

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Resposta imunológica e avaliação de alterações na mucosa intestinal em animais RAG *knockout*
alimentados com dieta contendo aminoácidos livres

Sara Cândida Barbosa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Resposta imunológica e avaliação de alterações na mucosa intestinal em animais RAG *knockout*
alimentados com dieta contendo aminoácidos livres

Sara Cândida Barbosa

Profa. Dra. Karine Rezende de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Dezembro - 2018

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora pela fé e amparo.

Aos meus pais, carinhosamente à minha mãe, meu espelho de força, pelo apoio durante esses quatro anos, eu consegui chegar até aqui porque você sempre esteve ao meu lado. Amo vocês!

Ao bebê mais lindo, Miguel, que me encheu de amores nesse caminho. Aos amigos/as Jean, Lilian, Laysla, Lorena, Jael, Jenifer, Adriana, Pedro... obrigada pela paciência e por serem meu refúgio.

À Karine Rezende, Luciana Calábria e Cida Satto pelos ensinamentos e por serem referência de determinação na ciência. À Tatiani Maioli pelas oportunidades e inspirações.

À todos/as os/as amigos/as que a UFU e Ituiutaba (MG) me deram, vocês foram essenciais nesses três anos e meio, e sou grata a cada um por tantos momentos especiais. À Ana Paula, Mariana Ribeiro, Danila, Alice, Luis Fernando, Jaqueline, Cida e, em especial, Natália Carvalho, obrigada pela parceria, gargalhadas, pelo carinho, pelos conselhos e alertas, pelas gordices, pelos roles de *bike*, por tudo, vocês são maravilhosos/as! À equipe do CEPAE, à equipe e aos meus alunos/as do AFIN/PIES Pontal, vocês brilham. À todos/as do RU e demais funcionários/as da UFU campus Pontal.

À UFMG, especialmente à toda equipe do LIB por me abrirem as portas! Ao Vinícius Dantas por se apresentar um ótimo supervisor de estágio e amigo, à Lícia Torres e Mariana de Almeida, pela parceria no laboratório, por tantos ensinamentos e pelo carinho, vocês são luz.

Ao Red Bar, Bar da 26, Resenha, Carlão, Cabral e a todos os bares que frequentei durante esse período, obrigada pelas encontros e cervejas.

Gratidão universo!

RESUMO

A falta de estimulação proteica modifica a arquitetura da mucosa intestinal e compromete a maturação do tecido linfóide associado ao intestino, porém ainda não está esclarecido se a presença de linfócitos convencionais interfere nesse processo. Camundongos da linhagem C57BL/6 e C57BL/6 deficientes para a enzima RAG (RAG^{-/-}) foram alimentados após o desmame com dietas experimentais AIN93G contendo 15% de caseína ou 15% aminoácidos livres, com o intuito de avaliar os seus efeitos no desenvolvimento da resposta imune e na arquitetura da mucosa intestinal. Independente da dieta consumida, os animais RAG^{-/-} ganharam menos peso quando comparados ao grupo controle e nenhum grupo apresentou acúmulo substancial de tecido adiposo. Animais C57BL/6 alimentados com a dieta de aminoácidos livres revelaram níveis maiores de IgM sérica quando comparados com os C57BL/6 que consumiram a AIN93G. A dosagem de sIgA fecal no sobrenadante e a morfometria das vilosidades não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Além disso, o consumo da AIN93G aumentou a presença de células caliciformes duodenais e colônicas em animais C57BL/6 quando comparados com RAG^{-/-}. Ainda, independente da dieta ingerida, animais C57BL/6 apresentaram maior número de linfócitos intraepiteliais quando comparados ao RAG^{-/-}. Assim, é possível concluir que a ausência de linfócitos pode dificultar o ganho de peso, aumentando a secreção de IgM e diminuindo a presença de células caliciformes e de linfócitos intraepiteliais, independente da dieta consumida.

Palavras chave: Resposta imune; Dieta; GALT

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	3
OBJETIVOS.....	5
METODOLOGIA	5
Animais.....	5
Dieta experimental.....	6
Peso corporal	7
Obtenção do Soro	7
Índice de adiposidade	8
Avaliação da síntese de IgA secretória (sIgA)	8
Ensaio Imunoenzimático para medida de IgM.....	8
Análise Histológica do Intestino Delgado	9
Morfometria das vilosidades	10
Quantificação de células caliciformes	10
Quantificação de linfócitos intraepiteliais (IELs).....	10
Análise Estatística	10
RESULTADOS	11
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1. INTRODUÇÃO

O estado nutricional de um indivíduo é capaz de modular a sua resposta imune dado ao fato que os nutrientes desempenham um amplo papel no desenvolvimento e na manutenção da homeostase do sistema imune (FARIA et al., 2013). A exposição aos antígenos da dieta através da alimentação e antígenos da microbiota desencadeiam uma resposta imune não inflamatória caracterizada pela tolerância imunológica com efeitos sistêmicos e locais (FARIA; WEINER, 2005).

Durante a digestão de macromoléculas no intestino delgado ocorre a estimulação de um perfil imunológico por antígenos da dieta, concomitante a algumas proteínas dietéticas intactas ou parcialmente degradadas que podem ser absorvidas e levadas para o sangue, gerando uma resposta imune ao alcançar órgãos sistêmicos, tanto em humanos quanto em camundongos (FARIA et al., 2013). Apenas peptídeos contendo oito resíduos de aminoácidos ou mais podem ser apresentados através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (SOUZA, 2016). Sendo assim, devido ao pequeno tamanho molecular, os aminoácidos em sua forma livre não são apresentados na fenda do MHC e, portanto, não são considerados moléculas antigênicas (FARIA et al., 2013), indicando que a forma de administração proteica pode influenciar a resposta imune.

O tecido linfoide associado ao intestino (*gut associated lymphoid tissue* - GALT) compõe o sistema imune do intestino sendo formado por um perfil celular especial que favorece a manutenção de um ambiente tolerogênico ao discriminar e responder apropriadamente aos antígenos (WEINER et al., 2011).

Os linfócitos intraepiteliais (*intraepithelial lymphocytes* - IEL) constituem uma população heterogênea de linfócitos T distribuídos entre os enterócitos do intestino delgado e são capazes de responder aos antígenos do lúmen, atuando assim na manutenção da barreira e da homeostase intestinal (SOUZA, 2016). Além disso, há outros tipos celulares, como, por exemplo, as células

caliciformes responsáveis pela produção de muco que constitui a primeira linha de defesa contra componentes microbianos (SOUZA, 2016).

As imunoglobulinas (Ig) são moléculas circulantes importantes na defesa contra antígenos (VAZ; CARVALHO, 2009) e possuem suas classes e funções definidas pela estrutura de sua cadeia polipeptídica pesada (MURPHY; TRAVERS; WALPPORT, 2010). A IgM é uma classe produzida durante o desenvolvimento da célula B, expressa no início da resposta imune, antes de ocorrer hipermutação somática (diversificação de classes) e maturação por afinidade. A troca de isotipo das Igs ocorre após a estimulação das células B por algum antígeno pelo mecanismo de recombinação genética (MURPHY; TRAVERS; WALPPORT, 2010), como, por exemplo, a imunoglobulina A secretória (sIgA) que possui efeitos locais na mucosa intestinal (FARIA et al., 2013).

O desenvolvimento de projetos experimentais pode contar com o sistema *in vivo* que proporciona condições naturais, envolvendo animais, como, por exemplo, camundongos, empregados na maioria das pesquisas em imunologia por possuir similaridade genética a humanos (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). Além disso, estes animais podem ter facilmente seu genoma manipulado (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007) para avaliar alterações específicas. Um exemplo é a linhagem RAG *knockout* (RAG^{-/-}), que é incapaz de gerar linfócitos B e T específicos, uma vez que não possuem os genes RAG que codificam enzimas com papel importante no rearranjo e recombinação dos genes de imunoglobulina e moléculas receptoras de linfócitos T durante o processo de recombinação genética (recombinação VDJ) (CHAGAS JÚNIOR, 2014).

De modo auxiliar, dietas experimentais são utilizadas em ensaios laboratoriais com animais para avaliar alterações diversas, inclusive no sistema imune da mucosa intestinal. Desta forma, Reeves, Nielsen e Fahey (1993) descreveram a dieta *growth* do *American Institute of*

Nutrition (AIN-93G), recomendada entre as dietas experimentais por apresentar a fórmula indicada para as fases de crescimento de camundongos, podendo ser amplamente utilizada em diferentes aplicações devido à facilidade de adaptação ao protocolo específico.

Alguns trabalhos já avaliaram os efeitos dessas dietas em camundongos C57BL/6, observando que a maturação do sistema imune nesses animais é prejudicada após a ingestão, além de provocar alterações intestinais como a redução das células caliciformes e IELs (MENEZES et al., 2003; SOUZA, 2016).

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da dieta contendo aminoácidos livres comparada à dieta de proteínas intactas na resposta imune sistêmica e de mucosa intestinal em camundongos na ausência de linfócitos, e verificar se os efeitos da presença da proteína da dieta na resposta imune são dependente dos linfócitos convencionais.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Camundongos C57BL/6 (n=6) e C57BL/6 *knockout* para a enzima RAG (n=13) (4 a 6 semanas de idade) com livre acesso a água e alimentação foram agrupados de acordo com o sexo e mantidos em micro isoladores coletivos do biotério do Laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob protocolo número 335/2017.

3.2. Dieta experimental

Após o desmame, os animais foram alimentados durante 11 semanas com dietas experimentais AIN93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) contendo 15% de caseína ou 15% aminoácidos livres (Rhostrer Indústria e Comércio Ltda., SP, Brasil) (MENEZES et al., 2003).

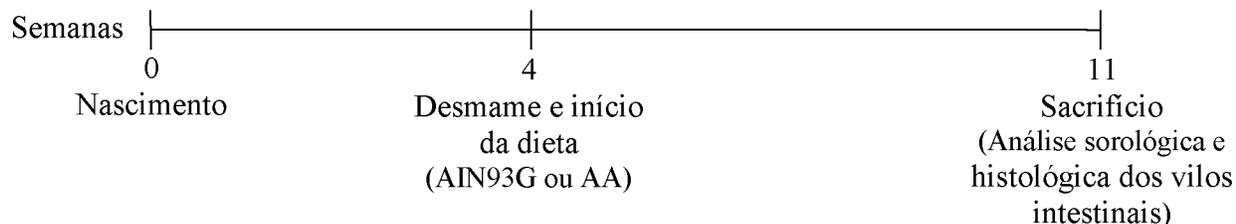


Figura 1: Delineamento experimental. Fonte: Elaborada pela autora.

As dietas possuem a composição nutricional semelhante, diferenciando-se apenas na fonte proteica, em que a AIN93G possui a caseína na forma intacta e a dieta de aminoácidos (AA) dispõe de aminoácidos livres em substituição proporcionalizada da caseína (Tabela 1). A distribuição foi realizada em forma de *pellet*, que consiste em uma operação de moldagem, na qual partículas finas são aglomeradas em uma forma compacta, visando reduzir o desperdício e facilitar a preensão e mastigação do alimento pelo animal (FARIAS, 2010).

Tabela 1: Composição dietética das dietas utilizadas AIN93G e aminoácidos livres (AA)

Dietas/ingredientes	AIN93G	AA
Amido de milho	397,486	397,486
Caseína láctea	150	-
Blender AA RN9526A	-	150
Amido dextrinizado	182	182
Sacarose (açúcar cristal)	100	100
Óleo de soja	70	70
Celulose MC – 101	50	50
Mix mineral AIN-93G	35	35
Mix vitamina	10	10
L-cistina	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5
<i>Tert-butylhydroquinone</i> (BHT)	0,014	0,014
Total (g)	1000	1000
Kcal/g	3,9	3,9
Composição centesimal (%)		
<i>Carboidratos</i>	69	69
<i>Proteínas</i>	15	15
<i>Lipídeos</i>	16	16

Fonte: Reeves, Nielsen e Fahey (1993 – Adaptada).

3.3. Peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente no mesmo dia e horário, em fluxo laminar para evitar possíveis contaminações. Manteve-se a temperatura local em aproximadamente 26°C, proporcionando a manutenção da temperatura corporal dos animais constante. O peso médio de cada grupo foi avaliado e expresso através da curva de crescimento.

3.4. Obtenção do Soro

Os animais foram anestesiados utilizando 100 µL de solução de 25% de Cloridrato de Quetamina e 25% Xilazina diluídas em 50% de salina fisiológica, aplicada via intraperitoneal. O sangue foi coletado através de pulsão cardíaca, transferido para microtubos e centrifugados a 12000 rpm por 20 minutos para separação do soro, seguido da coleta e armazenamento à -20°C para análises posteriores.

3.5. Índice de adiposidade

Para avaliar obesidade nos animais foi utilizado o índice de adiposidade. Antes do sacrifício, os camundongos foram pesados e, após a coleta do sangue, o tecido adiposo epididimal foi retirado e pesado (PEREIRA et al., 2018). Em seguida, realizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Índice de Adiposidade} = \frac{\text{peso do tecido adiposo epididimal}}{\text{peso corporal final}}$$

3.6. Avaliação da síntese de IgA secretória (sIgA)

Após o sacrifício dos animais, as fezes foram coletadas no cólon, pesadas e homogeneizadas em 100 mg/mL de tampão salina-fosfato (PBS). As análises foram realizadas de acordo com o protocolo de Torres (2018). Para avaliar os níveis de sIgA, anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1 mg/mL (Southern Biotechnology) foi diluído (1:10.000) em tampão carbonato (pH 9,6). A reação teve como controle positivo (padrão) anticorpos purificados IgA (10 µg/mL) (Southern Biotechnology) de camundongo em uma diluição 1:10 em PBS-caseína e como controle negativo utilizou-se somente PBS-caseína. Foi considerado como limite de detecção a concentração 12,5 pg/mL.

3.7. Ensaio Imunoenzimático para medida de IgM

Amostras de soro dos animais foram utilizadas para avaliar os níveis de IgM produzidos após a ingestão das dietas, segundo o protocolo de Souza (2016). Anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos 1 mg/mL (Southern Biotechnology) foi diluído (1:4.000) em tampão carbonato (pH 9,6). A reação teve como controle positivo (padrão) anticorpos purificados IgM (15 µg/mL) (Southern Biotechnology) de camundongo em uma diluição 1:10 em PBS-caseína e como controle negativo, somente o PBS-caseína. Foi considerado como limite de detecção a concentração 37,5 pg/mL.

3.8. Análise Histológica do Intestino Delgado

Após o sacrifício, os intestinos dos animais foram retirados e fragmentados em duodeno e cólon, conforme descrito por Souza (2016), e para confecção das lâminas foi utilizado o protocolo de Silva (2010). As imagens do intestino foram capturadas por uma microcâmera JVC TK-1270/RGB nos aumentos de 100x e 200x.

3.9. Morfometria das vilosidades

Para avaliação morfométrica dos vilos foi utilizado o programa *ImageJ* e as imagens capturadas no aumento de 100x a partir da região basal do vilo até seu ápice através de lamínula milimetrada, descontando-se as criptas (SILVA, 2010). Foram selecionados dois vilos íntegros por secção histológica em dez campos diferentes, sendo o resultado final apresentado como média de vinte vilosidades/animal.

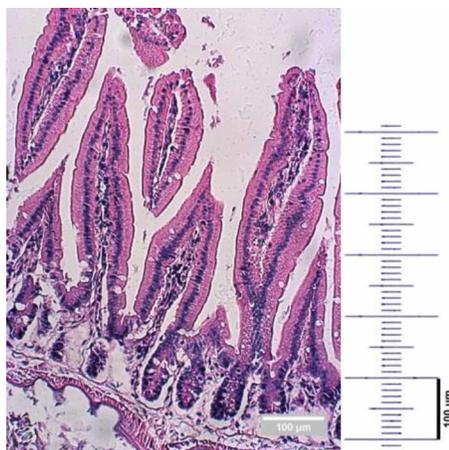


Figura 2: Exemplo do campo utilizado para análise morfométrica dos vilos intestinais.

Fonte: A autora.

3.10. Quantificação de células caliciformes

As células caliciformes do duodeno e do cólon foram identificadas nas imagens capturadas das lâminas histológicas coradas pela técnica hematoxilina-eosina (HE) (MELLO et al., 2012) em aumento de 100x com auxílio do programa *ImageJ*, as quais foram selecionadas através de diferentes *pixels* (SILVA, 2010). Foram consideradas todas as células caliciformes presentes nos vilos do duodeno (desconsiderando-se as criptas) de dez campos diferentes em cada animal, assim o resultado final é apresentado como a média de células caliciformes por animal. Considerou-se 500 μm de superfície do cólon (TORRES, 2018) de dez secções histológicas distintas em cada animal, de modo que o resultado expressa a média de células caliciformes em 500 μm/superfície do cólon por animal.

3.11. Quantificação de linfócitos intraepiteliais (IELs)

Os IELs foram identificados no aumento de 200x em microscópio de luz pela sua localização basal em relação aos núcleos dos enterócitos e por apresentarem pequeno halo claro

de citoplasma ao redor de seu denso núcleo esférico e regular (SILVA, 2010). Para a quantificação dos IELS com auxílio do programa *ImageJ*, foram consideradas 100 células epiteliais por cada dez fragmentos distintos de cada animal, não incluindo células caliciformes. O resultado é apresentado como a média de IELS em relação a 100 células epiteliais.

3.12. Análise Estatística

Para as avaliações estatísticas entre as variáveis utilizou-se o Teste *t* de *Student* e ANOVA considerando-se o nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Ao longo das onze semanas, o ganho de peso dos animais foi monitorado, observando-se diferença significativa ($p < 0,05$) a partir da terceira semana quando comparamos os camundongos RAG-/- alimentados com a dieta AIN93G com os animais controle (Figura 3A), sendo mantida até o dia do sacrifício. Já os animais alimentados com a dieta de aminoácidos, por sua vez, apresentaram diferença significativa ($p = 0,001$) a partir da quinta semana (Figura 3B). Simultaneamente, nenhum dos grupos analisados apresentou acúmulo substancial de tecido adiposo avaliado pelo índice de adiposidade (Figura 3C), ou seja, os animais não estavam obesos ($p > 0,05$).

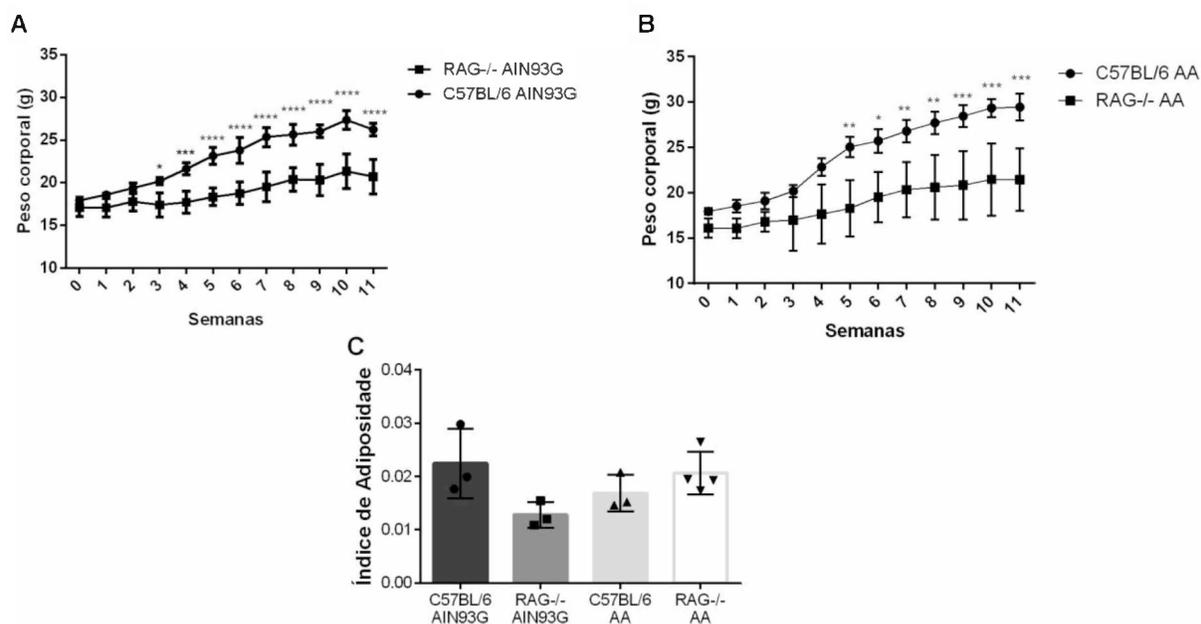


Figura 3: Curva de ganho de peso corporal e índice de adiposidade. Ganho de peso corporal de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 RAG-/- alimentados com dieta controle AIN93G ou dieta AA foi monitorado durante 11 semanas (A e B). Índice de adiposidade é expresso pelo peso do tecido adiposo epididimal/peso corporal final (C). Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo (n = 3); (*) representa a diferença entre os grupos: * $p < 0,05$ ** $p = 0,001$ *** $p = 0,0001$ **** $p < 0,0001$. Fonte: Elaborada pela autora.

Para evidenciar a presença de anticorpos específicos no soro dos animais foram considerados apenas os animais C57BL/6, dado que, a quantificação das Ig analisadas em RAG-/- (controle negativo) não foi significativa (dados não mostrados), corroborando com a não produção de imunoglobulinas devido à incapacidade de gerar linfócitos B.

Os animais C57BL/6 alimentados com AA produziram maiores níveis de IgM sérica ($p = 0,0039$) quando comparada aos animais alimentados com dieta AIN93G (Figura 4A). Em relação aos níveis de IgA no sobrenadante do homogeneizado das fezes, não foi observada diferença significativa (Figura 4B).

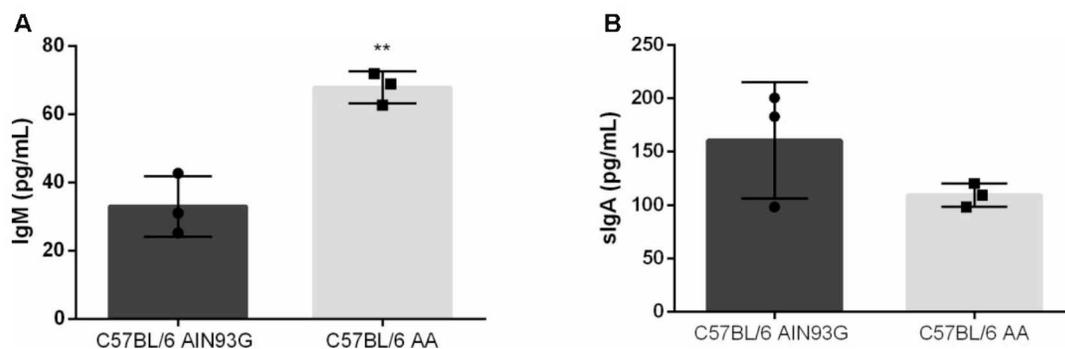


Figura 4: Concentração total de imunoglobulinas IgM (A) e sIgA (B) séricas e nas fezes de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta controle AIN93G ou dieta AA. Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo (n=3); (*) representa a diferença entre os grupos (Teste *t* de *Student* bicaudal). Fonte: Elaborada pela autora.

A morfometria das vilosidades não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 5).

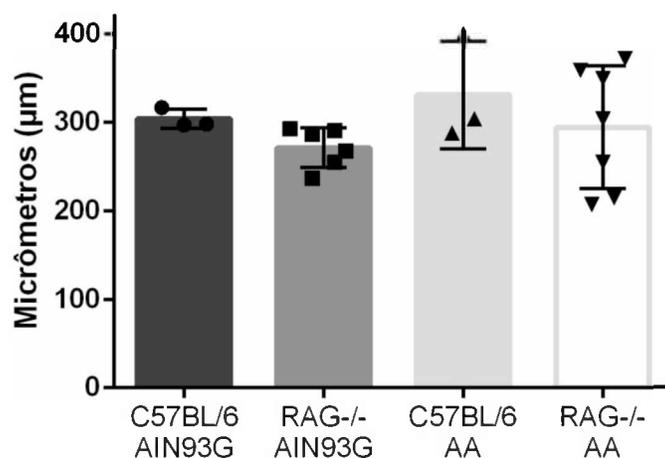


Figura 5: Morfometria das vilosidades do duodeno de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta AIN93G (n=3) ou dieta AA (n=6) e RAG-/- alimentados com dieta AIN93G (n=3) ou dieta AA (n=7). Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo. Fonte: Elaborada pela autora.

A análise histológica também consistiu na quantificação de células caliciformes e de IELs no duodeno desses animais conforme apresentado nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Foi possível observar que os animais C57BL/6 que consumiram a dieta AIN93G revelaram maior quantidade de células caliciformes no duodeno ($p=0,0041$) (Figuras 6A e 6E).

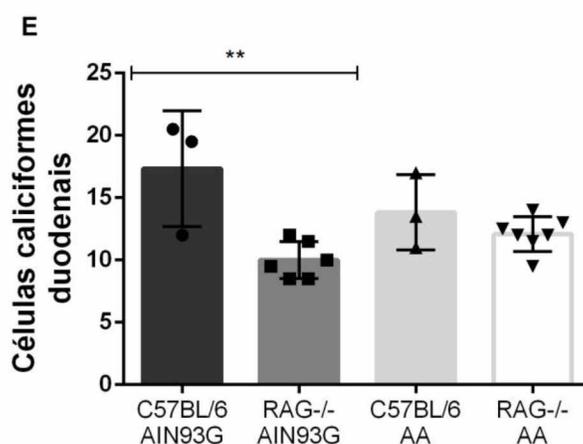
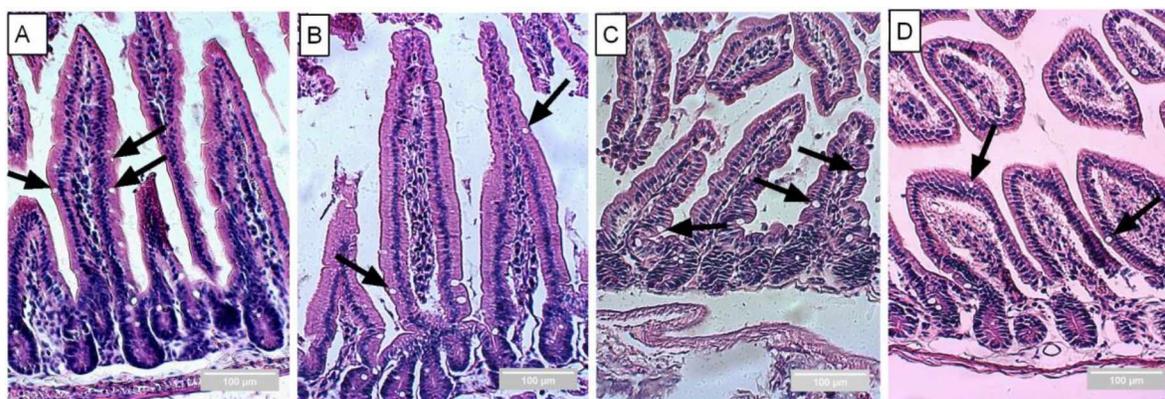
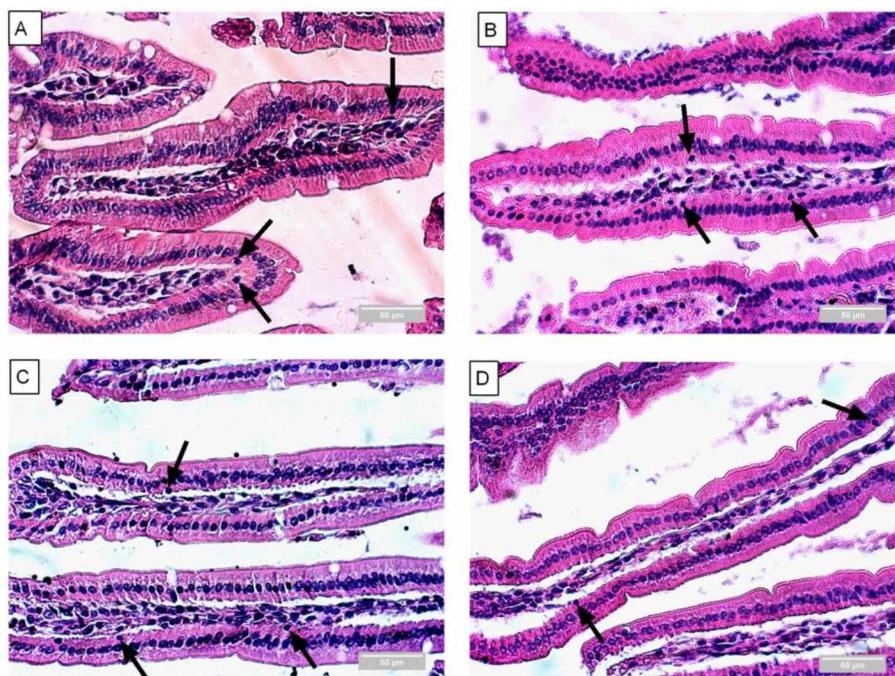


Figura 6: Análise morfológica duodenal. Fotomicrografias da morfologia das vilosidades do duodeno e das células caliciformes (setas) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta AIN93G (n=3) (A) ou dieta AA (n=3) (B), e RAG-/- alimentados com dieta AIN93G (n=6) (C) ou dieta AA (n=7) (D). Representação gráfica da quantificação de células caliciformes no

duodeno (E). Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (Teste ANOVA). Fonte: Elaborada pela autora.

Com a quantificação de IELs (Figura 7), observou-se que, independente da dieta ingerida, os animais C57BL/6 (Figuras 7A e 7B) possuem maior número de IELs (Figura 7E) quando comparados ao RAG^{-/-} ($p=0,0003$).



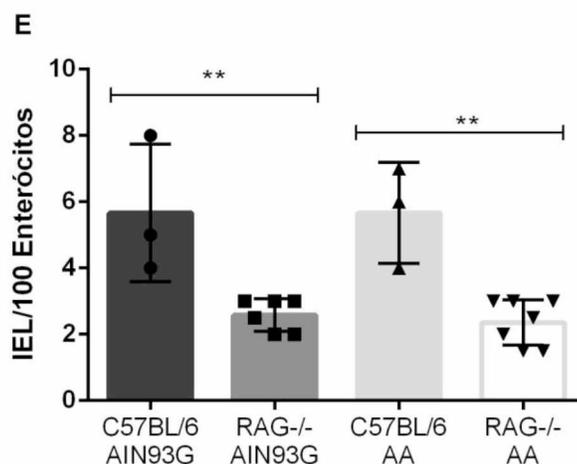


Figura 7: Análise morfológica duodenal. Fotomicrografias da morfologia das vilosidades do duodeno e dos linfócitos intraepiteliais (setas) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta AIN93G (n=3) (A) ou dieta AA (n=3) (B), e RAG-/- alimentados com dieta AIN93G (n=6) (C) ou dieta AA (n=7) (D). Representação gráfica da quantificação dos linfócitos intraepiteliais no duodeno (E). Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (Teste ANOVA). Fonte: Elaborada pela autora.

As células caliciformes do cólon também foram quantificadas, apresentando diferença significativa ($p=0,0057$) (Figura 8E) entre os animais C57BL/6 que consumiram a dieta AIN93G (Figuras 8A e 8B) em comparação aos animais RAG-/- alimentados com a mesma dieta.

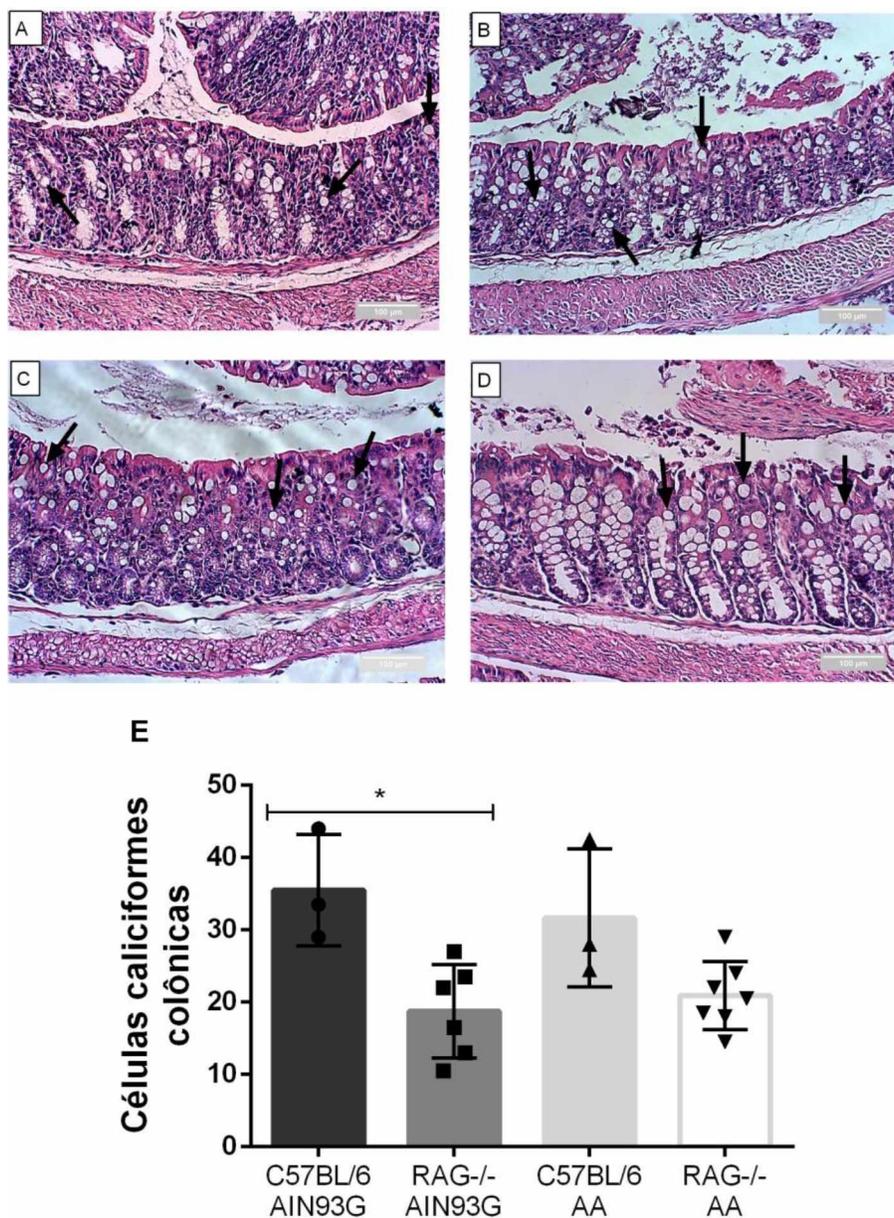


Figura 8: Análise morfológica colônica. Fotomicrografias da morfologia das vilosidades do cólon e das células caliciformes (setas) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta AIN93G (n=3) (A) ou dieta AA (n=3) (B), e RAG-/- alimentados com dieta AIN93G (n=6) (C) ou dieta AA (n=7) (D). Representação gráfica da quantificação de células caliciformes no cólon (E). Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (Teste ANOVA). Fonte: Elaborada pela autora.

5. DISCUSSÃO

Os dados obtidos demonstraram que os animais do grupo controle (C57BL/6) apresentam ganho de peso corporal maior quando comparados aos RAG^{-/-} independente da dieta ingerida. O menor peso corporal apresentado pelo RAG^{-/-} pode ser devido à característica dos animais de serem homozigotos (NEGRINI, 2018).

Em estudos realizados com animais C57BL/6 alimentados com as dietas AIN93G e AA observou-se que os mesmos apresentam crescimento corporal normal durante oito semanas, bem como alterações imunológicas, sugerindo que estas não decorrem de variações no estado nutricional dos animais, uma vez que a dieta contendo aminoácidos livres é capaz de manter o crescimento corporal normal de camundongos adultos, demonstrado pela curva de crescimento semelhante entre os grupos (MENEZES et al., 2003; SOUZA, 2016).

A ausência das proteínas na dieta interfere na produção de imunoglobulinas, indicando a importância dos estímulos antigênicos dietéticos para produção de imunoglobulinas séricas e sIgA (SOUZA, 2016). Com o objetivo de analisar os efeitos do consumo de dieta contendo aminoácidos livres relacionados à redução da carga antigênica de proteínas na dieta em animais C57BL/6 adultos em situações fisiológicas, Souza (2016) também utilizou as dietas experimentais AIN93G e AA. Após uma semana, os animais que consumiram aminoácidos livres apresentaram níveis menores de IgA sérica, sendo que a IgM só se apresentou menor neste grupo após quatro semanas de consumo. Ainda, Menezes (2001) observou redução significativa na concentração de imunoglobulinas séricas totais e nos níveis de sIgA em amostras do lavado intestinal de camundongos alimentados com dieta de aminoácidos quando comparados ao grupo controle que consumiu a dieta AIN93G. Porém, a enumeração celular no baço e na medula óssea

demonstrou que há mais células secretando IgM nos animais que consumiram a dieta AA, indicando que não ocorre a mudança de isotipo para IgG e IgA.

Dessa forma, é provável que a falta de estímulos pelas proteínas da dieta altere o processo de ativação dos linfócitos B em sítios de produção de imunoglobulinas efectoras (produção de IgG e IgA) conforme observado no presente estudo, no qual os animais C57BL/6 alimentados com AA produziram níveis elevados de IgM sérica quando comparados aos animais alimentados com dieta AIN93G. A formação de IgM resulta de contatos estabelecidos com auto-antígenos e indicam uma atividade interna e autônoma do sistema imune independente de estímulos externos (MENEZES, 2001).

Importante ressaltar que a IgA secretória pode contribuir para a manutenção da barreira e da homeostase da mucosa intestinal (TORRES, 2018) e, assim, o contato antigênico dietético ou com bactérias da mucosa intestinal pode desencadear uma resposta imune local com produção de IgA secretória aumentada (WEINER et al., 2011). Uma vez secretada, a IgA torna-se parte da matriz do muco atuando como um anticorpo neutralizante, capaz de se ligar a toxinas e receptores de adesão de microrganismos presentes no lúmen (TORRES, 2018).

Os dados obtidos também se assemelham com os encontrados por Souza (2016), confirmando que há diferenças quanto aos níveis de sIgA no lavado do intestino delgado, apesar de observarem que no cólon, o consumo de dieta contendo aminoácidos livres promoveu aumento da sIgA após quatro semanas quando comparado ao grupo caseína. Menezes (2001) também analisou a sIgA no lavado do intestino delgado e observou que os níveis estavam significativamente reduzidos em camundongos que consumiram a dieta AA em comparação aos animais controle alimentados com a AIN93G.

A diferença na produção de sIgA pode estar associada com alterações na quantidade de células intestinais e suas funções. Menezes et al. (2003) sugeriram que a atividade das células da

lâmina própria estava pouco desenvolvida nos animais C57BL/6 que consumiram a dieta AA percebendo, de maneira similar ao observado neste estudo, que houve uma redução no número de células caliciformes e de IELs no intestino delgado desses animais em comparação com o consumo da AIN93G.

A morfometria dos vilos intestinais não mostrou diferença entre os grupos, embora Menezes et al. (2003) e Souza (2016) tenham observado que consumo da dieta AA pelos animais C57BL/6 provocou alterações morfológicas no duodeno, representadas pelo aumento no comprimento dos vilos, além do aspecto mais liso quando comparados ao grupo AIN93G. Um estudo anterior mostrou que o padrão morfológico das vilosidades observado nos camundongos que consumiram a dieta de aminoácidos livres é semelhante ao de animais recém-desmamados, ou seja, antes da introdução da dieta, demonstrando que as proteínas dietéticas participam da maturação da mucosa intestinal (MENEZES, 2001).

Em seu estudo, Menezes (2001) também analisou a morfologia intestinal de camundongos BALB/C da linhagem SCID, que não possuem linfócitos, assim como os RAG^{-/-}, e observou um alongamento das vilosidades, propondo que a ausência ou a diminuição de linfócitos no intestino seja responsável pela mudança na morfologia dos vilos. Contudo, em nosso estudo, a análise morfométrica dos vilos dos animais RAG^{-/-} e C57BL/6 não apresentou diferença significativa.

O cólon, por sua vez, apresenta um número maior de células caliciformes em relação ao intestino delgado, devido à sua função fisiológica distinta exercida pela mucosa. A produção de muco neste local facilita a progressão do conteúdo fecal e atua na proteção química contra a agressão ocasionada por antígenos, toxinas e enzimas digestivas existentes no lúmen (SOUZA, 2016). Observamos que a dieta de aminoácidos livres induziu no cólon a mesma redução no número de células caliciformes apresentada no duodeno, que acompanhada pelo maior infiltrado celular e edema da camada submucosa evidencia a hipótese explicativa de Souza (2016) para o

estado pró-inflamatório percebido após o consumo da dieta AA. Com isso, é possível que a retirada das proteínas intactas da dieta tenha contribuído para o agravamento da inflamação intestinal, a qual ocorreu em virtude da ativação de receptores no intestino (mTOR) pela dieta com aminoácidos livres (SOUZA, 2016).

De maneira interessante, camundongos C57BL/6 que consumiram a dieta AA desde o desmame foram capazes de recuperar os efeitos desse consumo após serem alimentados com a dieta AIN93G, ou seja, reverteram os efeitos imunológicos da privação proteica, sugerindo que estes efeitos são reversíveis. Estes resultados indicam que a intervenção terapêutica pode restaurar a função imunológica (AMARAL et al., 2006).

A literatura dispõe de poucos relatos sobre os efeitos de dieta contendo aminoácidos livres em camundongos RAG^{-/-} alimentados. Ainda assim, alguns estudos relatam que esses animais exibem menor comprimento do vilo e uma perda de células caliciformes ao longo de todo o comprimento do intestino delgado e no cólon quando comparados a outros animais *knockout* (OSTANIN et al., 2006).

Dessa forma, sugerimos que a ausência de linfócitos, característica apresentada em RAG^{-/-}, possa estar interferindo no processo inflamatório, uma vez que a inflamação do intestino delgado desses animais é mínima ou ausente (OSTANIN et al., 2006).

7. CONCLUSÃO

As proteínas da dieta contribuem para a maturação do sistema imune de mucosa, sendo a presença de linfócitos convencionais fundamental para que as proteínas atuem como antígenos e favoreçam a constituição morfológica da mucosa intestinal.

Além disso, a falta de estímulos antigênicos na dieta pode influenciar na troca de isotipos de Igs interferindo na resposta imune adaptativa e, na ausência de linfócitos convencionais, pode ocorrer o comprometimento do ganho de peso.

8. REFERÊNCIAS

AMARAL, J. F. et al. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 39, n. 12, p. 1581-1586, dez. 2006.

CHAGAS JÚNIOR, A. D. das. **Avanços no conhecimento da imunopatogênese da leptospirose e a aplicação do método do *imprint* como ferramenta qualitativa e quantitativa de leptospiras**. 2014. 71 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa), Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

CHORILLI, M., MICHELIN, D. C., SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. L.], v. 28, n. 1, p. 11-23, jul. 2007.

FARIA, A. M. C. et al. Food Components and the Immune System: From Tonic Agents to Allergens. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 4, p. 1-16, mai. 2013.

FARIA, A. M. C., WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 232-259, jun. 2005.

FARIAS, H. G. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. *In: I Simpósio de bioterismo da Fiocruz – Pernambuco*, Recife, 2010.

KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 704 p.

MELLO, R. O. et al. Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 139-145, mar./abr. 2012.

MENEZES, J. S. **O papel imunobiológico das proteínas da dieta**. 2001. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências, Imunologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MENEZES, J. S. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **International immunology**, v. 15, n. 3, p. 447-455, 2003.

MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPPORT, M. Reconhecimento do antígeno pelos receptores de células B e de células T. *In: MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPPORT, M. Imunobiologia de Janeway*. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 111-142, 2010.

NEGRINI, G. B. **Análise comportamental e de parâmetros sinápticos e imunológicos na linhagem de camundongos BALB/C NUDE**. 2018. 47 f. Dissertação (Mestrado em

Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

OSTANIN, D. V. et al. T cell-induced inflammation of the small and large intestine in immunodeficient mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 1, p. G109-G119, 2006.

PEREIRA, J. L. et al. Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. **Ciência e Saúde**, [s. L.], v. 11, n. 1, p. 51-57, jan./mar. 2018.

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

SILVA, J. P. **Efeito de uma dieta livre de proteínas no desenvolvimento de alergia alimentar e tolerância oral em camundongos BALB/c**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

SOUZA, A. L. de. **Feitos imunobiológicos de dietas contendo aminoácidos livres**. 2016. 166 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

TORRES, L. **Efeito da obesidade induzida por dieta na indução de tolerância oral**. 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde), Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Imunologia, Intencionalidade e Acaso. **Informática na Educação**: teoria & prática, v. 12, n. 2, p. 195-200, jul./dez. 2009.

WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 241, n. 1, p. 241-259, maio 2011.