiglecF	BD Biosciences	562757
FOXP3	Ebioscience	12-5773-82	Tbet	Ebioscience	EBIO4B10
GATA3	BD	560077	TCRb	Ebioscience	47-5961-82
IL-4	Biolegend	11B11	Thy1.2	Biolegend	105331

**Tabela 2. Anticorpos monoclonais utilizados.**

### 3.11 Estratégias de análise dos resultados de citometria de fluxo

Para as estratégias de análise das populações celulares, com o intuito de selecionar as células de interesse, foram delimitadas (realização de gate) somente as células vivas (CD45<sup>+</sup> LD<sup>-</sup>). Além disso, as células duplicadas foram excluídas. Depois, foram utilizados os parâmetros SSC-A (granulosidade) por FSC-A (tamanho) para localização dos leucócitos. No painel de anticorpos para marcação extracelular de moléculas inatas foram plotados os gráficos para: Neutrófilos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>MHCII<sup>-</sup>); Eosinófilos (CD11b<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>MHCII<sup>-</sup>); Macrófagos (CD64<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>-</sup>); Monócitos (CD11b<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>MHC<sup>low</sup>) e Células Dendríticas (MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> ou MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> ou MHCII<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>), todas analisadas em populações negativas para Ly6C, Ly6G, CD64, SiglecF, CD19 e TCRβ.

Para a marcação de células T, ILCs, e fatores de transcrição foram feitas as gates para: células T CD4<sup>+</sup> (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), células T CD8<sup>+</sup>(Singlets->Live> Linfócitos>Thy1.2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), ILC (Thy1.2<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>), Th1(T CD4<sup>+</sup>Tbet<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>), Th2 (T CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup>), Th17 (T CD4<sup>+</sup>ROR-γt<sup>+</sup> GATA3<sup>-</sup>), Treg (T CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>),Treg GATA3<sup>+</sup>(TCD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), ILC1 (Thy1.2<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>Tbet<sup>+</sup>GATA3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+/-</sup>), ILC2 (Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>RORgt<sup>+</sup>) e ILC3 (Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>Rorgt<sup>+</sup> GATA3<sup>-</sup>).

Quanto a marcação intracelular de citocinas secretadas por células linfóides inatas (TCRβ<sup>-</sup>) e adaptativas (TCRβ<sup>+</sup>) foram feitas as gates para IFN-γ (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>-/+</sup>CD4<sup>+</sup>D44<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup>IL-17<sup>-</sup>), IL-17 (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>-/+</sup>CD4<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IL5<sup>-</sup>), IL-22 (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>-/+</sup>CD4<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>IL-5<sup>-</sup>),IL-5

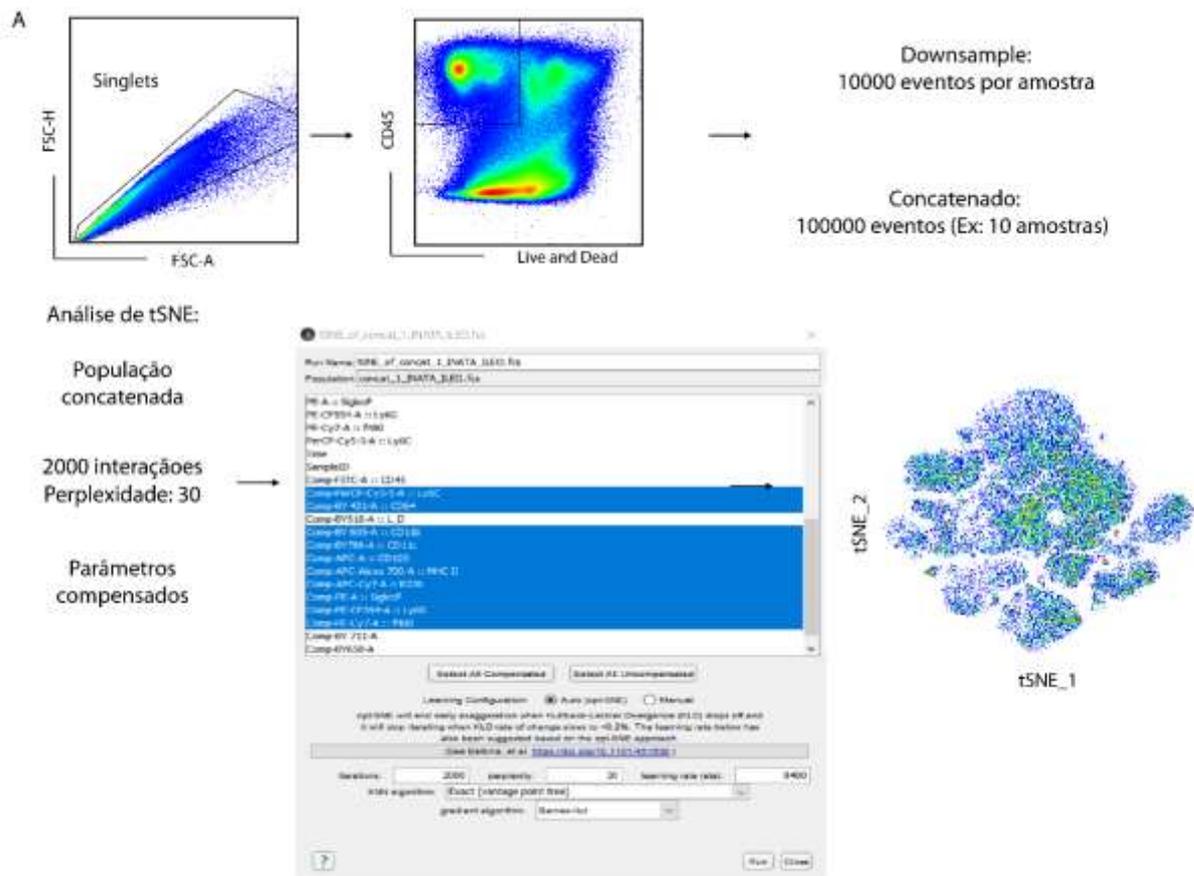
(Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>-/+</sup>CD4<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>IL-22<sup>-</sup>IL-5<sup>+</sup>) e IL-4 (Singlets>Live> Linfócitos> Thy1.2<sup>+</sup>TCRβ<sup>-/+</sup>CD4<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>IL-22<sup>-</sup>).

### 3.12 Análise de tSNE

Realizamos a análise multifatorial dos marcadores utilizados na citometria de fluxo para caracterização das células, além da análise de citometria usual. Para tal, utilizamos o algoritmo “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE) para redução de dimensionalidade. Este algoritmo é capaz de agrupar todos os parâmetros adquiridos na análise por ordem de interação, os aproximando de acordo com a similaridade dos marcadores.

Para as marcações extracelulares, realizamos a amostragem dos eventos (*DownSample*) dos leucócitos vivos (Live and Dead<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>). As populações foram concatenadas, agrupando os marcadores similares e em seguida aplicamos o algoritmo, utilizando um total de 10000-100000 eventos por amostra, que foi o número padronizado para melhor visualização dos resultados (**Figura 4**). O mesmo processo foi realizado para as marcações intracelulares (fatores de transcrição e citocinas).

Após as interações, os grupos experimentais foram separados e foi realizada a delimitação das populações celulares em cada grupo. Utilizamos as mesmas estratégias de gate utilizadas na análise convencional.



**Figura 4: Análise “t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding” (tSNE).** Foi realizada a análise convencional de citometria de fluxo, com a finalidade de obter os leucócitos viáveis. (Live and Dead/CD45<sup>+</sup>). Foi realizado o “DownSample” dessa população celular e em seguida a mesma foi concatenada (agrupadas por similaridade de marcadores). Utilizamos 10000-100000 eventos por amostra, ou seja, em um grupo experimental de 10 amostras, teremos um total de 100000-1000000 eventos na população concatenada. Para o processo de concatenação, aplicamos os parâmetros pré estabelecidos de 2000 interações, perplexidade=30 e selecionamos apenas os marcadores de interesse (para marcações extracelulares e intracelulares) e parâmetros compensados. Por fim, aplicamos o algoritmo tSNE.

### 3.13 Translocação bacteriana

Para avaliar a translocação de bactérias viáveis do trato gastrointestinal para locais extra intestinais (mLNa, fígado e baço), foi realizada a eutanásia dos animais e retirados os órgãos em condições estéreis. Os órgãos foram macerados em PBS estéril e filtrados em *Cell Strainer* 70 µm. Aliquotas de 10 e 100 µL foram transferidas para os meios de cultura MacConkey e BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*). As placas foram incubadas por 48h, a 37°C e o crescimento bacteriano foi acompanhado por meio da contagem de UFCs.

### 3.14 Hemograma

Para a realização do hemograma foi utilizado o analisador hematológico automático BC-2800Vet da Mindray, que se encontra no serviço de citometria do Departamento de Imunologia. Este equipamento é utilizado para fazer hemograma de animais, utilizando amostras de sangue total com anticoagulante (EDTA). A amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca, logo após a eutanásia dos animais e foi adicionado 10% de anticoagulante EDTA (LGC Biotecnologia).

O aparelho fornece os seguintes parâmetros: RBC = GV – glóbulos vermelhos ou eritrócitos; HCT = Ht – hematócrito; HGB = Hb – hemoglobina; MCV = VCM – volume corpuscular médio (tamanho das células); MCH = HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM = MCHC – concentração de hemoglobina corpuscular média (concentração de hemoglobina das hemácias); RDW-CV = ADVGVC – coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; RDW-SV = ADVGSD – desvio padrão da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; PLT – Plaquetas MPV = VPM – volume plaquetar médio; WBC = GB – Leucócitos (células brancas); LYMPH% = %LINF – porcentagem de linfócitos; Mid# = nº med – célula de tamanho média (eosinófilo, basófilo, monócito); Gran# = nº gran. – granulócitos (neutrófilos); % méd = mid% - porcentagem de células de tamanho médio; Gran% = %gran – porcentagem de granulócitos; PDW = ADP – amplitude da distribuição de plaquetas; PCT = Plaquetócrito.

### 3.15 Transferência celular e marcação com Cell Tracer Violet

Baço e linfonodos de camundongos Rag<sup>-/-</sup> com TCR transgênico OT-II (CD45.2) foram coletados e macerados em *Cell Strainer* 70 µm em meio RPMI incompleto (com antibiótico). O conteúdo foi centrifugado durante 8 min, a 4°C e 1600 rpm e os glóbulos vermelhos foram lisados com 300 µL de tampão de lise ACK. Após a lise, o conteúdo foi centrifugado 8 min, a 4°C e 1600 rpm e as células foram contadas em Câmara Neubauer. A suspensão celular foi transferida para um tubo cônico contendo HBSS estéril pré-aquecido (37°C), de modo que a concentração celular foi de 10<sup>8</sup> células/mL. Em outro tubo, foi colocado o mesmo volume de HBSS usado na suspensão celular e adicionado o corante Cell Tracer Violet (Invitrogen), 1 µl para cada 1x10<sup>8</sup> células/mL.

A solução com o corante Cell Tracer Violet foi adicionada à suspensão celular e incubada durante 20 min, a 37 °C, sendo agitada manualmente a cada 5 minutos e logo após foram adicionados 5 volumes de HBSS estéril contendo 10% de SFB. A solução foi incubada no gelo por mais 10 min, sendo homogeneizado manualmente a cada 3 min. A solução foi centrifugada durante 8 min, a 4°C e a 1500 rpm. Em seguida as células foram recontadas.

Após esta etapa, as células foram marcadas com L/D e com as moléculas de superfície TCR $\beta$ , CD4 e CD44. Utilizamos o citômetro de fluxo para quantificar os linfócitos naives CD4<sup>+</sup>. Ajustamos a solução para a concentração de 1X10<sup>6</sup> células TCD4<sup>+</sup> naives/100  $\mu$ L por animal e administramos em camundongos CD45.1<sup>+</sup>, pela via intravenosa.

### **3.16 Ensaio de rastreamento da resposta específica para antígenos orais**

A transferência celular descrita no item 3.15, foi realizada em camundongos CD45.1<sup>+</sup> de 10 semanas de idade alimentados com as dietas controle ou hipoproteica por 6 semanas. Após um dia da transferência, os camundongos receberam ovalbumina (OVA grau IV; Sigma-Aldrich) (1,5%) na água de beber, todos os dias, durante uma semana. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados com dose excessiva de anestésicos e o intestino delgado e linfonodo mesentérico foram removidos, processados e marcados com anticorpos de superfície e intracelular para análise do rastreamento e diferenciação das células transgênicas OTII transferidas.

### **3.17 Análise estatística**

Os dados foram expressos a partir da média  $\pm$  desvio padrão e os resultados comparados usando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey em experimentos com mais de dois grupos. No caso de experimentos com apenas dois grupos experimentais, foi utilizado a análise com teste T (não-pareado). O software utilizado foi o Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## **BIBLIOGRAFIA**

## 7. BIBLIOGRAFIA

AHERN, P.P.; MALOY, K.J. Understanding immune-microbiota interactions in the intestine. **Immunology**. V.159, n.1, p.:4-14. 2019. doi:10.1111/imm.13150.

AHMAD, R.; SORRELL, M.; BATRA, S. et al. Gut permeability and mucosal inflammation: bad, good or context dependent. **Mucosal Immunol**. v. 10, p.307–317.2017. Disponível: <https://doi.org/10.1038/mi.2016.128>.

Ameri, K; Harris, A.L. **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**. 2010. Disponível em: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ATF4ID44413ch22q13.html>.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E. et al. Entero types of the human gut microbiome. **Nature**.v.473, p.174–180. 2011.

ATARASHI, K.; TANOUE, T.; HONDA, K. Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. **Vaccine**. v.28, n.50, p. 8036-8038,2010.

BELKAID, Y.; BOULADOUX, N.; HAND, T. W. "Effector and memory T cell responses to commensal bacteria." **Trends Immunol**. v. 34, n.6, p. 299-306.2013.

BELKAID, Y.; HAND, T. W. "Role of the microbiota in immunity and inflammation." **Cell**. V. 157, n. 1, p.121-141. 2014.

BROWN, E.M.; WLODARSKA, M.; WILLING, B.P. et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nat Commun**. v.4, n.6, 2015. doi: 10.1038/ncomms8806.

CHARTOUMPEKIS, D.V.; HABEOS, I.G.; ZIROS, P.G.; PSYROGIANNIS, A.I. et al., Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. **Mol. Med**. v.17, n.7, p. 736–740. 2011.

CONG, Y.; FENG, T.; FUJIHASHI K. "A dominant, coordinated T regulatory cell IgA response to the intestinal microbiota." **Proc Natl Acad Sci USA**. v.106. n.46, p.19256-19261. 2009.

COUTEUR, D. G. L.; SOLON-BIET, S.; COGGER, V.C. et al. The impact of low-protein high-carbohydrate diets on aging and lifespan. **Cell Mol Life Sci**. v.73, n. 6, p. 1237–1252. 2015. doi: 10.1007/s00018-015-2120-y.

CRAVEN, M.; EGAN, C. E.; DOWD, S. E. et al. "Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease." **PLoS One**. v. 7, n. 7. 2012.

DE SIQUEIRA, M.K. et al. Acute infection imposes a long-term remodeling of host metabolism in a microbiota-dependent manner. **Em preparação para submissão (Cell Metabolism).**

DILLON, A.; LO, D.D. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. **Front. Immunol.** v.10.Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01499>.

DOMINGUEZ-BELLO, M.G.; BLASER, M.J.; LEY, R.E. et al. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. **Gastroenterology**.v.140, p.1713–1719.2011.

ENKIN, M.; KEIRSE, M.J.N.C.; NEILSON, J. et al. **Guia para atenção efetiva na gravidez e no parto.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ESTERHÁZI, D. et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. **Nature.** v.569, p. 126-130. 2019.

FONSECA, D. M. et al. Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity Article Microbiota-Dependent Sequelae of Acute Infection Compromise Tissue-Specific Immunity. **Cell**, v. 163, n. 2, p. 354–366, 2015.

Gonçalves, J.; Yaochite, J. et al. **Bases do Sistema Imunológico Associado à Mucosa Intestinal.** 2016.

GILMARTIN, A. A.; PETRI, W.A. JR. Exploring the role of environmental enteropathy in malnutrition, infant development and oral vaccine response. **Philos Trans R SocLond B Biol Sci.** v. 19; n. 370. 2015. doi: 10.1098/rstb.2014.0143. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527388/>

HAMMERSCHMIDT, S. I.; AHRENDT, M.; BODE, U. et al. "Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo." **J Exp Med.** v. 205, n.11, p. 2483-2490. 2008.

HAND, T. W.; DOS SANTOS, L. M.; BOULADOUX, N. et al. "Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses." **Science.** v.337, n.6101, p.1553-1556. 2012.

HAND, T. W.; VUJKOVIC-CVIJIN, I.; RIDAURA, V. K.; BELKAID, Y. "Linking the Microbiota, Chronic Disease, and the Immune System." **Trends Endocrinol Metab.** v.27, n. 12, p. 831-843. 2016.

HAND, T.W. The Role of the Microbiota in Shaping Infectious Immunity. **Trends Immunol.** v.37, n.10, p.647–658. 2016. doi:10.1016/j.it.2016.08.007.

HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A. et al. "Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following

oral infection with *Toxoplasma gondii*." **J Immunol.** v.177, n.12, p. 8785-8795. 2006.

HONDARES, E.; IGLESIAS, R.; GIRALT, A.; GONZALEZ, F. et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. **J. Biol. Chem.** v. 286, n. 15, p.12983–12990. 2011.

HOU, Y.C.; CHU, C. C.; KO, T.L. et al. Effects of alanyl-glutamine dipeptide on the expression of colon-inflammatory mediators during the recovery phase of colitis induced by dextran sulfate sodium. **Eur J Nutr.** v.52, p.1089–1098. 2013. doi:10.1007/s00394-012-0416-3

HUANG, X.; HANCOCK, D.P.; GOSBY, A.K. et al. Effects of dietary protein to carbohydrate balance on energy intake, fat storage, and heat production in mice. **Obesity** v.21, p.85–92. 2013.

IJICHI, S.; KUSAKA, T.; OKADA, H.; FUJISAWA, T.; KOBARA, H.; ITOH, S. "Terminal ileitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* mimicking Crohn disease in childhood." **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** v.55, n.4, p.125. 2012.

IVANOV, I.I.; ATARASHI, K.; MANEL, N. "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria." **Cell.** v.139, n. 3, p. 485-498. 2009.

JOERIS, T.; MULLER-LUDA, K.; AGACE, W.W.; MOWAT, A.M. Diversity and functional of intestinal mononuclear phagocytes. **Mucosal Immunol.** V.10, n.4, p.845-864, 2017.

KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R. S. "Inflammatory bowel disease." **Annu Rev Immunol** v.28, p. 573-621. 2010.

KELLY, P.; BESA, E.; ZYAMBO, K. et al. Endoscopic and Transcriptomic Analysis of Impaired Barrier Function and Malabsorption in Environmental Enteropathy. **PLoS Negl. Trop. Dis.**v.10,n.4. 2016. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050312>.

KIM, C.J.; KOVACS-NOLAN, J.A.; YANG, C. et al. Tryptophan exhibits therapeutic function in a porcine model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. **J Nutr Biochem.** v.21, p.468–75. 2009. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.01.019

KORPE, P.S.; PETRI, W.A. Environmental enteropathy: critical implications of a poorly understood condition. **Trends Mol Med.** v.18, n.6, p.328-36.2012. doi: 10.1016/j.molmed.2012.04.007.

KORPE, P. S.; STOTT, B. R.; NAZIB, F. et al. "Evaluation of a rapid point-of-care fecal antigen detection test for *Entamoeba histolytica*." **Am J Trop Med Hyg.** v.86, n.6, p. 980- 981. 2012.

KOSEK, M.N. et al. Causal Pathways from Enteropathogens to Environmental Enteropathy: Findings from the MAL-ED Birth Cohort Study. **EBioMedicine.**v.18. p. 109–11. 2017.

LAMPS, L. W.; MADHUSUDHAN, K. T.; HAVENS, J. M. et al. "Pathogenic Yersinia DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease." **Am J Surg Pathol**. v.27, n. 2, p. 220-227. 2003.

LEW, C.C.H.; YANDELL, R.; FRASER, R.J. et al. Association between malnutrition and clinical outcomes in the intensive care unit: A systematic review. **J. Parenter. Enter. Nutr.** v.41, p. 744-758. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1177/0148607115625638#accessDenialLayout>.

LINDEN, S.; SUTTON, P.; KARLSSON, N. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunol**. p.183–197.2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mi.2008.5>.

LI, Y.; JIN, L.; CHEN, T. The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. **Biomed Res Int**. 2020. doi:10.1155/2020/2032057

LI, Z.; RAVA, M.; BEDARD, A. et al. Cured meat intake is associated with worsening asthma symptoms. **Thorax**. v. 72, p.206–212. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208375. 2016.

LUPP, C.; ROBERTSON, M. L.; WICKHAM, M. E. et al. "Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae." *Cell Host Microbe*. v. 2, n. 3, p. 204. 2007.

MA, N.; YANAN, T.; YI, W.; XI, M. Contributions of the Interaction between Dietary Protein and Gut Microbiota to Intestinal Health. **Curr Protein Pept Sci**. 2017. doi: 10.2174/1389203718666170216153505.

MACPHERSON, A. J.; SLACK, E.; GEUKING, M. B.; MCCOY, K. D. "The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes." **Semin Immunopathol**. v.31, n.2, p.145-149. 2009.

MACPHERSON, A. J.; UHR. T. "Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria." **Ann N Y Acad Sci**. v.1029, p.36-43. 2004.

MACPHERSON, A. J.; UHR. T. "Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria." **Science**. v. 303, n. 5664, p.1662-1665. 2004.

MARCHIANDO, A. M.; GRAHAM, W. V.; TURNER, J. R. "Epithelial barriers in homeostasis and disease." **Annu Rev Pathol**. v. 5, p. 119-144. 2010.

MARCHIANDO, A. M.; SHEN, L.; GRAHAM, W. V. et al. "Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo." **J Cell Biol**. v.189, n. 1, p.111-126. 2010.

MARTIN, R.; NAUTA, A.J.; BEN, A. K. et al. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. **Benef Microbes**. v.1, p.367–382. 2010.

MENEZES, J.S.; MUCIDA, D.S.; CARA, D.C. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **Int Immunol**. v.15, n. 3, p.447-455. 2003. doi:10.1093/intimm/dxg043.

MOLLOY, M. J.; GRAINGER, J. R.; BOULADOUX, N. et al. "Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis." **Cell Host Microbe**. v.14, n.3, p.318-328. 2013.

MONDAL, D.; MINAK, J.; ALAM, M. "Contribution of enteric infection, altered intestinal barrier function, and maternal malnutrition to infant malnutrition in Bangladesh." **Clin Infect Dis**. v.54, n. 2, p.185-192. 2012.

MUCIDA, D.S.; RODRÍGUEZ, D.; KELLER, A.C. 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.361-365. 2004. doi:10.1196/annals.1309.042.

OWEN, J.L.; MOHAMADZADEH, M. Microbial activation of gut dendritic cells and the control of mucosal immunity. **J Interferon Cytokine Res**. V.33, n.11, p.619-631, 2013.

PÉREZ-MARTÍ, A.; GARCIA-GUASCH, M.; TRESSERRA-RIMBAU, A. et al. A low-protein diet induces body weight loss and browning of subcutaneous white adipose tissue through enhanced expression of hepatic Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21). **Mol Nutr Food Res**. 2017 doi: 10.1002/mnfr.201600725.

PERXACHS, J.M.; BOLICK, D.T.; LENG, J. et al. Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype. **Am J Clin Nutr**. v. 104, n. 5, p.1253-1262. 2016. doi:10.3945/ajcn.116.131797

PETRI, W.A. JR.; NAYLOR, C.; HAQUE, R. Environmental enteropathy and malnutrition: do we know enough to intervene? **BMC Med**. v.12, n.187. 2014 doi: 10.1186/s12916-014-0187-  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4197320/>.

PRENDERGAST, A.J.; KELLY, P. Interactions between intestinal pathogens, enteropathy and malnutrition in developing countries. **Curr Opin Infect Dis**. v.29, n.3, p.229-236. 2016. doi:10.1097/QCO.0000000000000261.

RAPOZO, D. C.; BERNARDAZZI, C.; DE SOUZA, H. S. Diet and microbiota in inflammatory bowel disease: The gut in disharmony. **World journal of gastroenterology**, n. 23, v.12, p.2124–2140. 2017. doi:10.3748/wjg.v23.i12.2124.

RESCIGNO, M. Intestinal dendritic cells. **Adv Immunol**. v.107, p. 109-138, 2013.

RIDAURA, V. K. et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science**. v. 341, n. 6150.2013.

SANSONETTI, P. J. War and peace at mucosal surfaces. **Nat Rev Immunol**. v. 4, n. 12, p. 953–964. 2004. doi: 10.1038/nri1499.

SCHENK, M.; MUELLER, C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. Best Practice & research. **Clinical Gastroenterology**.v.22, n. 3, p. 391-409. 2008. doi: 10.1016/j.bpg.2007.11.002.

SOLON-BIET, S.; MCMAHON, A.; BALLARD, J.W.O. et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging and longevity in ad libitum-fed mice. **Cell Metab**. v.19, p.418–430. 2014.

STATOVCI, D.; AGUILERA, M.; MACSHARRY, J.; MELGAR, S. The Impact of Western Diet and Nutrients on the Microbiota and Immune Response at Mucosal Interfaces. **Front. Immunol**. v. 8, n. 838. 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00838

SUBRAMANIAN, S.; HUQ, S.; YATSUNENKO, T., et al. Persistent Gut Microbiota Immaturity in Malnourished Bangladeshi Children. **Nature**. v.510; p. 417-421. 2014.

SWARBRICK, E. T.; KINGHAM, J. G.; PRICE, H. L. et al. "Chlamydia, cytomegalovirus, and Yersinia in inflammatory bowel disease." **Lancet**. v. 2, n. 8132, p.11-12. 1979.

TURNER, J. R. "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." **Nat Rev Immunol**. v. 9, n.11, p.799-809. 2009.

UEMATSU, S. et al. Regulation and humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. **Nat Immunol**. v.9, n.7, p. 769-776,2008.

UNIGME -United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. 'Levels & Trends in Child Mortality: Report 2018, Estimates developed by the United Nations Inter-agency Group for Child Mortality Estimation', United Nations Children's Fund, New York, 2018. Disponível em: <https://childmortality.org/wp-content/uploads/2018/12/UN-IGME-Child-Mortality-Report-2018.pdf>.

VAROL, C. et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. **Immunity**. v.31, n.3, p.502-512, 2009.

WAGNER, V.E.; DEY, N.; GURUGE, J. et al. Effects of a gut pathobiont in a gnotobiotic mouse model of childhood undernutrition. **Sci Transl Med**. v.23, n.8. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5152673/>.

WALSON, J.L.; BERKLEY, J.A. The impact of malnutrition on childhood infections. **Curropin Infect Dis**. v. 31, n. 3. p. 231–236.2018. doi: 10.1097/QCO.0000000000000448.

WEI, Y.; ZHANG, Y.J.; CAI, Y.; XU, M.H. The role of mitochondria in mTOR-regulated longevity. **Biol Rev Camb Philos Soc.** v.90, p.167–181. 2015.

WEN, L.; WONG, F. S. Dietary short-chain fatty acids protect against type 1 diabetes. **Nature Immunology.** v. 18, n. 5, p. 484–486. 2017.

Zhu, B.; Wang, X.; Li, L. Human gut microbiome: the second genome of human body. **Protein Cell.**v.1, p.718–725. 2010.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875195/>

ZIPPI, M.; COLAIACOMO, M. C.; MARCHEGGIANO, A. et al. "Mesenteric adenitis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in a patient subsequently diagnosed with Crohn's disease of the terminal ileum." **World J Gastroenterol.** v.12, n.24, p.3933-3935. 2006.

**ANOTAÇÕES:**