

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

TAYNARA CIPRIANO SCHERER

MEDIAÇÃO DE *Bifidobacterium* spp. NA REDUÇÃO DA RESPOSTA
PRÓ-INFLAMATÓRIA CAUSADA POR PEPTÍDEOS QUE DESENCADAIAM A
DOENÇA CELÍACA: UMA REVISÃO NARRATIVA

Florianópolis
2022

TAYNARA CIPRIANO SCHERER

MEDIAÇÃO DE *Bifidobacterium* spp. NA REDUÇÃO DA RESPOSTA
PRÓ-INFLAMATÓRIA CAUSADA POR PEPTÍDEOS QUE DESENCARDEIAM A
DOENÇA CELÍACA: UMA REVISÃO NARRATIVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia
da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito para obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Dra. Silvani Verruck.

Coorientadora: Dra. Amanda Bagolin do
Nascimento.

Florianópolis
2022

TAYNARA CIPRIANO SCHERER

MEDIAÇÃO DE *Bifidobacterium* spp. NA REDUÇÃO DA RESPOSTA
PRÓ-INFLAMATÓRIA CAUSADA POR PEPTÍDEOS QUE DESENCARTEIAM A
DOENÇA CELÍACA: UMA REVISÃO NARRATIVA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Graduação em Farmácia, na Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde.

Florianópolis (SC), 27 de Julho de 2022.

Banca Examinadora:

Orientadora: Dra. Silvani Verruck
Orientador(a)
Presidente

Profa. Dra. Carlise Beddin Fritzen Freire
Membro(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Marília Miotto
Membro(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meu pais que não mediram esforços para me apoiar em toda essa trajetória. Sei que sempre poderei contar com vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina por ter me acolhido durante toda a minha graduação. Aos professores e funcionários que acabaram se tornando uma família. Em especial à Prof. Dra. Beatriz Garcia Mendes Borba por ter me ajudado quando eu mais precisei.

Aos meus pais Vilma e Airton que fizeram de tudo para que eu pudesse estar onde estou e que sempre apoiaram os meus sonhos. Eu amo vocês. A minha irmã Priscila que sempre foi uma inspiração para mim. Agradeço também aos meus tios Sueli e Mário Selezio por terem me acolhido em sua casa no início da graduação, vocês foram e ainda são os meus segundos pais.

Ao pastor Davi por ter me acolhido na Comunidade Luterana da Paz e ao meu querido amigo Marcos Felipe Campos que me acompanhou desde que cheguei em Florianópolis e que sempre levarei comigo em meu coração.

A minha amiga Margot Marrie Martin que se tornou minha irmã mais velha e me deu todo o suporte, apoio e amizade. Obrigada por tudo minha amiga, eu amo muito você.

Aos meus amigos e colegas que deixaram a graduação mais leve, especialmente à Marcela Lopes que desde o primeiro semestre me ajudou enquanto monitora e após se tornou uma grande amiga. A Pamela Kroth que esteve comigo em momentos difíceis. Ao meu amigo Lucas Landin que sempre esteve ao meu lado durante a graduação, nunca vou esquecer nossos cafezinhos e as boas conversas. Ao meu amigo Eduardo Fontana Lazari, meu conterrâneo. Sou muito grata por termos nos aproximado ao longo da graduação, você faz parte da minha família. A Giuliana Valentini e Emiliana Costa que foram minhas parceiras dividindo apartamento e parte de suas vidas comigo. Jamais vou esquecer esses momentos que passei com cada uma de vocês.

Ao meu namorado Bruno Serpa que me apoiou em todo período do TCC e fez mais do que eu poderia pedir para me tranquilizar durante todo esse tempo. Eu te amo.

A minha orientadora, Prof. Dra. Silvani Verruck e co-orientadora Dra. Amanda Bagolin do Nascimento por terem aceitado esse desafio e confiado em mim e no meu trabalho.

A banca examinadora, por aceitar participar deste trabalho ajudando-o a torná-lo ainda melhor.

RESUMO

A doença celíaca (DC) é definida como uma doença imunomediada desencadeada por peptídeos de glúten presentes na dieta de indivíduos geneticamente suscetíveis e pode desencadear uma série de manifestações intestinais e extraintestinais. A doença ocorre em cerca de 1% população mundial, acomete ambos os sexos em todas as idades e raças e tem como único tratamento uma dieta livre de glúten (DGF). Contudo, apesar do aparente cumprimento à DGF, os sintomas persistem em 30-50% dos indivíduos tratados. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão narrativa dos principais mecanismos em que as bifidobactérias atuam na mediação da resposta citotóxica e pró-inflamatória de peptídeos que desencadeiam a DC. Foram utilizados quatro bases de dados para fazer a busca dos documentos por meio de descritores específicos nos idiomas português e inglês - Elsevier's Scopus (SCOPUS), Embase Indexing and Emtree (EMBASE), Web of Science e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS). Os probióticos utilizados em alimentos e suplementos demonstram características promissoras como tratamento adjuvante da DC. As cepas mais citadas pelos autores foram: *B. lactis*, *B. longum* IATA-ES1, *B. bifidum* IATA-ES2 e *B. lactis* Natren Life Start super strain (NLS-SS). Estas, dentre outras cepas de *Bifidobacterium* spp. estudadas, apresentaram sete mecanismos de ação que podem exercer benefícios para indivíduos com DC, sendo estes: indução da expressão de ciclooxigenase COX-1 em células Caco-2 e redução da expressão de COX-2, diminuição na ativação de zonulina, hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas, inibição da expressão de mRNA do receptor toll-like (CXCR3) e redução da produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (INF- γ), fator nuclear κ B (NF- κ B), e interleucina 1 β (IL-1 β), regulação de células de Paneth (PCs) e alteração da microbiota intestinal. Contudo, nenhuma evidência conclusiva foi encontrada de que a administração desses probióticos possa prevenir o início da DC ou que a dieta livre de glúten (DGF) possa ser descartada. Portanto, mais estudos sobre o tema são necessários para esclarecer se *Bifidobacterium* spp. pode ajudar a tratar ou prevenir a DC.

Palavras-chave: Doença celíaca. Glúten. Mecanismos. Probióticos.

ABSTRACT

The celiac disease (CD) is defined as an immune-mediated disease triggered by gluten peptides that are present in the diet of genetically susceptible individuals and can unleash a series of intestinal and extra-intestinal manifestations. The disease affects around 1% of the world population, regardless of gender, sex and race, and the only proven treatment is a gluten-free diet (GFD). However, despite the apparent diet compliance, the symptoms persist in 30-50% of the treated individuals. This study aims to realize a narrative revision of the main mechanisms in which bifidobacteria act in the mediation of cytotoxic and pro-inflammatory response from peptides that trigger the CD. Four databases were used to research the documents using specific keywords in Portuguese and English - Elsevier's Scopus (SCOPUS), Embase Indexing and Emtree (EMBASE), Web of Science and Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS). The probiotics utilized in food and supplements show promising characteristics as adjuvant treatment for CD. The most cited strains found were: *B. lactis*, *B. longum* IATA-ES1, *B. bifidum* IATA-ES2 and *B. lactis* Natren Life Start super strain (NLS-SS). These, between other *Bifidobacterium* spp. studied strains, presented seven action mechanisms that can be beneficial to individuals with CD, being: induction of the cyclooxygenase expression COX-1 in Caco-2 cells and reduction of the COX-2, decrease in zonulin activation, hydrolyse of gliadin derived peptides, inhibition of the toll-like (CXCR3) mRNA expression and reduction of the tumor necrosis factor α (TNF- α), interferon γ (INF- γ), nuclear factor κ B (NF- κ B), and interleukin 1 β (IL-1 β) production, Paneth Cells (PCs) regulation and changes in the intestinal microbiota. However, no conclusive evidence were found about the administration of these probiotics preventing the beginning of the CD. Therefore, more studies in this matter are necessary to clarify if the *Bifidobacterium* spp. can help treat or prevent CD.

Keywords: Celiac disease. Gluten. Mechanisms. Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ligações peptídicas.	15
Figura 2 – Proteínas que compõe o glúten em diferentes cereais e processo inflamatório	16
Figura 3 – Classificação funcional e molecular das proteínas do glúten.	17
Figura 4 – Grão de trigo e a formação do complexo de glúten e seus fragmentos na hidratação, hidrólise e desamidação de proteína do trigo.	18
Figura 5 – Processo patogênico da DC	22
Figura 6 – Fluxograma do processo de seleção dos estudos	25
Figura 7 – Possíveis vias da ação de <i>Bifidobacterium</i> spp. na DC, sendo os mecanismos de ação: (1) indução da expressão de COX-1 em células Caco-2 e redução da expressão de COX-2, o que garante a integridade da mucosa intestinal, (2) diminuição da ativação de zonulina e inibição da expressão de mRNA de CXCR3, o que previne a quebra das junções apertadas (3) hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas, prevenindo o excesso de peptídeos de glúten no lúmen intestinal, (4) e (5) controle da resposta th1, a regulação das células de Paneth e a redução da produção de TNF- α , IFN- γ , NF-kB, e IL-1 β , (6) regulação das células de Paneth, (7) alteração da microbiota intestinal, que está desregulada na DC	27
Figura 8 – Mecanismo de liberação de zonulina a partir da ingestão de gluten (a) Peptídeos específicos de gliadina, (b) CXCR3, (c) PKC- α , (d) antígenos não próprios	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Seleção de epítomos estimuladores potentes de células T.	20
Tabela 2 – Peptídeos derivados de gliadinas nos dialisados de diferentes digestões gastrointestinais de gliadinas inoculadas ou não com bifidobactérias.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
d.C.	Depois de Cristo
DC	Doença Celíaca
DGF	Dieta Livre de Glúten
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
NK	Células Natural Killer
NF-kB	Fator nuclear kappa-B
tTG	Enzima Transglutaminase Tecidual
Th1	Células T helper 1
Th2	Células T helper 2
CXR3	Receptor Toll-like CXCR3
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)
KDa	Kilo Dalton
NOS	Óxido nítrico sintase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
INF- γ	Interferon-gama
PKC- α	Proteína quinase C
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
PT-gliadina	Gliadina resistente à pepsina-tripsina

PT-BSA	Peptic-tryptic digest of bovine serum albumin
IL	Interleucina
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico
NLS-SS	Natren Life Start super strain
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO TEÓRICA	15
3.1	Estrutura de Proteínas	15
3.2	Peptídeos que desencadeiam efeitos citotóxicos	18
3.2.1	Peptídeos 33-mer e 26-mer	19
3.3	Gênero <i>Bifidobacterium</i> e DC	21
4	METODOLOGIA	24
5	RESULTADOS	25
6	DISCUSSÃO	27
6.1	Indução da expressão da COX-1 em células Caco-2 e redução da expressão de COX-2	28
6.2	Diminuição na ativação de zonulina - proteína envolvida na regulação da permeabilidade endotelial e epitelial.	28
6.3	Hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas e inibição da expressão de mRNA de CXCR3 e redução da produção de TNF- α , INF- γ , NF-kB, e IL-1 β	30
6.4	Regulação de Células Paneth	36
6.5	Alteração no Microbioma Intestinal	37
7	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O termo celíaco, do grego “koiliakos”, que significa “abdômen”, foi descrito pela primeira vez por volta de 100 d.C. pelo médico grego Aretaeus. A ligação entre a dieta e a DC foi definitivamente estabelecida na década de 1950, quando W. Dicke, um pediatra holandês, demonstrou o papel causal das proteínas de armazenamento de grãos de trigo (gliadina), cevada (hordeína) e centeio (secalina) e propôs tratar pacientes por um longo período de tempo com uma dieta livre de glúten (KAMER; WEIJERS, 1955). Como essas proteínas apresentam semelhanças em sua estrutura, são conhecidas coletivamente como glúten (ROMA *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ; GONZÁLEZ; FUENTE, 2010).

De acordo com Wieser (2007), entre os peptídeos do glúten, duas frações principais podem ser diferenciadas de acordo com sua solubilidade em álcoois aquosos: as gliadinas solúveis e as gluteninas insolúveis, sendo que a gliadina é descrita como a de maior toxicidade para indivíduos com DC. Os dois grupos são caracterizados por altos teores de glutamina e prolina, que são os principais aminoácidos componentes do glúten (MORAES *et al.*, 2014; SPURKLAND *et al.*, 1990).

A DC é definida como um distúrbio sistêmico imunomediado induzido por glúten e prolaminas relacionadas em indivíduos geneticamente suscetíveis e caracterizado pela presença de uma combinação variável de manifestações clínicas dependentes de glúten, anticorpos específicos para DC, haplótipos HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 e enteropatia. Os anticorpos específicos de DC compreendem autoanticorpos contra TG2, incluindo anticorpos endomísios e anticorpos contra formas desidratadas de peptídeos de gliadina (HUSBY *et al.*, 2012). Contudo, os pacientes frequentemente apresentam e se queixam de sintomas gastrointestinais apesar da adesão à dieta estrita (BAKSHI *et al.*, 2012; FERRARI *et al.*, 2021).

A predisposição genética à DC está associada principalmente ao sistema de antígeno leucocitário humano (HLA-DQ), que participa do reconhecimento de moléculas próprias e não próprias pelo sistema imunológico. As variantes genéticas HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, são as mais frequentemente observadas em indivíduos com DC (SPURKLAND *et al.*, 1990; FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013). Esses antígenos têm a capacidade de aumentar a probabilidade de ativação de células imunes e autoimunidade. Além disso, essas variantes genéticas produzem receptores que se ligam a peptídeos de gliadina com mais força do que outras formas do receptor apresentador de antígeno. Assim, as proteínas do glúten podem ser quebradas de forma ineficiente pelas proteases do intestino. Esse fator faz com que exista maior disponibilidade de peptídeos inteiros no lúmen, favorecendo a passagem

destes peptídeos do lúmen para a lâmina própria, por meio das junções estreitas (também conhecidas como junções apertadas), que em pacientes com DC possuem maior permeabilidade intestinal. Na lâmina própria ocorre a desamidação pela enzima transglutaminase tecidual (tTG) que cria epítomos imunoestimuladores potentes que são apresentados via HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 às células imunes T CD4. Com a ativação das células T CD4, as respostas Th1 e Th2 são estimuladas. A resposta Th1 estimula a produção das células natural killers (NK) que produz citocinas pró-inflamatórias como $\text{TFN-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$. Esta produção resulta em remodelação da mucosa, atrofia das vilosidades e crescimento de microbiota desfavorável, agravando o prognóstico da doença. A resposta Th2 estimula a produção das células B, que produz anticorpos anti-teciduals, anti-gliadina e anti-endomísio, gerando assim a autoimunidade, que causa sintomas intestinais ou não intestinais (SCHUPPAN; JUNKER; BARISANI, 2009; MORAES *et al.*, 2014).

Indivíduos com DC apresentam uma disbiose característica que está em estudo. Segundo Levy *et al.* (2017), a disbiose intestinal está relacionada a uma desregulação na composição e atividade da microbiota intestinal, gerando efeitos prejudiciais na saúde do hospedeiro. Na DC, observa-se um desequilíbrio caracterizado principalmente por um aumento de *Bacteroides* spp. e uma diminuição de *Bifidobacterium* spp. (CRISTOFORI *et al.*, 2018). Dessa forma, há uma hipótese de que um desequilíbrio na microbiota intestinal funciona como um gatilho inicial para a DC. Algumas características podem definir uma microbiota saudável, como o aumento da diversidade, riqueza de genes, quantidade de espécies produtoras de butirato e a capacidade de um ecossistema de resistir a alterações sob estresse ou de se recuperar rápida e completamente de uma perturbação (SOMMER *et al.*, 2017). Conforme Cristofori *et al.* (2018), entender o papel da microbiota saudável e os efeitos negativos da disbiose intestinal é de grande importância, pois todos os componentes intestinais exercem diferentes funções no organismo.

Considerando que a disbiose pode desempenhar um papel fundamental na patogênese da DC por meio da modulação da permeabilidade intestinal e da regulação do sistema imunológico, pode-se pensar em estratégias para modular a microbiota intestinal, como por exemplo, a administração dos probióticos, que são comumente utilizados em alimentos e suplementos. As cepas mais utilizadas em humanos são *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Bifidobacterium*. Cepas específicas de *Lactobacillus* podem modular a produção de citocinas por células imunes, já *Bifidobacterium* mostrou ter efeitos positivos na resposta imune do hospedeiro (CRISTOFORI *et al.*, 2021; YOUNG *et al.*, 2004). Como exemplo, as cepas *Bifidobacterium bifidum* IATES2 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 apresentaram a capacidade de neutralização das respostas inflamatórias em pacientes com DC (MEDINA *et al.*, 2008).

Foi observada a capacidade de *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium longus*

IATA-ES1 de hidrolisar os peptídeos do glúten (reduzindo assim sua imunogenicidade), restaurar a microbiota intestinal, modular a resposta imune e/ou reduzir a inflamação de baixo grau, que muitas vezes não ocorre apenas com a restrição de glúten na dieta. (FRANCAVILLA *et al.*, 2017; LINDFORS *et al.*, 2008, LAPARRA; SANZ, 2009, LAPARRA *et al.*, 2012). Conforme Leffler *et al.* (2007), apesar da adesão à DGF, os sintomas persistem em 30-50% dos indivíduos. Além disso, é comum que pacientes com DC sejam expostos ao glúten acidentalmente ao consumir medicamentos, suplementos ou mesmo alimentos contaminados (NOROUZBEIGI *et al.*, 2020). Assim, essa espécie de probióticos poderia ser apresentada como um tratamento adjuvante da DC, juntamente com a DGF.

Muitos estudos estão focados na espécie de probióticos *Lactobaciluls spp.*, e apesar de existir uma gama de estudos da espécie *Bifidobacterium spp.*, pouco se fala sobre os mecanismos de ação dessas cepas. Levando-se em consideração esses aspectos, o presente trabalho revisou os principais mecanismos em que os probióticos da espécie *Bifidobacterium spp.* atuam na mediação da resposta citotóxica e pró-inflamatória de peptídeos que desencadeiam a DC, a fim de expandir o conhecimento sobre o tema.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão narrativa da literatura para descrever os mecanismos utilizados pelas bifidobactérias para reduzir a citotoxicidade e resposta pró-inflamatória dos peptídeos de gliadina que desencadeiam a doença celíaca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

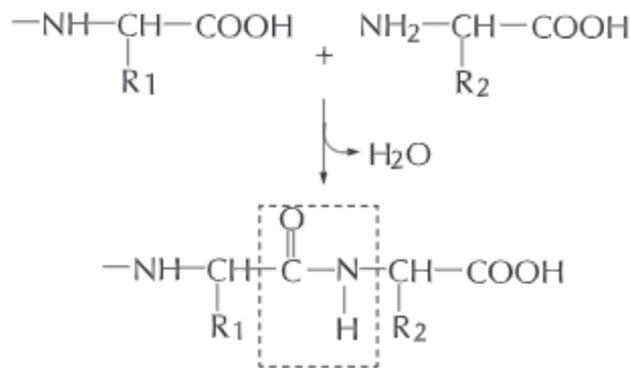
- Apontar quais os benefícios do uso do gênero de probióticos *Bifidobacterium* spp. para a saúde intestinal dos indivíduos com DC;
- Descrever os mecanismos utilizados pelos probióticos do gênero *Bifidobacterium* spp. para reduzir a citotoxicidade e a resposta pró-inflamatória dos peptídeos que desencadeiam a DC.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 ESTRUTURA DE PROTEÍNAS

As proteínas são polímeros complexos, compostos por 21 aminoácidos diferentes. Os componentes são ligados por meio de ligações amida substituídas. A estrutura primária de uma proteína refere-se à sequência linear na qual os aminoácidos constituintes são covalentemente ligados por meio de ligações amida, também chamadas de ligações peptídicas. Este é o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula e são específicas para cada proteína, sendo geralmente determinados geneticamente. A Figura 1 representa as ligações peptídicas entre os aminoácidos. Essa ligação ocorre por meio de uma desidratação em que há a quebra da ligação entre o carbono e a hidroxila, na carboxila, e pela quebra de uma ligação entre o nitrogênio e um hidrogênio. A extremidade com o grupo α -amino livre é conhecida como N-terminal e a com o grupo α -COOH livre é conhecida como C-terminal. Por convenção, N representa o início e C o final da cadeia polipeptídica quando a informação da sequência primária é indicada (DAMODARAN; FENNEMA; PARKIN, 2007).

Figura 1 – Ligações peptídicas.



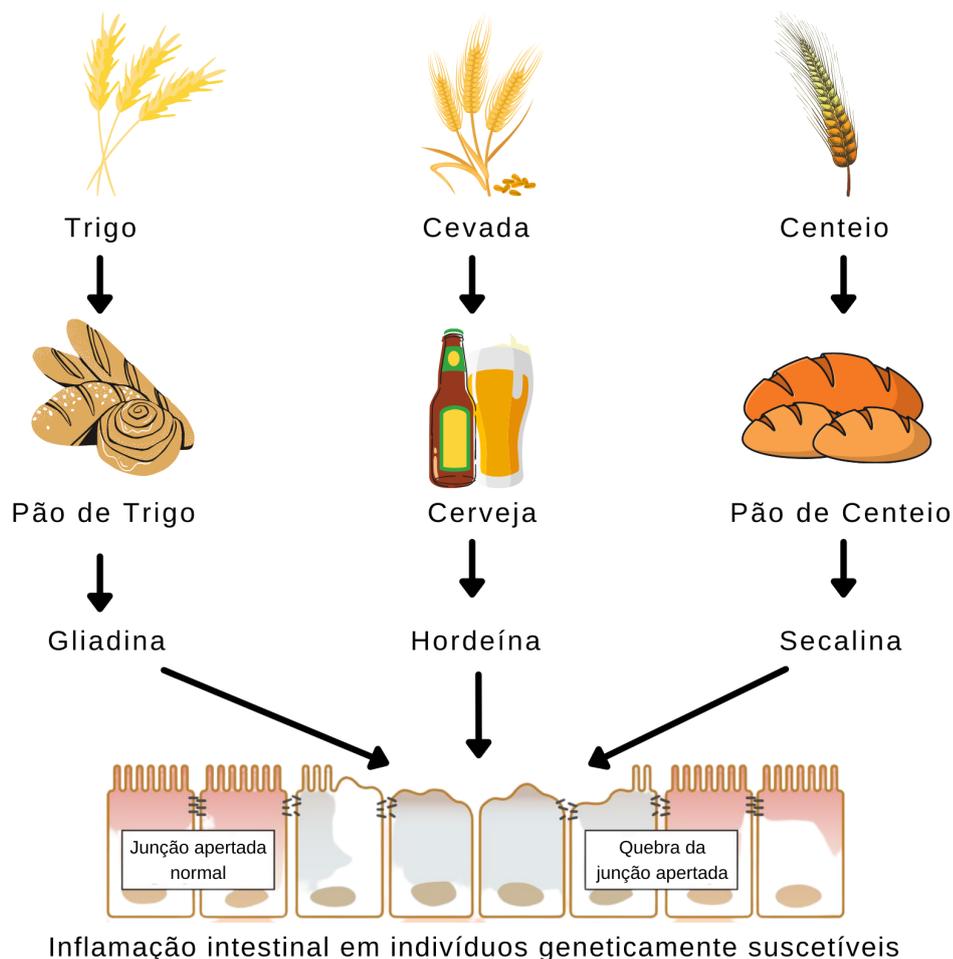
Fonte: Adaptado de Damodaran, Fennema e Parkin (2007)

A sequência de aminoácidos age como um código para a formação das estruturas secundária e terciária e, finalmente, determina a funcionalidade biológica da proteína. As estruturas encontram-se ativas nas formas terciária e quaternária (DAMODARAN; FENNEMA; PARKIN, 2007). A sequência de aminoácidos determina a forma da proteína e a forma da proteína define a sua função.

As proteínas de glúten são as principais proteínas de armazenamento de sementes de cereais, como trigo, que contém a classe de proteínas gliadina, cevada, que contém a classe das hordeínas e o centeio, que contém as secalinas. Inicialmente,

a classificação dessas proteínas foi baseada em sua solubilidade, e as frações incluíam aquelas que são solúveis (prolaminas) ou insolúveis (glutelinas) em álcool (SHEWRY; TATHAM, 1990). As proteínas solúveis em álcool foram chamadas de prolaminas de acordo com sua composição de aminoácidos – as prolaminas são ricas em prolina (até 30%) e glutamina (até 50%) (SHEWRY; TATHAM, 1990; SHEWRY; HALFORD, 2002; BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2014; BIESIEKIERSKI, 2017). A insolubilidade das glutelinas em álcool se deve ao fato de que elas formam polímeros de alta massa molecular estabilizados por pontes dissulfeto entre polipeptídeos individuais. Uma vez que muitas glutelinas estão estruturalmente relacionadas às prolaminas, e algumas subunidades poliméricas reduzidas são solúveis em álcool e ricas em prolina e glutamina, elas agora também são consideradas prolaminas (SHEWRY; TATHAM, 1990; SHEWRY; HALFORD, 2002; BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2014). A Figura 2 representa as diferentes proteínas de cereais que em conjunto são conhecidas como glúten. Ambas proteínas possuem a capacidade de causar inflamação intestinal em indivíduos geneticamente predispostos (MORAES *et al.*, 2014).

Figura 2 – Proteínas que compõe o glúten em diferentes cereais e processo inflamatório

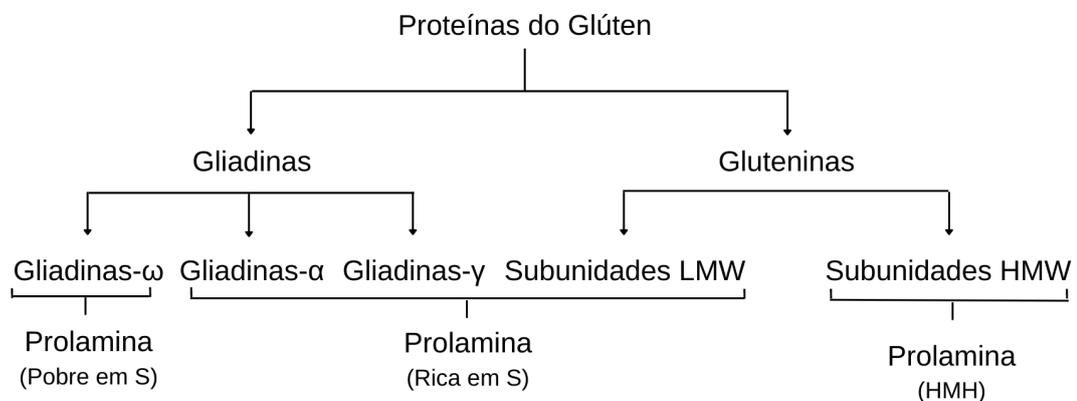


Fonte: Adaptado de Moraes *et al.* (2014)

As prolaminas apresentam alto grau de heterogeneidade, podendo ser

divididas em três grupos principais: prolaminas de alta massa molecular (HMW), prolaminas pobres em enxofre (ω -gliadinas) e prolaminas ricas em enxofre, que incluem gliadinas e prolaminas de baixa massa molecular (TATHAM; SHEWRY, 1995). Essas proteínas interagem entre si e com polímeros de gluteninas por meio de ligações de hidrogênio e ligações hidrofóbicas (RAWSON; EVANS, 1970; POPINEAU *et al.*, 1994). As gliadinas são divididas em quatro frações eletroforéticas discretas: α , β , γ e ω -gliadinas, que diferem tanto na massa molecular quanto nas sequências de aminoácidos (SHEWRY; HALFORD, 2002). A Figura 3 representa a classificação funcional e molecular das proteínas do glúten.

Figura 3 – Classificação funcional e molecular das proteínas do glúten.

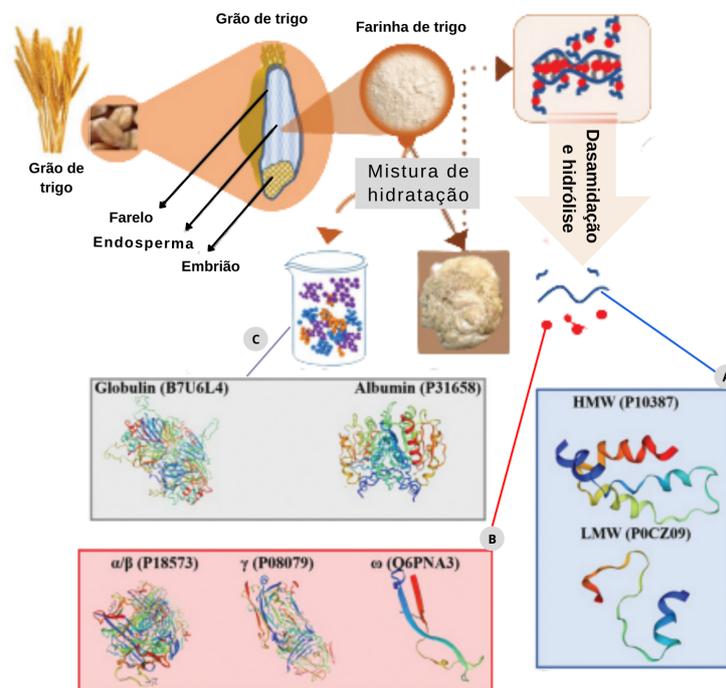


Fonte: Adaptado de Damodaran, Parkin e Fennema (2009)

Foi observado que além da classificação das gliadinas com base em sua solubilidade, esses peptídeos são categorizados como gliadinas tóxicas ou gliadinas imunogênicas. A toxicidade da gliadina está relacionada com a sua capacidade em promover ou induzir danos intestinais após a sua ingestão, já a imunogenicidade está relacionada com a sua capacidade de ativar células T (SHAN *et al.*, 2005). Os peptídeos tóxicos de cada fração de gliadina possuem diferentes padrões potenciais. O número de peptídeos tóxicos em α/β , γ e ω é de aproximadamente 26, 24 e 23, respectivamente (BROMILOW *et al.*, 2017). Além de causar toxicidade, os peptídeos de gliadina são em sua maioria imunogênicos (WOLDEMARIAM *et al.*, 2021).

As α/β -gliadinas possuem estruturas globulares compactas, e as γ - e ω -gliadinas possuem estruturas semelhantes a bastonetes (BARAK; MUDGIL; KHATKAR, 2014). As $\alpha/\beta/\gamma$ -gliadinas abrigam três e quatro ligações intramoleculares (SS), respectivamente. Uma ilustração representativa dos grãos de trigo, mostrando fragmentos do glúten com alguns exemplos podem ser observados na Figura 4.

Figura 4 – Grão de trigo e a formação do complexo de glúten e seus fragmentos na hidratação, hidrólise e desamidação de proteína do trigo.



Fonte: Adaptado de Woldemariam *et al.* (2021)

3.2 PEPTÍDEOS QUE DESENCADAIAM EFEITOS CITOTÓXICOS

Verificou-se que os diferentes níveis de toxicidade do glúten estão relacionados com o comprimento da cadeia proteica. As proteínas de trigo hidrolisadas têm um número maior de peptídeos quando comparadas com as do glúten integral, e esses peptídeos estão associados à toxicidade relacionadas ao glúten (FASANO *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, a associação entre glúten e DC é principalmente dependente da quantidade de glutamina e prolina nos peptídeos do glúten. Tanto os peptídeos derivados de glutenina e gliadina podem causar toxicidade imunológica, mas os peptídeos de gliadina estão associados principalmente ao maior potencial imunoestimulatório (RIBEIRO *et al.*, 2018; TYE-DIN; GALIPEAU; AGARDH, 2018; TYE-DIN *et al.*, 2010).

Alguns autores como Schuppan, Junker e Barisani (2009) e Sollid e Khosla (2011) afirmam que gliadinas e gluteninas abrigam pelo menos 50 sequências de peptídeos imunogênicos diferentes que são amplamente resistentes a peptidases gastrointestinais. No entanto, é observado por Wei *et al.* (2020) que os antígenos são uma pré-condição necessária, mas não suficiente para início da DC, visto que cerca de um terço da maioria das populações humanas possui pelo menos um desses genes HLA e apenas 1% da população é diagnosticada com DC.

A imunogenicidade desses peptídeos em pacientes com DC depende de sua estrutura primária, que permite um encaixe de baixa a média afinidade no sulco de ligação ao antígeno de HLA-DQ2 ou HLA-DQ8. Esses antígenos são controlados pela interação direta da sequência de nove aminoácidos do núcleo linear do peptídeo de glúten e sua interação com os aminoácidos da molécula HLA na qual ele se incorpora. A desamidação mediada por tTG de certas gliadinas (prolinas) nos peptídeos imunogênicos do glúten produzem uma carga negativa por criarem um resíduo de ácido glutâmico que aumenta a afinidade de ligação (WEI *et al.*, 2020). A outra pré-condição essencial para a apresentação antigênica eficaz desses peptídeos de glúten na lâmina própria intestinal é sua resistência parcial à degradação por proteases gastrointestinais de mamíferos. Essa resistência se deve ao seu alto teor em resíduos de prolina, uma característica única das prolaminas de trigo, como citado anteriormente (WIESER, 2007). Como consequência, durante a passagem pelo trato gastrointestinal superior, as proteínas do glúten são clivadas em peptídeos menores, mas vários fragmentos maiores (comprimento de 10 a 40 aminoácidos) permanecem não digeridos. Os dois maiores peptídeos de glúten, conforme a Tabela 1, são derivados da α -gliadina (33-mer) e γ -gliadina (26-mer). Tais peptídeos são especialmente notáveis por sua forte indução de respostas destrutivas de células T em pacientes com DC (HAUSCH *et al.*, 2002; SHAN *et al.*, 2004).

Ambos os peptídeos possuem diversos epítomos imunogênicos sobrepostos que estimulam as células T, podendo se ligar aos antígenos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, especialmente após desaminação mediada por tTG, conforme o processo imunogênico da DC. Esses e vários outros peptídeos (Tabela 1) são posteriormente reconhecidos e ativados pelas respectivas células T CD4+ específicas do peptídeo de glúten da lâmina própria intestinal, para induzir uma resposta das células Th1. As células Th1 secretam IFN- α e outras citocinas pró-inflamatórias (KONING; GILISSEN; WIJMENGA, 2005; WOLDEMARIAM *et al.*, WEI *et al.*; 2020).

3.2.1 Peptídeos 33-mer e 26-mer

Entre as proteínas α -gliadinas, o fragmento com 33 aminoácidos de comprimento (aa 57-89), conhecido como peptídeo 33-mer (LQLQPF (PQPQLPY)₃ PQPQPF) tem apresentado maior imunogenicidade para causar DC resistência à proteólise. Este peptídeo tem a fórmula química de C₂₉H₄₉N₇O₉, peso molecular de 631,687 g/mol com 7 doadores de ligação de hidrogênio, 10 aceptores de ligação de hidrogênio, 15 ligações rotativas (ligação com átomo não hidrogênio) e 45 átomos pesados. Ademais, este peptídeo adota estruturas diferentes sob várias condições, incluindo pH, temperatura e quantidade do peptídeo presente (HAUSCH *et al.*, 2002; WOLDEMARIAM *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Seleção de epítomos estimuladores potentes de células T.

Gliadinas			
Peptídeo	Sequência de Amino Ácidos	HLA	tTG
Glia α (206–217)	SGQGSFQPSQQN	DQ8	(+)
Glia α 2 (62–75)	PQPQLPYPQPQLPY	DQ2	(+++)
Glia α 33-mer (56–88)	LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF	DQ2	(+++)
Glia α 9 (57–68)	QLQFPQPQLPY	DQ2	(+++)
Glia α 20 (93–106)	PFRPQQPYPQPQPQ	DQ2	(+++)
Glia γ 1 (138–153)	QPQQPQQSFPQQQRPF	DQ2	(+++)
Glia γ (5) 26mer (26–51)	FLQPQQPFPQQPQQPYPQQPQQPFPQ	DQ2	(+++)
Glia γ 30 (222–236)	VQGQGIIQPQQPAQL	DQ2	(-)
Gluteninas			
Peptídeo	Sequência de Amino Ácidos	HLA	tTG
LMW-GIt-156 (40–59)	QPPFSQQQQSPFSQ	DQ2	(+++)
LMW-GIt-17 (46–60)	QQPFSQQQQQPLPQ	DQ2	(+++)
LMW-GIt (723–735)	QQGYPTSPQQSG	DQ2	(+++)
Glu-5	QQQXPQQPQQF	DQ2	(+++)
Glu-21	PQQSEQSQPFPQPQ	DQ2	(—)

Adaptado de Wei *et al.* (2020)

O peptídeo 33-mer contém principalmente um peptídeo imunogênico QLPYP, que passa pelos linfócitos do epitélio e rompe a estrutura das vilosidades do intestino e possui alta afinidade para o HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (ZHOU *et al.*, 2017; BRZOZOWSKI, 2015). Além disso, o peptídeo 33-mer sob a etapa de hidrólise forma uma estrutura globular em baixa concentração e com o aumento da concentração forma oligômeros mais estáveis. Sob pH ácido, a solubilidade deste peptídeo aumenta, mas deixa colóides insolúveis, o que aumenta a probabilidade de causar DC (HERRERA *et al.*, 2018).

O peptídeo 26-mer (FLQPQQPFPQQPQQPYPQQPQQPFPQ) possui semelhanças ao peptídeo 33-mer, porém faz parte das proteínas γ -gliadinas. Assim como o peptídeo 33-mer, o 26-mer intacto é mais antigênico em comparação com suas contrapartes monovalentes menores. Além disso, o peptídeo 26-mer também é altamente resistente à proteólise da membrana da borda em escova intestinal e também é multivalente. Contudo, este peptídeo não é tão resistente à proteólise pancreática quanto o peptídeo 33-mer devido às suas repetições PQQ, que são fracamente suscetíveis à clivagem da quimotripsina (SHAN *et al.*, 2005; WOLDEMARIAM *et al.*, 2021).

Ambos os peptídeos (33-mer e 26-mer) também contribuem para a resposta humoral mediada por células B contra o glúten selecionado e peptídeos de glúten desamidados, bem como para epítomos do próprio autoantígeno TG2 (SCHUPPAN; JUNKER; BARISANI, 2009; LUNDIN; SOLLID, 2014, BETHUNE; KHOSLA 2012). Dessa forma, a DC pode ser considerada uma doença autodestrutiva que se mantém com o fornecimento contínuo de glúten.

3.3 GÊNERO *BIFIDOBACTERIUM* E DC

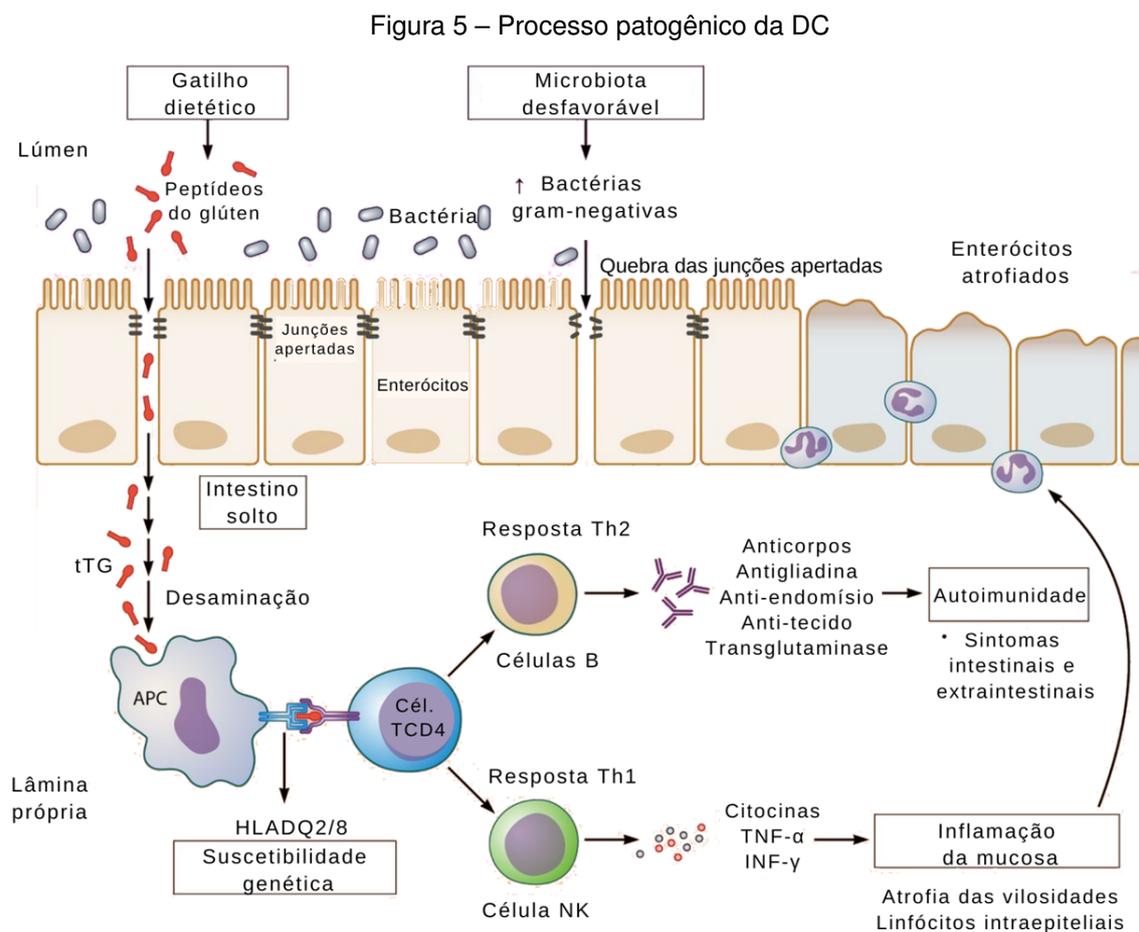
O intestino humano é alinhado por uma única camada de células epiteliais que representa a maior interface entre o ambiente e o hospedeiro. O arranjo estrutural da mucosa intestinal sugere uma conversa cruzada íntima entre as células epiteliais e o sistema imunológico subjacente para a vigilância coordenada do conteúdo do lúmen intestinal. A mucosa intestinal tem a tarefa de manter o equilíbrio entre a absorção de nutrientes e íons, a secreção de fluídos e a proteção contra microrganismos, toxinas e antígenos alimentares presentes no lúmen. As células epiteliais são mantidas juntas por junções apertadas, junções aderentes e desmossomos (FARQUHAR; PALADE, 1963).

Conforme Otani e Furuse (2020), as junções estreitas são junções intercelulares epiteliais localizadas na região mais apical que conecta as células epiteliais e endoteliais vizinhas. Possuem a importante função de formar uma barreira de permeabilidade que restringe a livre difusão de macromoléculas através do espaço intercelular (função de porta). Também atuam como uma barreira de membrana que restringe a mistura de domínios da membrana plasmática apical e basolateral (função de vedação) (ZIHNI *et al.*, 2016). São compostas por proteínas transmembranares, incluindo claudinas, que desempenham papel fundamental na regulação da permeabilidade paracelular, ocludinas (proteínas da zônula de oclusão), moléculas de adesão juncional (JAMs), tricelulina, e angulinas. Essas proteínas transmembranares interagem entre si (interações homofílicas e heterofílicas) e com proteínas de andaime intracelular, incluindo ocludinas, que são ancoradas ao citoesqueleto de actina. A interação de ocludinas, claudinas, JAMs e tricelulina entre células e com as zônulas de oclusão (ZOs) mantém a integridade da junção apertada e controla a passagem de macromoléculas (lipídeos, proteínas) pelo espaço paracelular (FURUSE *et al.*, 1998; FURUSE *et al.*, 1993; GARCIA; NELSON; CHAVEZ, 2017; IKENOUCI *et al.*, 2005). Estudos como os de Fasano (2012) e Sturgeon e Fasano (2016) confirmaram que a zonulina é a única proteína capaz de regular a permeabilidade intestinal por meio da modulação das junções apertadas. Além disso, esta regulação demonstrou estar ligada ao desenvolvimento de vários distúrbios inflamatórios crônicos, dentre elas, a DC.

Foi pontuado por Wang *et al.* (2000) e também por Moraes *et al.* (2014), que após a ingestão do glúten, a glutamina e proteínas que compõem o glúten rico em prolina são parcialmente hidrolisadas por proteases presentes no trato gastrointestinal. Neste processo, ocorre a regulação positiva da proteína zonulina, que está relacionada com a regulação das junções apertadas e parece ser parcialmente responsável pelo aumento da permeabilidade característica do intestino. Como resultado, os peptídeos derivados do glúten gerados podem atingir a lâmina própria (mucosa) por transporte transcelular ou paracelular. Na lâmina própria são modificados pela tTG, que

contribui com o aumento da sua afinidade com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II), tornando-os tóxicos e imunogênicos em HLA-DQ2 ou pacientes contendo DQ8 (SCHUPPAN, 2000). A constante presença de resíduos de prolina determina os peptídeos derivados do glúten como substrato preferido para tTG. As modificações mediadas por tTG ocorrem de duas maneiras: desaminação (clivagem do grupo ϵ -amino de uma cadeia lateral de glutamina) ou mais frequentemente transaminação (reticulação de um resíduo de glutamina do peptídeo de gliadina a um resíduo de lisina de tTG) (NILSEN *et al.*, 1998).

De acordo com Moraes *et al.* (2014), com a apresentação adicional de peptídeos pelas subunidades da proteína HLA-DQ2/DQ8 na superfície das células dendríticas para células T específicas do glúten induz dois níveis de resposta imune: a resposta inata e a resposta adaptativa (mediada por células T auxiliares) com a produção de IFN- γ e IL-15. Assim, tem-se o processo patogênico da DC, que pode ser observado na Figura 5.



Fonte: Adaptado de Moraes *et al.* (2014)

Como resposta ao processo inflamatório pode ocorrer enteropatia imunomediada, inflamação intestinal, seguida de atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e aumento da infiltração por linfócitos intraepiteliais, além de diarreia crônica e

perda de peso. A ligação cruzada entre gliadina e a enzima tTG é covalente, resultando na formação de novos epítomos, que desencadeiam a resposta imune inata e pelos quais os autoanticorpos contra tTG são desenvolvidos (DEWAR; PEREIRA; CICLITIRA, 2004).

Foi visto que os probióticos podem melhorar o sistema digestivo humano usando vários mecanismos. Em geral possuem características para inibir o crescimento de patógenos pela secreção de substâncias químicas como ácidos orgânicos, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio; competir com patógenos por materiais nutritivos; bloquear locais de adesão; ajustar o sistema imunológico; romper receptores de toxinas (VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008). Os probióticos como os do gênero *Bifidobacterium* também possuem efeitos protetores nas células epiteliais contra peptídeos tóxicos derivados da gliadina e impacto terapêutico em pacientes que sofrem de DC (CANDELA *et al.*, 2005).

4 METODOLOGIA

A metodologia consistiu em uma revisão narrativa da literatura em que foi utilizada como questão de pesquisa: "Quais os mecanismos de ação do gênero *Bifidobacterium* spp. sobre as proteínas que desencadeiam a doença celíaca?", e a partir disto foram definidas as seguintes palavras-chaves e seus descritores conforme o DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) e o MeSH (Medical Subject Headings): ((Celiac Disease) OR (Gluten)) AND (*Bifidobacterium*).

As bases de dados utilizadas nesta pesquisa foram: Elsevier's Scopus (SCOPUS), Embase Indexing and Emtree (EMBASE), Web of Science e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS).

Para captura de documentos foram definidos os seguintes limites de busca: estudos publicados entre janeiro de 2008 até o presente momento, em inglês, português ou espanhol sem restrições de área geográfica.

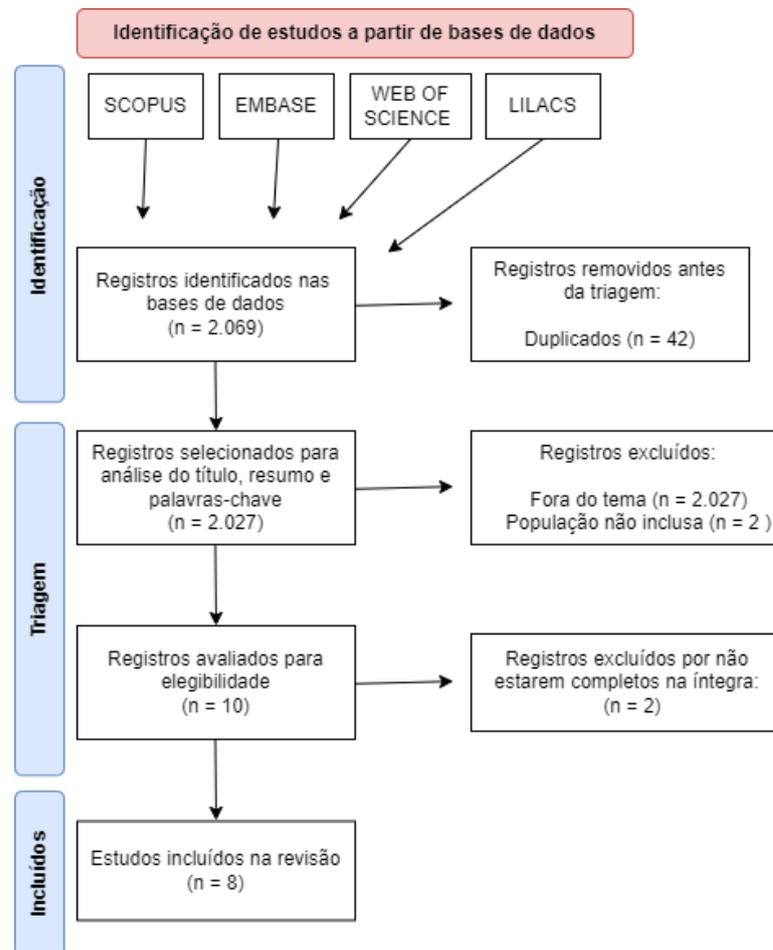
Na análise dos resultados das buscas foram considerados os seguintes critérios de inclusão: acesso ao documento na íntegra ou disponibilizado pelo autor, tipo do documento, estudos *in vitro* e *in vivo* (em animais e humanos).

Os critérios de exclusão foram: documentos duplicados, estudos em indivíduos ou animais não adultos (neonatos, crianças ou idosos) e indivíduos não celíacos. Além disso, documentos fora do tema que abordaram mecanismos do gênero *Bifidobacterium* spp. sobre outras doenças que não a DC também foram excluídos.

5 RESULTADOS

A busca nas bases de dados selecionadas foi realizada no dia 9 de julho de 2022 e foram identificados 2.069 documentos dentro do período de busca estabelecido. Os resultados da busca foram exportados para o gerenciador Mendeley e após esse momento as etapas seguintes foram realizadas nesta plataforma. Dentre os 2.069 documentos, 42 eram repetidos. Após a leitura do título, resumo e palavras-chave foram excluídos 2.027 documentos por não se encaixarem nos critérios de inclusão ou entrarem em algum dos critérios de exclusão. Em mais detalhes, foram excluídos 7 estudos por estarem fora do tema de mecanismos de ação do gênero de probióticos *Bifidobacterium* na DC, 2 estudos por não abordarem humanos adultos e 2 estudos por não possuírem acesso completo ao documento na íntegra, apesar de estarem relacionados ao tema. Assim, 8 estudos foram incluídos nesta revisão, conforme o fluxograma apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma do processo de seleção dos estudos



Fonte: Elaborado pelo autor

Um resumo dos principais mecanismos em que os probióticos do gênero *Bifidobacterium* atuam a partir dos estudos incluídos na revisão pode ser encontrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Resumo dos Mecanismos em que a espécie *Bifidobacterium* atua na ação contra a DC.

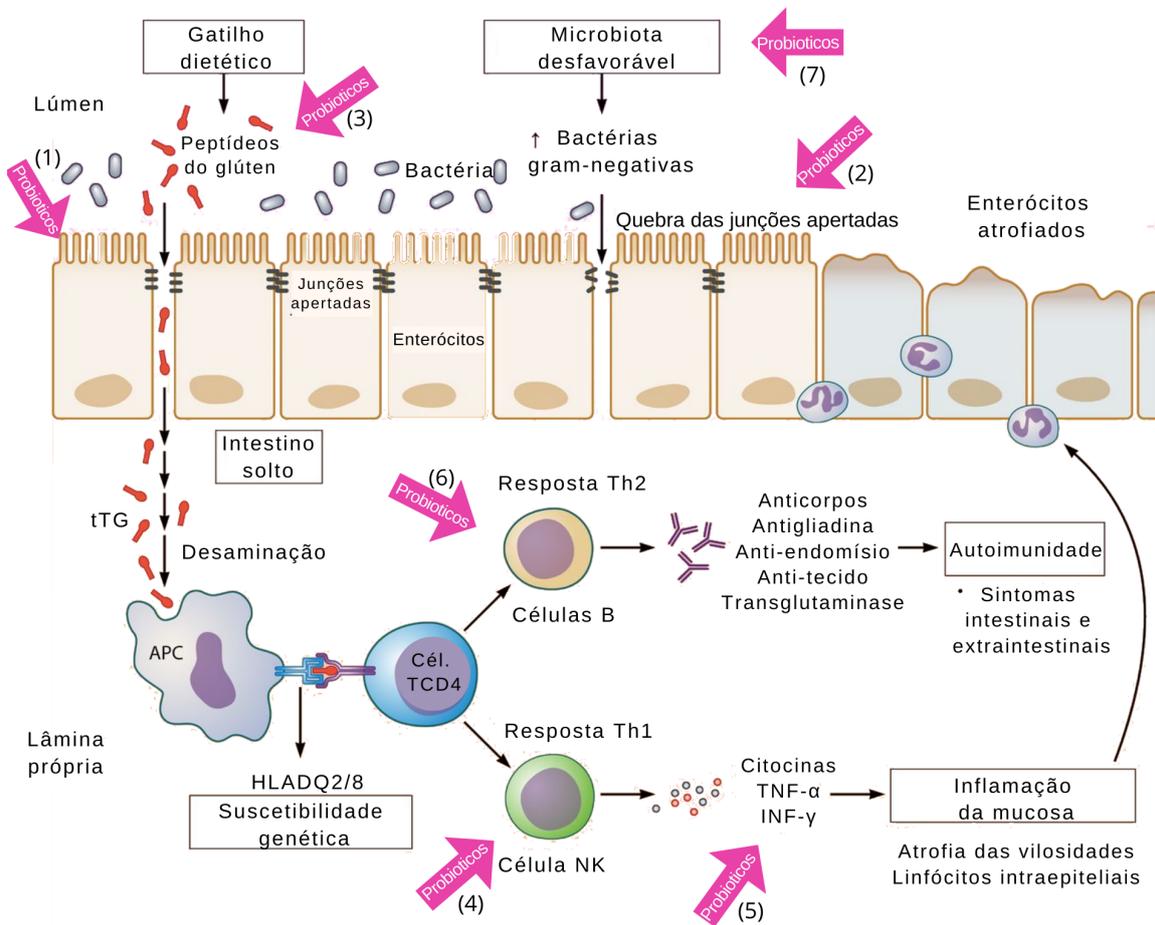
Autor/Ano	Tipo de Estudo	Probiótico(s) Estudado(s)	Mecanismo de Ação
Lindfors <i>et al.</i> (2008)	Modelo experimental <i>in vitro</i>	<i>B. lactis</i>	Indução da expressão da COX-1 em células Caco-2 e redução da expressão de COX-2. Diminuição na ativação de zonulina
Laparra e Sanz (2009)	Modelo experimental <i>in vitro</i>	<i>B. animalis</i> IATA-A2, <i>B. longum</i> IATA-ES1 e <i>B. bifidum</i> IATA-ES2	Hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas. Redução da produção de TNF- α , INF- γ , NF-kB, e IL-1 β . Inibição da expressão de mRNA de CXCR3
Palma <i>et al.</i> (2009)	Modelo experimental <i>in vitro</i>	<i>B. bifidum</i> IATA-ES2 e <i>B. longum</i> ATCC15707	Redução da produção de TNF- α , INF- γ , NF-kB, e IL-1 β
Laparra <i>et al.</i> (2012)	Modelo animal	<i>B. longum</i> CECT 7347	Hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas. Redução da produção de TNF- α , INF- γ , NF-kB, e IL-1 β
Pinto-Sánchez <i>et al.</i> (2017)	Estudo observacional transversal	<i>B. infantis</i> NLS Super Strain	Regulação das Células de Paneth
Smecuol <i>et al.</i> (2020)	Randomizado, cruzado, duplo-cego, controlado por placebo	<i>B. infantis</i> NLS Super Strain	Alteração da Microbiota Intestinal
Almeida <i>et al.</i> (2020)	Modelo experimental <i>in vitro</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> e <i>B. animalis</i>	Redução da produção de TNF- α , INF- γ , NF-kB, e IL-1 β
Giorgi <i>et al.</i> (2020)	Modelo experimental <i>in vitro</i>	<i>L. paracasei</i> 101/37 LMG P-17504, <i>L. plantarum</i> 14 D CECT 4528, <i>B. animalis subsp. lactis</i> Bi1 LMG P-17502, <i>B. breve</i> Bbr8 LMG P-17501 e <i>B. breve</i> BL10 LMG P-17500	Hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas

Fonte: Elaborado pelo autor

6 DISCUSSÃO

A partir do processo patogênico da DC, os possíveis mecanismos de ação de *Bifidobacterium* spp. foram elucidados. A Figura 7 aponta exatamente os locais de ação deste gênero, que serão abordados nos estudos selecionados.

Figura 7 – Possíveis vias da ação de *Bifidobacterium* spp. na DC, sendo os mecanismos de ação: (1) indução da expressão de COX-1 em células Caco-2 e redução da expressão de COX-2, o que garante a integridade da mucosa intestinal, (2) diminuição da ativação de zonulina e inibição da expressão de mRNA de CXCR3, o que previne a quebra das junções apertadas (3) hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas, prevenindo o excesso de peptídeos de glúten no lúmen intestinal, (4) e (5) controle da resposta th1, a regulação das células de Paneth e a redução da produção de TNF- α , IFN- γ , NF-kB, e IL-1 β , (6) regulação das células de Paneth, (7) alteração da microbiota intestinal, que está desregulada na DC



Fonte: Adaptado de Moraes *et al.* (2014)

6.1 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-1 EM CÉLULAS CACO-2 E REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE COX-2

As ciclooxigenases (COXs) são enzimas altamente conservadas evolutivamente. As duas formas principais são a COX-1 e COX-2, que são codificadas por dois diferentes genes. Tanto a COX-1 como a COX-2 formam um endoperóxido de prostaglandina instável, a PGH₂, a partir do ácido araquidônico (ROUZER; MARNETT, 2003). A COX-1 é considerada responsável pela produção de prostaglandinas críticas para a manutenção da integridade normal da mucosa, enquanto a COX-2 está associada a um estado inflamatório (IEZZI *et al.*, 2007).

Lindfors *et al.* (2008) associaram o potencial de *B. lactis* em inibir o dano causado pela gliadina por meio da capacidade de desta cepa em promover a expressão COX-1 em células Caco-2 e reduzir a expressão pró-inflamatória de COX-2, dessa forma contribuindo para uma melhora do prognóstico da DC. Contudo, esse mecanismo ainda não foi bem explorado e estabelecido na literatura. Portanto, mais estudos são necessários para estabelecer um mecanismo de ação mais preciso de *B. lactis* sobre estas enzimas.

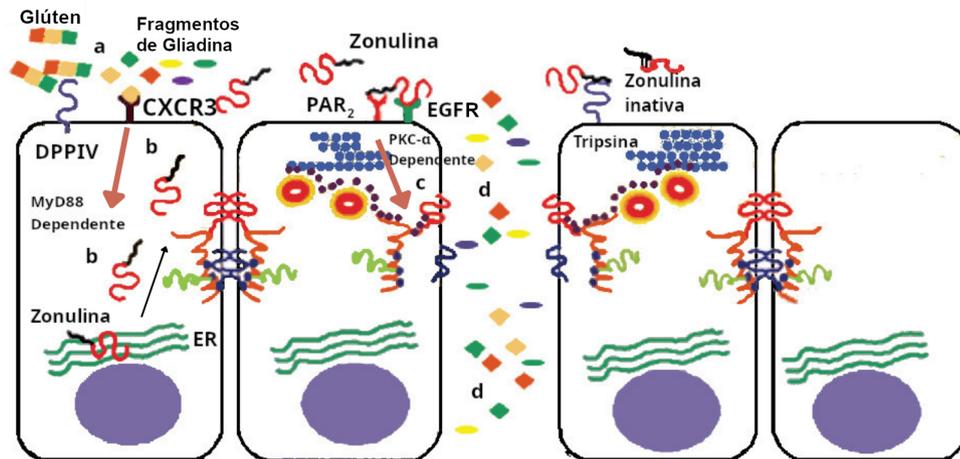
6.2 DIMINUIÇÃO NA ATIVAÇÃO DE ZONULINA - PROTEÍNA ENVOLVIDA NA REGULAÇÃO DA PERMEABILIDADE ENDOTELIAL E EPITELIAL.

Como visto anteriormente, a zonulina é uma proteína moduladora das junções apertadas intercelulares; sua regulação positiva em indivíduos geneticamente suscetíveis pode levar a doenças imunomediadas. Sob circunstâncias fisiológicas, há um controle rígido da circulação de antígenos da mucosa que, em conjunto com células imunes específicas e mediadores de quimiocinas e citocinas, levam à anergia e, portanto, à tolerância da mucosa. A produção excessiva de zonulina causa uma perda da função de barreira, com a subsequente circulação inapropriada e descontrolada de antígenos, induzindo uma resposta imune inata pelo compartimento imune submucoso. Se esse processo continuar, uma resposta imune adaptativa é montada causando a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ e TNF- α que causam maior abertura da via paracelular para a passagem de antígenos, criando um ciclo vicioso (FASANO, 2012).

A gliadina é um gatilho para liberação de zonulina. Dessa forma, quando ocorre a ingestão de gliadina em indivíduos predispostos, os peptídeos de gliadina não digeríveis específicos são capazes de se ligar ao receptor CXCR3 na superfície apical de enterócitos com subsequente liberação de zonulina dependente do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88). Assim, ocorre a ativação do fator de crescimento epidérmico (EGFR) por meio do receptor 2 ativado por proteinase (PAR 2), levando à quebra da junção apertada dependente de proteína quinase C (PKC- α). O aumento da

permeabilidade intestinal leva à passagem paracelular de antígenos não próprios para a lâmina própria, onde são capazes de interagir com o sistema imunológico (Figura 8) (STURGEON; FASANO, 2016).

Figura 8 – Mecanismo de liberação de zonulina a partir da ingestão de gluten (a) Peptídeos específicos de gliadina, (b) CXCR3, (c) PKC- α , (d) antígenos não próprios



Fonte: Adaptado de Sturgeon e Fasano (2016)

O estudo de Lindfors *et al.* (2008) é um exemplo de utilização do gênero *Bifidobacterium* capaz de diminuir a liberação de zonulina e assim garantir a reorganização do citoesqueleto e permeabilidade intestinal em relação às gliadinas de trigo não hidrolisadas em indivíduos com DC. Os pesquisadores investigaram a capacidade de *Lactobacillus fermentum* e *Bifidobacterium lactis* em reduzir os efeitos tóxicos dos peptídeos de gliadina na linhagem celular Caco-2, por meio de um modelo experimental *in vitro*. Para verificar o potencial dos probióticos em minimizar os danos induzidos pela gliadina resistente à pepsina-tripsina (PT-gliadina) sob as células do cólon humano Caco-2, foram avaliados os seguintes fatores: permeabilidade epitelial de acordo com a resistência transepitelial, arranjos do citoesqueleto de actina através da extensão do enrugamento da membrana e expressão da proteína de junção estreita (zonulina).

Foi verificado no estudo de Lindfors *et al.* (2008) que *B. lactis* neutraliza o aumento na permeabilidade das células epiteliais induzido pela gliadina. Na concentração de 10^6 UFC/mL da bactéria, *B. lactis* forneceu alguma proteção e a concentração mais alta testada (10^7 UFC/mL) proteção total contra alterações na resistência transepitelial induzidas por gliadina. A mesma cepa bacteriana também inibiu a formação de enrugamentos de membrana em células Caco-2 induzidas pela administração de gliadina. As culturas de células Caco-2 suplementadas com concentração 10^7 UFC/mL de *B. lactis* foram capazes de reduzir a porcentagem de enrugamento da membrana ao nível do controle utilizado, PT-BSA (do inglês, *peptic-*

tryptic digest of bovine serum albumin). Além disso, *B. lactis* foi capaz de minimizar os efeitos sobre as junções apertadas das células Caco-2 pela expressão da proteína zonulina, contra os efeitos da gliadina.

6.3 HIDRÓLISE DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DE GLIADINAS E INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA DE CXCR3 E REDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF- α , INF- γ , NF-KB, E IL-1 β

Ao considerar as principais proteínas da dieta, o glúten é o único que contém 15% de resíduos de prolina e 35% de glutamina. A alta concentração de glutamina e especialmente de prolina, impede a degradação completa por enzimas gástricas e pancreáticas humanas e resulta no acúmulo de oligopeptídeos no intestino delgado que são resistentes à proteólise adicional e tóxicos para indivíduos com DC (STEPNIAK *et al.*, 2006; ANGELIS *et al.*, 2010). Nesse contexto, diversos estudos como Giorgi *et al.* (2020), Cristofori *et al.* (2020), Laparra e Sanz (2009) e Laparra *et al.* (2012), estudaram o potencial dos probióticos, mais especificamente a espécie *Bifidobacterium* como uma alternativa para a hidrólise dos peptídeos do glúten que não são degradados em indivíduos que possuem DC.

Ademais, os peptídeos derivados de gliadina com sequências de aminoácidos específicas estimulam respostas celulares pró-inflamatórias em enterócitos e células imunocompetentes por meio das vias de sinalização do receptor CXCR3 associado ao receptor de quimiocina (LAMMERS *et al.*, 2008). Os peptídeos derivados da gliadina induzem a de NF-kB e a secreção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à imunidade inata, como interleucinas e TNF- α BECKETT *et al.*, 1999; NILSEN *et al.*, 1998.

O estudo de Giorgi *et al.* (2020) não utilizou apenas as cepas de *Bifidobacterium*, mas sim uma mistura que as continha. A mistura utilizada foi: *Lactobacillus paracasei* 101/37 LMG P-17504, *Lactobacillus plantarum* 14 D CECT 4528, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bi1 LMG P-17502, *Bifidobacterium breve* Bbr8 LMG P-17501 e *Bifidobacterium breve* BL10 LMG P-17500. Foi demonstrado por meio de experimentos como eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), medições de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e experimentos de fracionamento molecular que o tratamento da mistura de fragmentos de PT-gliadina com bactérias probióticas é capaz de diminuir significativamente a dimensão molecular desses fragmentos. Conforme estimado por um ensaio ELISA específico, há maior quantidade de peptídeos com peso molecular inferior a 3 Kilo Dalton (kDa) em PT-gliadina quando inoculada com a mistura de probióticos ao se comparar com PT-gliadina isolada.

As cepas probióticas do estudo de Giorgi *et al.* (2020) foram capazes de reduzir

a quantidade do peptídeo imunotóxico 33-mer quando este composto era a única fonte de aminoácidos. Isso confirma que as bactérias selecionadas possuem um sistema de transporte específico para ingestão de oligopeptídeos imunogênicos, como já sugerido para outras cepas bacterianas (RIZZELLO *et al.*, 2007). A presença de algumas cepas de *Bifidobacterium B. bifidum* IATA-ES2, *B. longum* IATA-ES1 e *B. animalis* IATA-A2 no processo de digestão intestinal da gliadina gerou diferentes sequências de fragmentos *in vitro*, com menor massa molecular do que aqueles decorrentes de amostras não tratadas no estudo de Laparra *et al.* (2012), que será abordado a seguir.

Giorgi *et al.* (2020) constatou ainda que a mistura probiótica apresentou características de uma combinação de diferentes peptidases, o que contribuiu para a hidrólise do peptídeo 33-mer. De acordo com um estudo anterior (ANGELIS *et al.*, 2010), pelo menos três peptidases (PepN, PepX e PepO) são necessárias para hidrolisar o epítipo 33-mer sem geração de peptídeos imunogênicos derivados. O estudo de Angelis *et al.* (2010) identificou 10 cepas de lactobacilos que, quando agrupados, forneceram as peptidases necessárias para degradar completamente os peptídeos de glúten imunogênicos, incluindo o 33-mer, envolvido na DC. Para o estudo de Giorgi *et al.* (2020), uma combinação de diferentes cepas foi necessária para degradação dos peptídeos de glúten, estando de acordo com estudos anteriores como Angelis *et al.* (2010) e Angelis *et al.* (2016) que afirmaram que nenhuma cepa bacteriana possui todas as peptidases necessárias para hidrolisar completamente os epítopos imunogênicos do glúten. Sendo assim, as duas cepas de lactobacilos e três cepas de bifidobactérias foram complementares para a hidrólise efetiva de epítopos imunogênicos. Os fragmentos de baixa massa molecular gerados após o tratamento bacteriano parecem prevenir a ruptura das proteínas da junção apertada, atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, superando o efeito negativo induzido pela PT-gliadina não tratada.

A pesquisa de Laparra e Sanz (2009) diferente de Giorgi *et al.* (2020), utilizou apenas probióticos da espécie *Bifidobacterium* e de forma individual ou em mistura, sendo estas: *B. animalis* IATA-A2, *B. longum* IATA-ES1 e *B. bifidum* IATA-ES2.

No modelo experimental de Laparra e Sanz (2009), peptídeos derivados de digestões não inoculadas com bifidobactérias, sequências de aminoácidos como α/β -Gliadina [122-141] e α/β -Gliadina [158-164] foram identificadas. Conforme comprovado por Lammers *et al.* (2008), sequências semelhantes a estas interagem com o receptor CXCR3, que tem implicação no rearranjo do citoesqueleto, como já citado anteriormente. As sequências de aminoácidos identificadas no estudo de Laparra e Sanz (2009) não foram detectadas nas digestões de gliadina inoculadas com bifidobactérias (Tabela 2). Neste contexto, as digestões inoculadas com *B. bifidum*, *B. longum* e *B. animalis* não aumentaram a expressão do mRNA de CXCR3 em contraste com as outras amostras de gliadina digeridas, o que poderia contribuir para manter a

integridade da barreira intestinal. Em contrapartida, digestões de gliadinas inoculadas ou não com *B. bifidum* e *B. animalis* foram citotóxicos para células epiteliais intestinais. *B. longum* não demonstrou citotoxicidade, portanto um estudo posterior (Laparra *et al.* (2012)) avaliou uma cepa específica de *B. longum* (*B. longum* CECT 7347).

Tabela 2 – Peptídeos derivados de gliadinas nos dialisados de diferentes digestões gastrointestinais de gliadinas inoculadas ou não com bifidobactérias.

Gliadinas	
Peptídeo	Sequência de Aminoácidos
α / β -Gld [158–164]	QVLQQST
γ -Gld [145–162]	VSSLWSIILPPSDCQVMR
α / β -Gld [122–141]	QQQQQQQQILQQILQQQILP
γ -Gld [222–243]	QGIIQPQQPTQLEVFRSLVLQT
γ -Gld [90–110]	QPFQSKQPQQPFQPQQPQQ
Gliadinas + <i>B. animalis</i>	
Peptídeo	Sequência de Amino Ácidos
γ -Gld [201–212]	QILVPLSQQQQV
ω -Gld [270–285]	SFPQQPQQPFPTTTK
ω -Gld [71–386]	QPQQPYPQQQPYGSSL
ω -Gld [310–330]	SQQSFLQPQQPQQPSILQP
α / β -Gld [233–269]	GFFQPSQNPQAQGSFQPQQLPQFEAIRNLALQTLPA
Gliadina + <i>B. bifidum</i>	
Peptídeo	Sequência de Amino Ácidos
ω -Gld [37–44]	FSHQQQPF
ω -Gld [310–318]	SQQSFLQPQ
α / β -Gld [52–62]	GQQQPFPPQQP
α / β -Gld [235–246]	FQPSQQNPQAQG
ω -Gld [358–375]	SQQPQQPFPPQQPHQPQQP
γ -Gld [68–87]	QPQQPYPQQPQQPFQTQQP
Gliadina + <i>B. longum</i>	
Peptídeo	Sequência de Amino Ácidos
ω -Gld [62–68]	SQQPFPT
ω -Gld [253–259]	QPQQLPQ
γ -Gld [91–97]	QPQQPFP
α / β -Gld [195–202]	IILHQQQQ
γ -Gld [123–132]	SLQQQLNPCK
α / β -Gld [193–211]	QQPLSQVSFQQPQQQYPSG
ω -Gld [131–150]	LQPQQPFPPQQPQQPFQPQLP

Fonte: Adaptado de Laparra e Sanz (2009)

Laparra e Sanz (2009) estudaram ainda a inibição da resposta inflamatória induzida por gliadinas em células epiteliais intestinais através de modificações na geração de peptídeos tóxicos durante a digestão. Os efeitos inibitórios produzidos pelas bifidobactérias sobre as respostas pró-inflamatórias às gliadinas pelas células Caco-2 variam de acordo com a cepa considerada. Entre as cepas testadas, *B. longum* exerceu

os efeitos inibitórios mais fortes tanto na ativação de NF- κ B quanto na produção de TNF- α induzida por peptídeos derivados de gliadina em células epiteliais intestinais. Esses efeitos podem ter consequências importantes na função da barreira intestinal, pois o TNF- α aumenta a permeabilidade dependente das junções apertadas, cuja indução envolve a ativação do NF- κ B (MA *et al.*, 2004). Além disso, os peptídeos derivados da gliadina estimulam os enterócitos por meio do receptor de quimiocina CXCR3 acoplado à proteína G transmembrana, que está envolvido no rearranjo do citoesqueleto em tecidos inflamados e na liberação de zonulina.

Por fim, o mecanismo de ação sugerido no estudo de Laparra e Sanz (2009) é de que as digestões de gliadina inoculadas com *B. bifidum* e *B. longum* não aumentaram a expressão de mRNA de CXCR3 em contraste com as outras amostras de gliadina digeridas, o que poderia contribuir para manter a integridade da barreira intestinal. A redução da produção de TNF- α por digestão com gliadina inoculada com *B. longum* também pode ter implicações fisiológicas importantes para DC, uma vez que TNF- α em conjunto com IL-1 β são as citocinas mais importantes envolvidas na ativação de óxido nítrico sintase (NOS), que de acordo com Hoffman (2000) é considerada uma enzima mediadora na interação de linfócitos intra epiteliais e células epiteliais intestinais, o que promove inflamação tecidual. Foi visto ainda que o TNF- α também apresenta efeito positivo na produção de IL-8, que é uma quimiocina prototípica que atrai células inflamatórias como os neutrófilos. Uma infiltração prolongada de neutrófilos perpetuaria as respostas inflamatórias e contribuiria para o dano celular e disfunção da barreira epitelial. Os dados relatados ampliam o espectro de efeitos benéficos que as bactérias probióticas podem exercer sobre a função das células epiteliais intestinais na DC e justificam sua possível avaliação em indivíduos com DC.

Outra pesquisa que considerou como foco cepas de *B. bifidum* e *B. longum* foi a de Palma *et al.* (2009) que avaliou os possíveis efeitos imunomoduladores de *B. bifidum* IATA-ES2 e *B. longum* ATCC15707 em comparação com os de bactérias Gram-negativas intestinais (*Bacteroides fragilis* DSM2451, *E. coli* CBL2 e *Shigella* CBD8) em modelo *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) sob os efeitos da gliadina e/ou IFN- γ , simulando a situação da DC em modelo experimental. Os efeitos dessas cepas e sua combinação com gliadinas e IFN- γ também foram avaliados em coculturas de PBMCs com células Caco-2 para avaliar o papel das bactérias intestinais e sua interação com o hospedeiro na DC. É interessante ressaltar que as PBMCs têm sido usadas como modelo *in vitro*, pois sabe-se que os monócitos da mucosa intestinal são constantemente reabastecidos por monócitos do sangue. Além disso, as células dendríticas da mucosa que se acumulam na lesão celíaca são responsáveis pela ativação das células T intestinais sensíveis ao glúten e são recrutadas a partir de monócitos do sangue periférico (RAKHIMOVA *et al.*, 2008).

Comparando as cepas de *Bifidobacterium* com as bactérias Gram-negativas

estudadas por Palma *et al.* (2009), *B. bifidum* IATA-ES2 e *B. longum* ATCC15707 induziram uma menor produção de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e/ou IL-12) e induziram a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, o que poderia ajudar a controlar a resposta imune com tendência Th1 característica da DC. Em particular, a estimulação de *B. bifidum* IATA-ES2 levou à menor produção de TNF- α , que juntamente com IFN- γ , são conhecidos por aumentar a permeabilidade epitelial intestinal favorecendo o acesso de maiores cargas de antígenos à submucosa na DC (FASANO; SHEA-DONOHUE, 2005).

As cepas individuais exibiram efeitos imunomoduladores distintos nas células dendríticas, e os efeitos anti-inflamatórios mais marcantes foram produzidos pelas bifidobactérias, que aumentaram a produção de IL-10, diminuíram a expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD40 e diminuíram a produção de IFN- γ por células T. A sinalização através de CD40 é conhecida por aumentar a produção de IL-12 por células dendríticas, o que pode contribuir para o fenótipo de DC com viés Th1. A regulação positiva das moléculas coestimuladoras de DC, CD80 e CD86, em células apresentadoras de antígenos também favorece a ligação a CD28 e CD152 (CTLA4) em células T e pode influenciar o tipo de resposta das células T contribuindo para a resposta Th1 (HART, 2004; MACATONIA *et al.*, 1995). Por fim, a presença de gliadina não pareceu influenciar os efeitos das bactérias nos marcadores de superfície celular, mas a presença de IFN- γ aumentou a indução da expressão de CD40 na presença de *Shigella* CBD8.

Como mencionado anteriormente, o estudo de Laparra *et al.* (2012) utilizou apenas uma cepa de *Bifidobacterium* spp.: *B. longum* CECT 7347. Diferente dos estudos anteriores, esta pesquisa realizou estudos em um modelo animal. A presença de *B. longum* CECT 7347 durante a digestão intestinal da gliadina levou à geração de diferentes sequências peptídicas e redução seus efeitos tóxicos e inflamatórios nas células epiteliais intestinais, da mesma forma que em Laparra e Sanz (2009). Laparra *et al.* (2012) relatou pela primeira vez os efeitos da alimentação de uma cepa bifidobacteriana (*B. longum* CECT 7347) em um período pós-natal precoce na arquitetura da mucosa intestinal e marcadores de imunidade inata e adaptativa em um modelo animal experimental de enteropatia induzida por gliadina. Foi necessária a sensibilização de animais com IFN- γ visto que esta citocina inflamatória parece ser necessária para causar danos na mucosa e alterações imunológicas semelhantes às observadas na DC humana (ŠTEPÁNKOVÁ *et al.*, 2003). Contudo, apenas a sensibilização com IFN- γ não ocorreram alterações histológicas no estudo. Dessa forma, o modelo animal utilizado no estudo de Laparra *et al.* (2012) aproxima-se de um estado intermediário entre as fases proliferativa e destrutiva da DC que leva à completa atrofia das vilosidades e à ruptura da integridade do epitélio intestinal nos indivíduos que possuem a DC completamente desenvolvida (CLEMENTE *et al.*, 2003;

SCHUPPAN; JUNKER; BARISANI, 2009).

Laparra *et al.* (2012) demonstrou ainda que a expressão de NF-kB foi aumentada em animais sensibilizados com IFN- γ e alimentados com gliadina, de acordo com a ativação de NF-kB encontrada na mucosa intestinal de pacientes com DC (MAIURI *et al.*, 2003). A ativação de NF-kB foi identificada como o mecanismo pelo qual a gliadina medeia a produção de TNF α em enterócitos e monócitos humanos (LAPARRA; SANZ, 2009; JELÍNKOVÁ *et al.*, 2004). No entanto, a administração de gliadina sozinha não induziu a expressão de NF-kB nem a produção de TNF α em comparação com os controles. É possível que a gliadina administrada isoladamente estimule uma resposta regulatória refletida na regulação negativa da expressão de RNAm de NF-kB e no aumento da produção de IL-10 levando à tolerância nesses animais, que não são geneticamente predispostos à doença.

Laparra *et al.* (2012) evidenciou diferenças significativas entre as propriedades imunomoduladoras de *B. longum* CECT 7347 e *L. casei* ATCC 9595, uma vez que esta última cepa foi incapaz de resgatar a produção de IL-10 no modelo de enteropatia de camundongos transgênicos HLA-DQ8 em outro estudo (D'Arienzo *et al.* (2011)). A produção de IL-10 também foi estimulada pela administração de *B. longum* CECT 7347 sozinho em camundongos de controle, mas não de TNF- α , que é uma indicação adicional das propriedades anti-inflamatórias desta cepa também na ausência de outros estímulos, como gliadina ou uma condição inflamatória. A IL-10 parece ser indispensável para a indução da tolerância oral a antígenos dietéticos, inibição da produção de quimiocinas, capacidade de apresentação de antígenos de monócitos e macrófagos e indução da produção de antagonistas solúveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF α (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009).

O estudo de Almeida *et al.* (2020) avaliou o efeito das espécies de *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve* e *B. animalis* sobre a digestão de proteínas intactas do glúten (gliadinas e gluteninas) e as respostas imunomoduladoras associadas induzidas pelos peptídeos resultantes. Após a análise da citototoxicidade dos peptídeos gerados a partir da ingestão de glúten percebeu-se que todos os peptídeos digeridos com glúten em amostras não inoculadas com espécies de *Bifidobacterium* apresentaram uma notável resposta citotóxica às células epiteliais intestinais. Em contrapartida, os peptídeos obtidos das culturas de *Bifidobacterium* mostraram uma redução significativa no efeito citotóxico, especialmente aqueles gerados pela presença de *B. longum*. A redução do efeito citotóxico observado para amostras resultantes de culturas de *Bifidobacterium* se mostrou mais evidente após tempo de exposição prolongado, por exemplo, 48h, em comparação com as respostas observadas de amostras não inoculadas contendo peptídeos de glúten (controles positivos), indicando que as bifidobactérias ajudam na redução a inativação das atividades endossomais/lisossomais causadas pelo glúten.

Almeida *et al.* (2020) avaliou a resposta imunológica dos peptídeos digeridos

por glúten gerados a partir das culturas de *Bifidobacterium* por meio do monitoramento da produção de TNF- α e (IL)-1 β e da ativação de NF-kB relacionada à resposta imune inata. A ativação de NF-kB na mucosa intestinal de pacientes com DC é comum e a expressão das citocinas TNF- α e (IL)-1 β é regulada positivamente para alguns peptídeos de glúten. Os peptídeos digeridos com glúten gerados a partir de amostras não inoculadas mostraram a ativação de vias pró-inflamatórias, desencadeando a ativação de NF-kB (subunidade nuclear p65) e produção de citocinas (TNF- α e (IL)-1 β). Em contraste, os fragmentos de glúten formados pelas culturas de *Bifidobacterium* induzem claramente uma diminuição nos fatores de transcrição e nos níveis de citocinas em comparação com as respectivas amostras não inoculadas. Além disso, a redução da expressão de TNF- α e ativação de NF-kB mostrou-se dependente das espécies de *Bifidobacterium* utilizadas.

6.4 REGULAÇÃO DE CÉLULAS PANETH

As PCs são células localizadas na porção basal do intestino delgado, sendo um componente essencial da homeostase intestinal. Essas células desempenham um papel crucial na imunidade inata do hospedeiro, pois agem contra patógenos entéricos ao secretarem defensinas, lisozima e fosfolipase A2 (SABATINO *et al.*, 2008). Os peptídeos antimicrobianos secretados pelos PCs moldam a composição da microbiota intestinal e protegem da translocação bacteriana descontrolada (CLEVERS; BEVINS, 2013; PISCAGLIA, 2014). Dentre os peptídeos antimicrobianos secretados pelas PCs estão as α -defensinas (HD) humanas mais abundantes: HD-5 e HD-6. A α -defensina HD-5 ajuda a manter o equilíbrio microbiano no intestino e está ligada à imunidade inata e adaptativa (SABATINO *et al.*, 2008). Em um estudo anterior foi observado que na DC ativa, a expressão de PCs e consequentemente, HD-5 encontra-se aumentada e normalizada após a DGF (FORSBERG *et al.*, 2004). Contudo, ressalta-se que o estudo de Forsberg *et al.* (2004) trata-se de crianças. Em contraste, em uma compilação de estudos feita por Sabatino *et al.* (2008), foi verificado que as PCs encontram-se reduzidas ou normais em indivíduos adultos com DC.

Atrelado a essas informações e a outro estudo (Smecuol *et al.* (2013)) que demonstrou um efeito sintomático benéfico do uso de *B. infantis* em indivíduos com DC, Pinto-Sánchez *et al.* (2017) levantou a hipótese de que o uso de *B. infantis* pode estar relacionado à modulação da imunidade inata por meio das PCs. O estudo de Pinto-Sánchez *et al.* (2017) investigou os mecanismos potenciais do probiótico *B. infantis* NLS-SS na expressão mucosa de marcadores imunes inatos em indivíduos adultos com DC ativa não tratada em comparação com aqueles tratados com *B. infantis* \times 6 semanas e após 1 ano de DGF. Pinto-Sánchez *et al.* (2017) avaliou os números de macrófagos, PCs e expressão de α -defensina HD-5 por imuno-histoquímica em

biópsias duodenais dos pacientes incluídos no estudo.

O estudo de Pinto-Sánchez *et al.* (2017) mostrou que a DGF diminui a contagem de macrófagos duodenais em pacientes com DC mais efetivamente do que *B. infantis*. Em contraste, *B. infantis* diminui a contagem de PCs e a expressão de HD-5 na DC. Os resultados identificaram efeitos imunes inatos diferentes do tratamento com *B. infantis* em comparação com um ano de DGF. Dessa forma, mais estudos são necessários avaliar se os efeitos deste probiótico específico sobre a imunidade inata afetam a microbiota duodenal. Como o estudo de Pinto-Sánchez *et al.* (2017) apresentou resultados de um tratamento com *B. infantis* independente de uma DGF, mais estudos são necessários para investigar os efeitos sinérgicos da suplementação de DGF e *B. infantis* na DC. Além disso, é preciso ter mais clareza sobre a contagem de PCs e expressão de HD-5 em indivíduos adultos para assim se ter uma melhor compreensão sobre os benefícios da suplementação com *B. infantis* na DC.

6.5 ALTERAÇÃO NO MICROBIOMA INTESTINAL

A pesquisa de Smecuol *et al.* (2020) teve como motivação um estudo do mesmo grupo ((SMECUOL *et al.*, 2013)) e o estudo de Pinto-Sánchez *et al.* (2017) pois estes obtiveram êxito ao utilizar a cepa *Bifidobacterium infantis* NLS-SS. Dessa forma, Smecuol *et al.* (2020) investigou o efeito de *B. infantis* na DC tratada em indivíduos com sintomas gastrointestinais (GI) persistentes apesar da adesão à GFD por meio de um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego, controlado por placebo em indivíduos adultos sintomáticos com DC em uma GFD por pelo menos dois anos.

Smecuol *et al.* (2020) selecionou indivíduos adultos (> 18 anos) que apresentassem diagnóstico de DC com base nos critérios atuais (biópsia duodenal anormal concordante [danos de Marsh III] e sorologia específica para DC positiva) enquanto estivessem em uma dieta contendo glúten. Para participar, os indivíduos tinham que estar em GFD por pelo menos dois anos e ser sintomáticos no momento da triagem (Gastrointestinal Symptom Rate Score [GSRS]).

Os indivíduos selecionados foram instruídos a tomar duas cápsulas de *B. infantis* NLS-SS contendo 2×10^9 UFC/cápsula para ser ingeridas três vezes ao dia, ou placebo, por três semanas. Após um período de eliminação (wash-out) de duas semanas, os indivíduos trocaram de tratamento pelas próximas três semanas. A pontuação dos escore do índice de sintomas celíacos (CSI) foi realizada no início e no final de cada período de tratamento. A avaliação dietética foi realizada por um nutricionista em cada ponto de tempo para determinar transgressões DGF.

As amostras de fezes foram coletadas em condições de anaerobiose. Após, o DNA total fecal foi extraído e os dados foram sequenciados. As amostras de sangue foram obtidas de todos os pacientes durante e após cada período de tratamento para

sorologia relacionada à DC incluindo: (1) imunoglobulina (Ig)A a-tTG e (2) peptídeo de gliadina desamidado IgA (IgADGP), ambos por ELISA. O "cut-off" para ambos anticorpos foi de 20 UI/ml. A detecção de peptídeos imunogênicos de glúten (GIP) nas fezes e na urina foi realizada na triagem e após cada tratamento para detectar a exposição ao glúten.

Ao final do estudo de Smecuol *et al.* (2020) incluiu doze indivíduos para análise. Embora não se tenha observado diferenças entre os tratamentos com placebo e *B. infantis* NLS-SS na população geral, a subanálise em pacientes com maior carga clínica (CSI acima da mediana), mostrou que *B. infantis* melhorou os escores de sintomas celíacos específicos em comparação com aqueles que receberam placebo. Esses indivíduos se consideravam estritamente em conformidade com a GFD.

Para explorar os mecanismos potenciais associados ao benefício sintomático de *B. infantis*, os perfis da microbiota fecal foram investigados por sequenciamento de RNA 16S. A falta de amostras duodenais para análise histológica demonstrou uma deficiência no estudo de Smecuol *et al.* (2020), pois impossibilitou a análise do perfil da microbiota duodenal. No entanto, os perfis fecais representam a microbiota intestinal geral nos indivíduos durante os tratamentos com *B. infantis* e placebo. O perfil da microbiota fecal alterados pela administração de *B. infantis*, sugerindo modificação da composição da microbiota intestinal durante o tratamento curto com *B. infantis*. Além disso, a abundância de *B. infantis* foi maior durante o tratamento probiótico e os níveis de *B. longum* foram maiores em indivíduos com os maiores escores de sintomas, o que sustenta que as Bifidobactérias podem sofrer alterações no intestino e este fator pode estar relacionado com a resposta benéfica observada nesse subgrupo. Entretanto estudos futuros devem investigar se a microbiota do intestino delgado é afetada por *B. infantis* e como isso se correlaciona com a melhora da sintomatologia e histologia persistentes, particularmente após um período de tratamento mais longo e com um número maior de participantes.

7 CONCLUSÕES

A espécie de probióticos *Bifidobacterium* apresentou características promissoras para um possível tratamento da DC. Por este motivo, ao longo do tempo surgiram diversos estudos sobre o tema.

Os artigos incluídos neste trabalho apresentaram sete mecanismos de ação de *Bifidobacterium* spp.:

- (i) indução da expressão de COX-1 em células Caco-2 e redução da expressão de COX-2;
- (ii) diminuição da ativação de zonulina;
- (iii) hidrólise de peptídeos derivados de gliadinas;
- (iv) inibição da expressão de mRNA de CXCR3;
- (v) redução da produção de TNF- α , NFkB, e IL-1 β ;
- (vi) regulação de células de Paneth; e
- (vii) alteração da microbiota intestinal.

Apesar de ter encontrado estudos sobre o uso da espécie de probióticos *Bifidobacterium* spp., poucos foram realizados *in vivo*. Além disso, há pouco aprofundamento sobre os mecanismos envolvidos na ação das bifidobactérias sobre a DC. É importante ressaltar que nenhuma evidência conclusiva foi encontrada de que a administração de *Bifidobacterium* spp. possa prevenir o início da DC ou que a DGF possa ser descartada. Portanto, mais estudos sobre o tema são necessários para esclarecer se *Bifidobacterium* spp. pode ajudar a tratar ou prevenir a DC.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. E. C. de *et al.* Digestion of intact gluten proteins by bifidobacterium/i species: Reduction of cytotoxicity and proinflammatory responses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 68, n. 15, p. 4485–4492, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01421>.
- ANGELIS, M. D. *et al.* Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from *triticum turgidum*/i l. var. *idurum*/i by sourdough lactobacilli and fungal proteases. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 76, n. 2, p. 508–518, jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.01630-09>.
- ANGELIS, M. D. *et al.* Salivary and fecal microbiota and metabolome of celiac children under gluten-free diet. **International Journal of Food Microbiology**, Elsevier BV, v. 239, p. 125–132, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.025>.
- BAKSHI, A. *et al.* Emerging therapeutic options for celiac disease: potential alternatives to a gluten-free diet. **Gastroenterol. Hepatol. (N. Y.)**, v. 8, n. 9, p. 582–588, set. 2012.
- BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Informa UK Limited, v. 55, n. 3, p. 357–368, set. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.654863>.
- BECKETT, C. G. *et al.* Gluten-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine release by cultured coeliac small intestinal biopsies. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 11, n. 5, p. 529–536, maio 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00042737-199905000-00011>.
- BETHUNE, M. T.; KHOSLA, C. Oral enzyme therapy for celiac sprue. In: **Methods in Enzymology**. Elsevier, 2012. p. 241–271. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416039-2.00013-6>.
- BIESIEKIERSKI, J. R. What is gluten? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Wiley, v. 32, p. 78–81, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>.
- BROMILOW, S. *et al.* A curated gluten protein sequence database to support development of proteomics methods for determination of gluten in gluten-free foods. **Journal of Proteomics**, Elsevier BV, v. 163, p. 67–75, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.026>.
- BRZOZOWSKI, B. Immunoreactivity of wheat proteins modified by hydrolysis and polymerisation. **European Food Research and Technology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 242, n. 7, p. 1025–1040, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2608-6>.
- CANDELA, M. *et al.* Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to caco-2 cells: Competition between bifidobacteria and enteropathogens. **Research in Microbiology**, Elsevier BV, v. 156, n. 8, p. 887–895, set. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.04.006>.

CLEMENTE, M. G. *et al.* Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. **Gut**, BMJ Publishing Group, v. 52, n. 2, p. 218–223, 2003. ISSN 0017-5749. Disponível em: <https://gut.bmj.com/content/52/2/218>.

CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth cells: Maestros of the small intestinal crypts. **Annual Review of Physiology**, Annual Reviews, v. 75, n. 1, p. 289–311, fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183744>.

CRISTOFORI, F. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body. **Frontiers in Immunology**, Frontiers Media SA, v. 12, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>.

CRISTOFORI, F. *et al.* Bacterial-based strategies to hydrolyze gluten peptides and protect intestinal mucosa. **Frontiers in Immunology**, Frontiers Media SA, v. 11, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567801>.

CRISTOFORI, F. *et al.* Probiotics in celiac disease. **Nutrients**, MDPI AG, v. 10, n. 12, p. 1824, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10121824>.

DAMODARAN, S.; FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. (Ed.). **Fennema's food chemistry, fourth edition**. 4. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. **Química de Alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2009. ISBN 9788536323343. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=bdAVu_tQGi0C.

D'ARIENZO, R. *et al.* Immunomodulatory effects of lactobacillus casei administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, Wiley, v. 74, n. 4, p. 335–341, set. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02582.x>.

DEWAR, D.; PEREIRA, S. P.; CICLITIRA, P. J. The pathogenesis of coeliac disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Elsevier BV, v. 36, n. 1, p. 17–24, jan. 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00239-5](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00239-5).

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA. **Journal of Cell Biology**, Rockefeller University Press, v. 17, n. 2, p. 375–412, maio 1963. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.17.2.375>.

FASANO, A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: Diagnostic and therapeutic implications. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Elsevier BV, v. 10, n. 10, p. 1096–1100, out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.08.012>.

FASANO, A. *et al.* Nonceliac gluten sensitivity. **Gastroenterology**, Elsevier BV, v. 148, n. 6, p. 1195–1204, maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.12.049>.

FASANO, A.; SHEA-DONOHUE, T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 2, n. 9, p. 416–422, set. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0259>.

FERNÁNDEZ, A.; GONZÁLEZ, L.; FUENTE, J. de la. Coeliac disease: clinical features in adult populations. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, SciELO Espana/Repisalud, v. 102, n. 8, ago. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4321/s1130-01082010000800002>.

FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO, M. J. *et al.* Celiac disease and HLA-DQ genotype: diagnosis of different genetic risk profiles related to the age in badajoz, southwestern spain. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, SciELO Espana/Repisalud, v. 105, n. 8, p. 469–476, set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4321/s1130-01082013000800005>.

FERRARI, E. *et al.* Probiotics supplements reduce ER stress and gut inflammation associated with gliadin intake in a mouse model of gluten sensitivity. **Nutrients**, MDPI AG, v. 13, n. 4, p. 1221, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu13041221>.

FORSBERG, G. *et al.* Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. **The American Journal of Gastroenterology**, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 99, n. 5, p. 894–904, maio 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.04157.x>.

FRANCAVILLA, R. *et al.* Selected probiotic lactobacilli have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 83, n. 14, jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.00376-17>.

FURUSE, M. *et al.* Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **Journal of Cell Biology**, Rockefeller University Press, v. 141, n. 7, p. 1539–1550, jun. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1539>.

FURUSE, M. *et al.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **Journal of Cell Biology**, Rockefeller University Press, v. 123, n. 6, p. 1777–1788, dez. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777>.

GARCIA, M. A.; NELSON, W. J.; CHAVEZ, N. Cell–cell junctions organize structural and signaling networks. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 10, n. 4, p. a029181, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181>.

GIORGI, A. *et al.* A probiotic preparation hydrolyzes gliadin and protects intestinal cells from the toxicity of pro-inflammatory peptides. **Nutrients**, MDPI AG, v. 12, n. 2, p. 495, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12020495>.

HART, A. L. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. **Gut**, BMJ, v. 53, n. 11, p. 1602–1609, nov. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gut.2003.037325>.

HAUSCH, F. *et al.* Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, American Physiological Society, v. 283, n. 4, p. G996–G1003, out. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00136.2002>.

HERRERA, M. G. *et al.* Large supramolecular structures of 33-mer gliadin peptide activate toll-like receptors in macrophages. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, Elsevier BV, v. 14, n. 4, p. 1417–1427, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.04.014>.

HOFFMAN, R. A. Intraepithelial lymphocytes coinduce nitric oxide synthase in intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, American Physiological Society, v. 278, n. 6, p. G886–G894, jun. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.6.g886>.

HUSBY, S. *et al.* European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 54, n. 1, p. 136–160, jan. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/mpg.0b013e31821a23d0>.

IEZZI, A. *et al.* COX-2: Friend or foe? **Current Pharmaceutical Design**, Bentham Science Publishers Ltd., v. 13, n. 16, p. 1715–1721, jun. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161207780831293>.

IKENOUCI, J. *et al.* Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. **Journal of Cell Biology**, Rockefeller University Press, v. 171, n. 6, p. 939–945, dez. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.200510043>.

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annual Review of Immunology**, Annual Reviews, v. 27, n. 1, p. 313–338, abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132657>.

JELÍNKOVÁ, L. *et al.* Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- through a mechanism involving NF- κ B. **FEBS Letters**, Wiley, v. 571, n. 1-3, p. 81–85, jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.057>.

KAMER, J. H. V. D.; WEIJERS, H. A. Coeliac disease. v some experiments on the cause of the harmful effect of wheat gliadin (preliminary communication). **Acta Paediatrica**, Wiley, v. 44, n. 5, p. 465–469, set. 1955. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1955.tb04269.x>.

KONING, F.; GILISSEN, L.; WIJMENGA, C. Gluten: a two-edged sword. immunopathogenesis of celiac disease. **Springer Seminars in Immunopathology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 27, n. 2, p. 217–232, jun. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-005-0203-9>.

LAMMERS, K. M. *et al.* Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. **Gastroenterology**, Elsevier BV, v. 135, n. 1, p. 194–204.e3, jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.023>.

LAPARRA, J.; SANZ, Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. **Journal of Cellular Biochemistry**, Wiley, p. n/a–n/a, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.22459>.

LAPARRA, J. M. *et al.* Bifidobacterium longum CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. **PLoS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 7, n. 2, p. e30744, fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030744>.

LEFFLER, D. A. *et al.* Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, Elsevier BV, v. 5, n. 4, p. 445–450, abr. 2007.

LEVY, M. *et al.* Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 17, n. 4, p. 219–232, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>.

LINDFORS, K. *et al.* Live probiotic Bifidobacterium lactis bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 552–558, 04 2008. ISSN 0009-9104. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03635.x>.

LUNDIN, K. E.; SOLLID, L. M. Advances in coeliac disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 30, n. 2, p. 154–162, mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/mog.0000000000000041>.

MA, T. Y. *et al.* TNF--induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, American Physiological Society, v. 286, n. 3, p. G367–G376, mar. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00173.2003>.

MACATONIA, S. E. *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of th1 cells from naive CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 154, n. 10, p. 5071–5079, maio 1995.

MAIURI, M. C. *et al.* Nuclear factor κ B is activated in small intestinal mucosa of celiac patients. **Journal of Molecular Medicine**, Springer Science and Business Media LLC, v. 81, n. 6, p. 373–379, maio 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0440-0>.

MEDINA, M. *et al.* Bifidobacterium strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of celiac patients. **Journal of Inflammation**, Springer Science and Business Media LLC, v. 5, n. 1, nov. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476-9255-5-19>.

SOUSA MORAES, L. F. de *et al.* Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. **Clinical Microbiology Reviews**, American Society for Microbiology, v. 27, n. 3, p. 482–489, jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.00106-13>.

NILSEN, E. M. *et al.* Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. **Gastroenterology**, Elsevier BV, v. 115, n. 3, p. 551–563, set. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70134-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70134-9).

NOROUZBEIGI, S. *et al.* Celiac therapy by administration of probiotics in food products: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 58–66, 2020. ISSN 2214-7993. Food Microbiology • Functional Foods and Nutrition. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799320300059>.

OTANI, T.; FURUSE, M. Tight junction structure and function revisited. **Trends in Cell Biology**, Elsevier BV, v. 30, n. 10, p. 805–817, out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>.

PALMA, G. D. *et al.* Pivotal advance: Bifidobacteria and gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. **Journal of Leukocyte Biology**, Wiley, v. 87, n. 5, p. 765–778, dez. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.0709471>.

PINTO-SÁNCHEZ, M. I. *et al.* Bifidobacterium infantis NLS super strain reduces the expression of -defensin-5, a marker of innate immunity, in the mucosa of active celiac disease patients. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 51, n. 9, p. 814–817, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/mcg.0000000000000687>.

PISCAGLIA, A. C. Intestinal stem cells and celiac disease. **World Journal of Stem Cells**, Baishideng Publishing Group Inc., v. 6, n. 2, p. 213, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.213>.

POPINEAU, Y. *et al.* Influence of high mr glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of glutes and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat sicco. **Journal of Cereal Science**, v. 19, p. 231–241, 1994.

RAKHIMOVA, M. *et al.* In vitro differentiation of human monocytes into dendritic cells by peptic–tryptic digest of gliadin is independent of genetic predisposition and the presence of celiac disease. **Journal of Clinical Immunology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 29, n. 1, p. 29–37, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9228-x>.

RAWSON, H.; EVANS, L. The pattern of grain growth within the ear of wheat. **Australian Journal of Biological Sciences**, CSIRO Publishing, v. 23, n. 4, p. 753, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/bi9700753>.

RIBEIRO, M. *et al.* Next-generation therapies for celiac disease: The gluten-targeted approaches. **Trends in Food Science & Technology**, Elsevier BV, v. 75, p. 56–71, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.021>.

RIZZELLO, C. G. *et al.* Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: New perspectives for celiac disease. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 73, n. 14, p. 4499–4507, jul. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.00260-07>.

ROMA, E. *et al.* Dietary compliance and life style of children with coeliac disease. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, Wiley, v. 23, n. 2, p. 176–182, abr. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-277x.2009.01036.x>.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. **Chemical Reviews**, American Chemical Society (ACS), v. 103, n. 6, p. 2239–2304, maio 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr000068x>.

SABATINO, A. D. *et al.* Distribution, proliferation, and function of paneth cells in uncomplicated and complicated adult celiac disease. **American Journal of Clinical Pathology**, Oxford University Press (OUP), v. 130, n. 1, p. 34–42, jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1309/5adnar4vn11ttkq6>.

SCHUPPAN, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. **Gastroenterology**, Elsevier BV, v. 119, n. 1, p. 234–242, jul. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/gast.2000.8521>.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac disease: From pathogenesis to novel therapies. **Gastroenterology**, Elsevier BV, v. 137, n. 6, p. 1912–1933, dez. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.008>.

SHAN, L. *et al.* Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochemical Journal**, Portland Press Ltd., v. 383, n. 2, p. 311–318, out. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj20040907>.

SHAN, L. *et al.* Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. **Journal of Proteome Research**, American Chemical Society (ACS), v. 4, n. 5, p. 1732–1741, ago. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr050173t>.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford University Press (OUP), v. 53, n. 370, p. 947–958, abr. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>.

SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. **Biochemical Journal**, Portland Press Ltd., v. 267, n. 1, p. 1–12, abr. 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj2670001>.

SMECUOL, E. *et al.* Effect of bifidobacterium infantis NLS super strain in symptomatic coeliac disease patients on long-term gluten-free diet - an exploratory study. **Benef. Microbes**, Wageningen Academic Publishers, v. 11, n. 6, p. 527–534, out. 2020.

SMECUOL, E. *et al.* Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of bifidobacterium infantis natrene life start strain super strain in active celiac disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 47, n. 2, p. 139–147, fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e31827759ac>.

SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Novel therapies for coeliac disease. **Journal of Internal Medicine**, Wiley, v. 269, n. 6, p. 604–613, maio 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02376.x>.

SOMMER, F. *et al.* The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 15, n. 10, p. 630–638, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58>.

SPURKLAND, A. *et al.* Susceptibility to develop celiac disease is primarily associated with HLA-DQ alleles. **Human Immunology**, Elsevier BV, v. 29, n. 3, p. 157–165, nov. 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(90\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0198-8859(90)90111-2).

ŠTEPÁNKOVÁ, R. *et al.* Experimentally induced gluten enteropathy and protective effect of epidermal growth factor in artificially fed neonatal rats. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 36, n. 1, 2003. ISSN 0277-2116. Disponível em: https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2003/01000/Experimentally_Induced_Gluten_Enteropathy_and.18.aspx.

STEPNIAK, D. *et al.* Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, American Physiological Society, v. 291, n. 4, p. G621–G629, out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00034.2006>.

STURGEON, C.; FASANO, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissue Barriers**, Informa UK Limited, v. 4, n. 4, p. e1251384, out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1251384>.

TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. The s-poor prolamins of wheat, barley and rye. **Journal of Cereal Science**, Elsevier BV, v. 22, n. 1, p. 1–16, jul. 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0733-5210\(05\)80002-5](https://doi.org/10.1016/s0733-5210(05)80002-5).

TYE-DIN, J. A.; GALIPEAU, H. J.; AGARDH, D. Celiac disease: A review of current concepts in pathogenesis, prevention, and novel therapies. **Frontiers in Pediatrics**, Frontiers Media SA, v. 6, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00350>.

TYE-DIN, J. A. *et al.* Comprehensive, quantitative mapping of t cell epitopes in gluten in celiac disease. **Science Translational Medicine**, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 2, n. 41, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001012>.

VANDERPOOL, C.; YAN, F.; POLK, B. D. Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, Oxford University Press (OUP), v. 14, n. 11, p. 1585–1596, nov. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ibd.20525>.

WANG, W. *et al.* Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. **Journal of Cell Science**, The Company of Biologists, v. 113, n. 24, p. 4435–4440, dez. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4435>.

WEI, G. *et al.* Gluten degrading enzymes for treatment of celiac disease. **Nutrients**, MDPI AG, v. 12, n. 7, p. 2095, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12072095>.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, Elsevier BV, v. 24, n. 2, p. 115–119, abr. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>.

WOLDEMARIAM, K. Y. *et al.* Celiac disease and immunogenic wheat gluten peptides and the association of gliadin peptides with HLA DQ2 and HLA DQ8. **Food**

Reviews International, Informa UK Limited, p. 1–24, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1907755>.

YOUNG, S. L. *et al.* Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. **Clinical and Vaccine Immunology**, American Society for Microbiology, v. 11, n. 4, p. 686–690, jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cdli.11.4.686-690.2004>.

ZHOU, L. *et al.* Blocking celiac antigenicity of the glutamine-rich gliadin 33-mer peptide by microbial transglutaminase. **RSC Advances**, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 7, n. 24, p. 14438–14447, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6ra27893k>.

ZIHNI, C. *et al.* Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 17, n. 9, p. 564–580, jun. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>.