



Samara Rabelo Medeiros

Vitamina A e a homeostase da mucosa intestinal

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte**

2011

Samara Rabelo Medeiros



Vitamina A e a homeostase da mucosa intestinal

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

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Colaboradora: Denise Carmona Cara

Belo Horizonte

2011

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

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“No! Try not! Do or do not! There is no try!”

Mestre Yoda (George Lucas)

Dedico esse trabalho às pessoas que estão mais presentes na minha vida, me apoiando, me acompanhando e me ensinando. Ao meu pai, Vicente, à minha mãe Carmen e ao Felipe.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por todas as oportunidades e por sempre ter me dado força para seguir em frente, com tranquilidade, sobretudo quando as coisas davam errado, ou quando o cansaço chegava.

Faço um agradecimento especial aos meus pais, Carmen e Vicente, por terem permitido que eu chegasse aqui, com todo os ensinamentos todo o apoio! E ao Felipe, por ser essa pessoa tão especial, com a paciência enorme e o coração maior ainda. Agradeço aos três pela convivência e companhia diária, principalmente nos momentos de tensão, que durante essa caminhada, principalmente na etapa final, foram vários, quando falta paciência. Sem vocês para acalmar os ânimos, dar o ombro na hora do cansaço, as palavras positivas, otimistas, nas horas de preocupação, o carinho em todas as horas e todo o amor, eu não teria chegado nem na metade de onde eu cheguei. E aqui, mais uma vez agradeço a Deus por ter colocado vocês em minha vida!

Agradeço à professora Ana Maria pela oportunidade de desenvolver esse projeto no Laboratório de Imunobiologia, por me ajudar a crescer e entender, dentro do possível, o meio científico. Por todas as lições, os ensinamentos, a boa vontade de discutir e pelos puxões de orelha, que também são muito importantes para sabermos onde erramos e não repetir os erros.

À Flávia, não só por ter me ajudado imensamente nesse trabalho (acho que ela não tem nem idéia do tanto que me ajudou), mas também por já ser uma ótima amiga! Por me ajudar a descontrair quando eu estava sobrecarregada e por todas as conversas e brincadeiras! Isso nem falar das ELISAs!!

A todo o pessoal do laboratório, pela ótima convivência! Á Andréa, por todos os experimentos gigantes ou não e pelas conversas, sérias ou não! À Andrezza pela grande ajuda nos dias dos experimentos enormes, pela ajuda com os protocolos e com boa vontade em ajudar sempre. Ao Rafael Rezende, pelas piadinhas e pelo alto astral sempre! Ao Rafael Pires, que sempre que a gente precisa está disposto a

ajudar. À Rapha pelas ajudas sempre que o tempo aperta. Ao Archimedes, Ana Cris, Bernardo e Thais pelas discussões sobre gráficos, protocolos, artigos e afins. Ao Mauro e à Débora por todas as vezes que eu precisei e sempre estavam prontos para ajudar. À Luisa, que ficou só um pouquinho, mas se tornou uma amiga! E à Frank, pela alegria e amizade!

Ao Jamil por ter ajudado (e ainda estar ajudando) no temido HPLC!

Agradeço aos meus amigos da faculdade por me aturarem por todo esse tempo (e pela oportunidade que eu tive de aturá-los), principalmente a Carol, Dani (e agora o Rafa), Lélis, Cris, Gabi, Elizão, e todos os outros! Aos amigos de Bases!! Nem preciso falar né? Se não fossem alguns deles, esse projeto não teria saído!

Principalmente ao Matheus (por ter quase me aceitado no lab dele, de tanto que eu precisei ir lá!!), ao Poma, Ana Paula e Elisa, que nos agüentamos desde a graduação!

À Jane que se tornou uma amiga muito especial e ajudou muito (!!) na parte de biomol. Ao Waldionê, que não foi colega de Bases, mas é quase como se tivesse sido! E aos outros todos, companheiros desde as saídas até os estudos!

Aos meus amigos de fora da faculdade, principalmente à Carol Sulay e à Mariana, por todas as conversas, momentos compartilhados, mesmo que agora bem reduzidos.

Agradeço aos meus avós, José, Araci e Conceição, pelas primeiras oportunidades, todos os valores passados e por iniciarem essa família que é tão importante para mim. A todos os meus tios por serem tão carinhosos e tão presentes. Por sempre terem torcido e ainda torcerem por mim. Aos meus primos-irmãos, Pedro e João, por me darem a chance de saber como é a convivência entre irmãos e aprender que para ser irmão não precisa morar na mesma casa. E ao Lucas, meu primo-afilhado, que só por existir já me faz feliz!

A todos vocês cuja presença foi e é tão importante para a minha formação pessoal e acadêmica.

MUITO OBRIGADA!!! =)

Sumário

Lista de Tabelas	11
Lista de Figuras	12
Lista de Abreviaturas.....	14
1. Resumo e Abstract.....	16
2. Introdução	19
2.1. As mucosas e o tecido linfóide associado a elas.....	20
2.2. As mucosas e o tecido linfóide associado a elas.....	28
2.3. A perda da homeostase e as doenças inflamatórias intestinais.....	36
2.3.1. A colite induzida por administração oral de DSS	44
2.3.2. Tratamentos em uso para as IBD	45
3. Objetivos.....	47
3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
4. Material e Métodos.....	49
4.1. Animais	50
4.2. Modificação da Dieta AIN-93	50
4.3. Delineamento experimental	56
4.4. Obtenção do soro	58
4.5. Remoção do intestino e cólon	58
4.6. Remoção de fígado	58
4.7. Coleta do conteúdo fecal.....	59
4.8. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida de imunoglobulinas do soro	59
4.9. ELISA para detecção de IgA secretória nas fezes	60
4.10. Análises bioquímicas	60
4.10.1. Determinação das concentrações de triglicérides séricos	60

4.10.2. Determinação das concentrações de colesterol total sérico	61
4.10.3. Determinação das concentrações de HDL	61
4.10.4. Determinação Gama-GT	62
4.10.5. Determinação dos níveis de Glicose	62
4.11. Análise histológica do cólon	63
4.12. Análise histológica das amostras de fígado	63
4.13. Inclusão e Coloração das lâminas	63
4.14. Preparação das Células para cultura e Citometria de fluxo	64
4.14.1. Meio de cultura	64
4.14.2. Suspensão celular do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer.....	64
4.14.3. Contagem de células	65
4.14.4. Linfócitos da lâmina própria	65
4.14.5. Cultura de células e coleta do sobrenadante da cultura.....	66
4.15. Preparação das células e Aquisição no citômetro de fluxo	66
4.16. ELISA para medida da concentração de citocinas.....	70
4.17. Quantificação das concentrações de lipídes hepáticos pelo método FOLCH.....	70
4.18. Medida de colesterol e triglicérides hepáticos	71
4.19. Análise Estatística dos Dados	71
4.20. Soluções Utilizadas	71
5. Resultados.....	75
5.1. Parte I – Efeitos da vitamina A em animais saudáveis	76
5.1.1. Peso dos animais durante as 8 semanas de dieta.....	76
5.1.2. Parâmetros bioquímicos	78
5.1.3. Análise lipídica do fígado	81
5.1.4. Perfil de células do sistema imune	83
5.1.4.1. Perfil celular do baço	83
5.1.4.2. Perfil celular do linfonodo mesentérico	85

5.1.4.3. Perfil celular da placa de Peyer.....	87
5.1.4.4. Linfócitos T reguladores da lâmina própria.....	89
5.1.5. Imunoglobulinas totais séricas (IgG, IgM, IgA) e imunoglobulina secretória (sIgA).....	90
5.1.6. Análise da produção de IFN- γ por células do baço e linfonodo mesentérico	92
5.2. Parte II – Efeitos da vitamina no desenvolvimento da colite experimental.....	93
5.2.1. Peso dos animais durante as 8 semanas de dieta.....	93
5.2.2. <i>Score</i> macroscópico da colite.....	95
5.2.3. Fotos dos animais para ilustração do estado clínico dos mesmos.....	97
5.2.4. Consumo de DSS e do alimento durante a administração do mesmo.....	100
5.2.5. Análise histológica do cólon.....	102
5.2.6. Parâmetros bioquímicos.....	105
5.2.7. Análise lipídica do fígado.....	107
5.2.8. Histologia do fígado.....	109
5.2.9. Perfil de células do sistema imune.....	111
5.2.9.1. Perfil celular do baço.....	111
5.2.9.2. Perfil celular do linfonodo mesentérico.....	114
5.2.9.3. Perfil celular da placa de Peyer.....	116
5.2.9.4. Células T reguladoras da lâmina própria.....	118
5.2.10. Imunoglobulinas totais séricas (IgG, IgM, IgA) e imunoglobulina secretória (sIgA).....	119
5.2.11. Análise da produção de citocinas pelas células da mucosa intestinal.....	121
6. Discussão.....	127
7. Conclusão.....	140
8. Referências.....	142

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Componentes da dieta AIN-93G.....51

Tabela 2 – Minerais essenciais que compõem a dieta AIN-93G.....52

Tabela 3 – Minerais benéficos, não essenciais, que compõem a dieta AIN-93G.....53

Tabela 4 – Componentes vitamínicos da dieta AIN-93G.....53

Tabela 5 – Componentes da dieta AIN-93G, com as respectivas marcas utilizadas.....54

Lista de Figuras

Figura 1 – O epitélio intestinal e o tecido linfóide associado ao intestino22

Figura 2 – Estrutura do retinol e do β -caroteno28

Figura 3 – Prevalência de deficiência de vitamina A no mundo30

Figura 4 – Diferenciação de células Treg no intestino mediada por ácido retinóico34

Figura 5 – Interação dos fatores envolvidos na ocorrência das IBD39

Figura 6 – Ambiente imune intestinal40

Figura 7 – Epitélio intestinal saudável *versus* epitélio intestinal inflamado42

Figura 8 – Análise de linfócitos por citometria de fluxo67

Figura 9 – Peso dos animais saudáveis durante as 8 semanas de dieta77

Figura 10 – Análises séricas de parâmetros metabólicos79

Figura 11 – Análise lipídica e bioquímica do fígado81

Figura 12 – Perfil das células do sistema imune no baço83

Figura 13 – Perfil das células do sistema imune no linfonodo mesentérico85

Figura 14 – Perfil das células do sistema imune nas placas de Peyer87

Figura 15 – Número de células T reguladoras na lâmina própria89

Figura 16 – Produção de Igs totais, séricas, IgG, IgM e IgA e secretória, IgA91

Figura 17 – Produção de IFN- γ pelas células do baço e linfonodo mesentérico92

Figura 18 – Peso semanal dos animais aos quais foi induzida colite e durante os dias de administração do DSS94

Figura 19 – *Score* macroscópico da colite95

Figura 20 – Estado clínico dos animais no 6º dia de indução da colite97

Figura 21 – Consumo médio de DSS e dieta durante 6 dias de indução da colite101

Figura 22 – Análise histológica do cólon103

Figura 23 – Análises séricas de parâmetros metabólicos em animais com colite105

Figura 24 – Análise lipídica e bioquímica do fígado de animais com colite aguda.....107

Figura 25 – Análise histológica do fígado.....109

Figura 26 – Perfil das células do sistema imune no baço de animais com colite.....112

Figura 27 – Perfil das células do sistema imune no linfonodo mesentérico de animais com colite114

Figura 28 – Perfil das células do sistema imune nas placas de Peyer de animais com colite116

Figura 29 – Número de células T reguladoras na lâmina própria de animais com colite118

Figura 30 –Produção de Imunoglobulinas totais, séricas, IgG, IgM e IgA e secretória, IgA em animais com colite.....120

Figura 31 – Produção de TGF- β na mucosa intestinal122

Figura 32 – Produção de IFN- γ na mucosa intestinal.....123

Figura 33 – Produção de IL-10 na mucosa intestinal125

Lista de abreviaturas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
kg	Quilograma
UI	Unidades Internacionais
U	Unidades
°C	Graus Celcius
MALT	Tecido Linfóide Associado à Mucosa
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino
LN	Linfonodo Mesentérico
PP	Placa de Peyer
IFN	Interferon
IL	Interleucina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TGF	Fator de Transformação e Crescimento
Ig	Imunoglobulina
sIg	Imunoglobulina secretória
CD	Grupo de Diferenciação – <i>Cluster of Differentiation</i>
Treg	Linfócitos T Reguladores
Tr1	Células T Reguladoras do tipo 1
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
CTLA-4	Antígeno do Linfócito T Citotóxico-4
GITR	Receptor Induzido por Glicocorticóide relacionado à família de receptores TNF
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
T _H 1	Célula T auxiliar do Tipo 1
T _H 2	Célula T auxiliar do Tipo 2
T _H 17	Célula T auxiliar do Tipo 17

RBP	Proteína Ligadora de Retinol
RAR	Receptor de Ácido Retinóico
RXR	Receptor X de Retinóides
OMS	Organização Mundial de Saúde
AIN	Instituto Americano de Nutrição
AIN-93G	Dieta de Crescimento do Instituto Americano de Nutrição 93
MHCI	Complexo de Histocompatibilidade Principal do tipo I
MHCII	Complexo de Histocompatibilidade Principal do tipo II
NK	Célula Matadora Natural – <i>Natural Killer</i>
NKT	Célula T Matadora Natural – <i>T Natural Killer</i>
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
TNBS	Ácido Trinitrobenzeno Sulfônico
ROR	Receptor Órfão Relacionado ao receptor de ácido retinóico – <i>Retinoic-acid-receptor-related Orphan Receptor</i>
NF	Fator Nuclear
NFAT	Fator Nuclear de Células T Ativadas
IBD	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
IRF	Fator de Regulação do Interferon
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
TLR	Receptor Relacionado ao Toll – <i>Toll-Like Receptor</i>
GFP	Proteína Verde Fluorescente
FITC	Fluoresceína
PE	Ficoeritrina
Cy5	<i>CyChrome-5</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
OPD	Ortofenileno-diamino
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
Gama-GT	γ -glutamilttransferase
ConA	Concanavalina A
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto

1. RESUMO E ABSTRACT

Resumo

A vitamina A e seus análogos têm sido foco de estudos devido ao seu potente efeito na regulação da proliferação celular e diferenciação do epitélio, atividade antioxidante (REIFEN *et al.*, 2002) e capacidade de induzir a diferenciação de células T reguladoras em associação à citocina TGF- β (do inglês, *Transforming Growth Factor β*) (MUCIDA *et al.*, 2007). Assim, nosso objetivo nesse estudo foi avaliar os efeitos da deficiência e suplementação da vitamina A em camundongos saudáveis e a ação desse nutriente na homeostase da mucosa intestinal, utilizando modelo murino de doença inflamatória intestinal, no nosso caso, a colite. Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 4 semanas de idade foram submetidos a quatro tipos de dieta. Dieta deficiente em vitamina A (0 UI), normal - com 4000 UI, segundo a dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993) - e duas dietas suplementadas com quantidades diferentes de vitamina A, a primeira contendo 10000 UI e a segunda 50000 UI do nutriente. Depois de sete semanas de dieta, foi induzida colite pela administração oral de dextran sulfato de sódio (DSS) por 6 dias para cada grupo experimental, além dos grupos saudáveis, aos quais não foi administrado o DSS. O perfil celular do baço, linfonodos mesentéricos (LNM), placas de Peyer e lâmina própria do cólon foi avaliado, além de parâmetros metabólicos. Nos animais saudáveis suplementados com vitamina A, houve um aumento de células B1 e de células T reguladoras (Treg) no baço, além de um aumento nas Treg nos LNM. O grupo deficiente em vitamina A mostrou redução das Treg nas placas de Peyer, além de um aumento na produção de IgG e IFN- γ , quando comparado com os animais controle. Nos grupos com colite, a suplementação com uma ou outra dose de vitamina A levou a um aumento das células T reguladoras no baço, LNM, placas de Peyer e lâmina própria, já a deficiência dessa vitamina causou uma redução de Treg no baço. Os animais com colite, suplementados com vitamina A também apresentaram um aumento de B1 no baço e redução dessa população nos LNM. Foi observado aumento dos níveis de imunoglobulina A (IgA) sérica e IgA secretória no grupo suplementado com maior dose de vitamina, assim como nos animais deficientes. A suplementação com vitamina A não causou nenhum distúrbio metabólico nem nos animais saudáveis nem nos animais com colite. Esse aumento nas células T reguladoras em animais suplementados com vitamina A, assim como o melhor desenvolvimento ponderal e do comportamento durante a indução da colite sugerem uma possível atividade antiinflamatória e moduladora por parte desse composto.

Abstract

Vitamin A and its analogs have been in focus of research because of its powerful regulatory effects on cell proliferation and epithelial differentiation in addition to its antioxidant activity (REIFEN *et al.*, 2002). This compound can also differentiate naïve T cells into regulatory T cells (Tregs), when combined with TGF- β (MUCIDA *et al.*, 2007). Therefore, our aim in this study is to evaluate the effects of dietary deficiency and supplementation of vitamin A in healthy mice and the activity of this nutrient on intestinal mucosa homeostasis by employing murine models of inflammatory bowel disease. Female C57BL/6 mice, at 4 weeks of age, were fed four different diets, either a normal diet (containing 4000 UI of vitamin A), a vitamin A-free diet, or a Vitamin A-supplemented diet (one containing 10000 UI vitamin A and another containing 50000 UI of this vitamin). After 7 weeks of diet consumption, colitis was induced by oral administration of dextran sodium sulfate (DSS) for 6 days. For each diet there was a control that was not treated with DSS. Cellular profiles of spleen, mesenteric lymph nodes (MLN), Peyer's patches (PP) and lamina propria were evaluated, as well as metabolic parameters. In healthy animals that were fed supplemented diets there was an increase in B1 lymphocytes and Tregs in the spleen in addition to an increase in number of Tregs in MLN. Vitamin A-deficient animals showed a reduction in Peyer's patches Tregs and an increase in serum IgG and interferon- γ production when compared with control mice. In mice with colitis, supplementation with vitamin A led to an increase of Tregs in spleen, MLN, PP and lamina propria, whereas vitamin A deficiency caused a decrease of Tregs in spleen. Mice that were supplemented with the higher dose of vitamin A also showed an increase in spleen B1 cells, but this population was reduced in MLN. We observed a higher production of serum immunoglobulin A (IgA) and secretory IgA in mice supplemented with high dose of vitamin A and in vitamin A-deficient mice. Vitamin A supplementation did not cause metabolic disorders in healthy mice nor in mice with colitis. This increase in Tregs supplemented mice as well as their better performance in weight gain and activity during DSS administration suggested an *in vivo* anti-inflammatory and modulatory role for this compound.

2. INTRODUÇÃO

2.1. As mucosas e o tecido linfóide associado a elas

As mucosas são a maior superfície de contato do corpo com o meio ambiente. Associadas a elas, existe um tecido linfóide também muito extenso conhecido como tecido linfóide associado à mucosa ou MALT (do inglês *Mucosa-associated lymphoid tissue*) (TURNER, 2009).

A maior parte do contato de material antigênico com o organismo acontece na mucosa intestinal, cuja área total é 100 vezes maior que a da pele (BRANDTZAEG, 2009). Essa extensa superfície está constantemente exposta a uma grande variedade de antígenos representada pela microbiota ali presente e pelas proteínas da dieta. Ambas as fontes antigênicas exercem um papel crítico no desenvolvimento e maturação do sistema imune do animal adulto (MENEZES *et al.*, 2003).

A mucosa intestinal abriga o maior tecido linfóide do organismo sendo que 70% dos linfócitos aí presentes estão ativados. Esse tecido linfóide é conhecido como GALT (do inglês *Gut-associated lymphoid tissue*). Uma grande quantidade desses linfócitos está localizada nas placas de Peyer (PP) e na lâmina própria intestinal (linfócitos da lâmina própria), assim como nos linfonodos mesentéricos (LNM), e muitas dessas células expressam marcadores de ativação e secretam citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-4, IL-13 e TNF- α (MENEZES *et al.*, 2003). O aspecto mais interessante das interações diárias entre os antígenos da microbiota e da dieta e os elementos linfóides da mucosa intestinal é que esse estado de ativação não se traduz em um quadro de inflamação patológica. Ao contrário, esses contatos com antígenos no intestino induzem dois tipos de atividades imunológicas não inflamatórias: a produção de IgA secretória e a indução de tolerância oral (FARIA; WEINER, 1999).

IgA secretória

O epitélio das mucosas é recoberto por anticorpos que podem ser encontrados em fluidos corporais como lágrimas, suco intestinal e leite. A noção da existência de um tipo de imunidade presente nas mucosas foi descrito por Besredka, em 1919 e reforçada por Davies, em 1922. Apesar disso, só em aproximadamente 1960, a imunoglobulina presente no leite foi identificada, por Gugler e von Mural, como sendo IgA. Essa mesma imunoglobulina tinha sido descoberta no soro, no ano de 1953-54, pelos pesquisadores Grabar e Williams. Depois da primeira identificação da IgA no leite,

Tomasi e colaboradores, em 1963, mostraram que esse mesmo anticorpo era encontrado em predominância na saliva e em outros fluidos corporais. A partir de um estudo feito em 1961, na Suíça, por Hanson e colaboradores, foi noticiado que essa IgA secretada nos fluidos corporais (denominada então IgA secretória, ou sIgA) possuía um epitopo antigênico adicional que não estava presente na IgA do soro, denominado componente secretório, responsável pelo transporte da imunoglobulina nas secreções, além de ser dimérica, com dois monômeros de IgA ligados. Uma quantidade grande dessa IgA dimérica é translocada para o lúmen intestinal diariamente e o papel dessa IgA secretada é extremamente importante contra infecções, já de que a maior parte dos patógenos é encontrada nas membranas mucosas, e têm essa como sua via de entrada no organismo (Fig.1). A sIgA compreende então a primeira linha de defesa da mucosa, limitando o acesso de bactérias e a penetração das mesmas no epitélio intestinal, além de limitar a translocação desses microrganismos do lúmen para os linfonodos mesentéricos. No intestino, indução e regulação da imunidade da mucosa ocorrem inicialmente nas placas de Peyer, em conjunto com outras partes do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), como folículos linfóides e os linfonodos mesentéricos (BRANDTZAEG, 2009); (WOOF; KERR, 2006); (SUZUKI; FAGARASAN, 2008).

O mecanismo de indução e produção da IgA secretória ocorre, em parte, a partir da estimulação por antígenos que entram na mucosa pelas células M (do inglês, *Microfold*) das placas de Peyer, que são um tipo celular de extrema importância para a barreira intestinal. São células epiteliais especializadas e têm como função encaminhar antígenos do lúmen intestinal diretamente para linfócitos intraepiteliais e para tecidos linfóides subepiteliais (TURNER, 2009); (CORR; GAHAN; HILL, 2008). Os linfócitos B2 provenientes da medula óssea e presentes nesses folículos linfóides da mucosa são ativados e fazem a troca de isotipo dentro dos centros germinativos com o auxílio de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas tais como TGF- β , IL-5 e IL-10 (TSUJI *et al.*, 2008). Essas células são os chamados linfócitos B convencionais e são continuamente gerados na medula óssea de adultos. O outro subtipo de linfócitos B é o B1, que é produzido preferencialmente na ontogenia, mas tem capacidade de auto-reposição nos adultos. Os linfócitos B1 estão em baixa porcentagem no baço e são raramente encontrados nos linfonodos mesentéricos, apesar de serem amplamente encontrados na cavidade peritoneal de adultos (TORNERG; HOLMBERG, 1995). Recentemente, Fagarasan e colaboradores, mostraram que os linfócitos B1 presentes na lâmina própria

são responsáveis pela metade da IgA produzida na mucosa intestinal (FAGARASAN; WATANABE; HONJO, 2000).

Outras imunoglobulinas também estão presentes nas mucosas e fluidos, embora a quantidade de cada uma varie de um local para outro. Os níveis de IgG, por exemplo, na urina, bile hepática e fluido bronquioalveolar são mais altos que da IgA, que está mais presente nos fluidos intestinal e nasal, leite e colostro. A IgM também está presente nessas secreções, embora em níveis mais baixos que a IgA. As concentrações de IgD e IgE são baixas nas mucosas e sua importância funcional ainda não está clara (WOOF; MESTECKY, 2005).

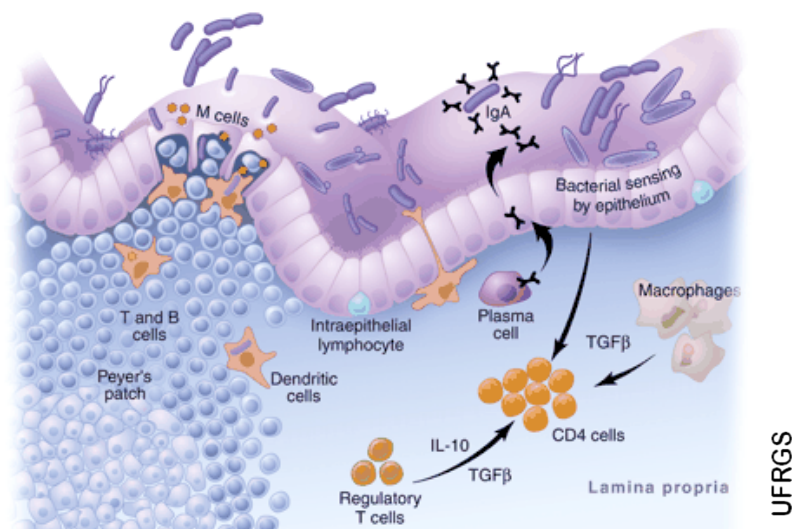


Figura 1 – Epitélio intestinal e tecido linfóide associado ao intestino. Ação das imunoglobulinas (na imagem, IgA secretória) no lúmen intestinal. As células M mantêm um contínuo encaminhamento de antígenos do lúmen para o tecido linfóide, o que faz dessas células um importante iniciador de respostas imunes (Corr et al., 2007). Abaixo das células M, geralmente fica a região linfóide conhecida como placa de Peyer, dessa forma, os antígenos interiorizados por essas células entram diretamente em um folículo linfóide. As células dendríticas da lâmina própria também têm um importante papel, pois seus dendritos são capazes de capturar antígenos no lúmen intestinal e processá-los para apresentação. Na lâmina própria também encontramos macrófagos, plasmócitos e linfócitos, incluindo linfócitos T reguladores, que são os principais mantenedores da homeostase na mucosa intestinal (http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/molecular_immunology/gastrointestinal.html).

A Tolerância oral

Classicamente, a tolerância oral é definida como o estado de supressão da reatividade inflamatória a um antígeno que tenha sido apresentado pela via oral (FARIA; WEINER, 1999). Isto significa que o sistema imune dos vertebrados é tolerante aos antígenos que ingere e, portanto, trata os componentes da dieta e da microbiota como auto-componentes. Esse fenômeno natural já foi utilizado como maneira de induzir tolerância a vários antígenos de importância patológica tais como auto-componentes alvo em doenças autoimunes, alérgenos e antígenos presentes em transplantes. Estudos em modelos experimentais mostraram resultados muito promissores nesses testes e vários estudos clínicos estão hoje em andamento avaliando a eficácia da indução de tolerância oral a auto-antígenos (FARIA; WEINER, 2006).

Os mecanismos responsáveis pela indução de tolerância oral podem ser a deleção de clones específicos para o antígeno ou a indução de linfócitos T reguladores da reatividade inflamatória descritos como células T reguladoras (Tregs) (FARIA; WEINER, 2005).

Inicialmente descritas como linfócitos T CD4⁺ gerados durante a seleção tímica e importantes para a manutenção da tolerância imunológica aos antígenos próprios (SAKAGUCHI, 2005), as células T reguladoras foram posteriormente descritas também como críticas para a regulação da reatividade inflamatória a antígenos externos e para a manutenção da homeostase intestinal. As células T CD4⁺ reguladoras tímicas expressam CD25 e constituem aproximadamente 10% das células T CD4⁺ periféricas de um indivíduo normal. A identificação do fator de transcrição FoxP3 (do inglês, *Forkhead Box p3*), expresso exclusivamente pelas células Treg, foi de grande auxílio para caracterização dessas células e é crucial para que exerçam sua função (SAKAGUCHI; POWRIE, 2007). Outros receptores de superfície têm sido descritos nas Treg, tais como a molécula co-estimuladora CTLA-4 (do inglês, *Citotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) e o receptor de glicocorticóides GITR (do inglês, *Glucocorticoid-Induced Tumour necrosis factor receptor family-Related*), ambos envolvidos na regulação negativa da ativação dessas células (SAKAGUCHI, 2005); (BAUMGARTNER-NIELSEN *et al.*, 2006).

Outra população de células reguladoras foi descrita e apresenta a molécula de superfície LAP (do inglês, *latency-associated peptide*). O TGF- β é sintetizado como uma pró-forma do TGF- β ativo e processado intracelularmente para a forma latente da

citocina que consiste de dímeros associados não covalentemente e que ficam ligados à membrana da célula (TGF- β latente). O LAP consiste de um complexo da porção N-terminal do pró-TGF- β e o TGF- β maduro (que é a porção C-terminal da pró-citocina). Esse complexo não pode se ligar nos receptores de TGF- β . Aparentemente a forma de ação dessa população de células reguladoras é por contato célula-célula.

Os mecanismos envolvidos na ação das Treg podem envolver desde a inibição da proliferação e ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e de células T efetoras, até a supressão via liberação de citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF- β (SAKAGUCHI; POWRIE, 2007). Nesse aspecto, uma diferença marcante entre as células Treg selecionadas no timo por auto-componentes e aquelas induzidas na periferia por antígenos externos é exatamente seu mecanismo de ação. As células Treg tímicas, também chamadas de naturais, agem por contato celular enquanto que as células Treg induzidas na periferia, a partir de células T CD4⁺ virgens, as células Treg induzidas, agem via secreção de citocinas (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009).

Em geral, células T virgens podem ser induzidas a expressar o fator de transcrição FoxP3 na periferia adquirindo assim função reguladora. Esse evento é particularmente freqüente e importante na mucosa intestinal onde o contato com antígenos da dieta e da microbiota leva à indução dessas células Treg (SAKAGUCHI; POWRIE, 2007). Vários pesquisadores têm mostrado a ação de células Treg na modulação da inflamação da mucosa intestinal em modelos experimentais de colite (STROBER; FUSS; MANNON, 2007); (BODEN; SNAPPER, 2008); (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009) e recentemente Lafaille e colaboradores demonstraram que a ausência de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ induzidas impede a indução de tolerância oral, utilizando um modelo animal no qual foi possível distinguir a ação das células Treg adaptativas e das naturais (CUROTTO DE LAFAILLE *et al.*, 2008).

Uma característica importante do tecido linfóide associado à mucosa intestinal é a habilidade de proteger o organismo contra infecções bacterianas ao mesmo tempo em que evita o desenvolvimento de respostas inflamatórias destrutivas contra a microbiota normal.

Estima-se que trilhões de bactérias de mais de mil espécies são abrigadas no trato gastrointestinal de mamíferos durante toda a vida do indivíduo. Por isso, é natural que tais organismos afetem o perfil imune do hospedeiro (MAZMANIAN, 2009).

Sinais de microrganismos e o ambiente imune que eles criam durante uma infecção, modulam as funções periféricas das células T. Por outro lado, o balanço entre as células T pró-inflamatórias e as Treg antiinflamatórias, afeta o início ou a progressão de doenças imunes não infecciosas (MAZMANIAN, 2009).

O papel da microbiota e da dieta no sistema imune

Como o número de células bacterianas em um organismo humano ultrapassa o número de células do próprio organismo, é necessário entender o papel da microbiota. Esse papel no sistema imune tem sido estudado utilizando-se animais experimentais isentos de germes (*germ-free*). Já foi reportado que tais animais apresentam um subdesenvolvimento do sistema imune, apresentando folículos linfóides isolados imaturos (HAMADA *et al.*, 2002) e placas de Peyer em menor tamanho e sem centros germinativos. A lâmina própria desses animais apresenta frequência reduzida de plasmócitos secretores de IgA e de células T CD4⁺ e o número de linfócitos intraepiteliais (IEL, do inglês, *intraepithelial lymphocytes*) também está reduzido (MACPHERSON; HARRIS, 2004). Esses estudos evidenciam que a microbiota afeta diretamente o GALT, mas o GALT também tem um papel importante no modelamento do repertório que compõe a microbiota (KELLY; KING; AMINOV, 2007). Esse papel dos microrganismos no desenvolvimento no sistema imune é crucial no período pós-natal, estimulando, local e sistemicamente, esse sistema. A microbiota também possui um papel protetor importante, pois interage diretamente com bactérias patogênicas, inibindo sua proliferação, e influenciando o sistema imune a reagir contra esses microrganismos (TLASKALOVA-HOGENOVA *et al.*, 2004).

Como já foi mencionado, não só a microbiota presente no intestino, mas também a dieta têm efeitos na modulação do sistema imune. A composição dos microrganismos presentes é influenciada por fatores endógenos e externos, como por exemplo, a dieta, ingestão de antibióticos, entre outros, mas dentre todos, a dieta é considerada o principal direcionador de mudanças na diversidade bacteriana, devido à sua ação constante. Em contrapartida, a microbiota pode modificar os componentes bioativos da dieta e a exposição do hospedeiro a eles, modificando os efeitos na saúde (LAPARRA; SANZ, 2010). Além de afetar a composição dos microrganismos no intestino, a própria absorção realizada por esse órgão é afetada de acordo com o tipo de alimentação, pois

os carreadores para os produtos da digestão, tanto na borda ciliada quanto nas membranas basolaterais do epitélio, são alterados (HIRST, 1993).

Quando um antígeno protéico é ingerido, o mesmo é clivado por enzimas digestivas no estômago e intestino delgado, porém, alguns desses antígenos, escapam dessa digestão ou são parcialmente degradados e podem ser absorvidos intactos (WAKABAYASHI *et al.*, 2006).

Esses elementos da dieta exercem uma influência direta no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune. A estimulação antigênica, fornecida por essas proteínas da dieta que não foram completamente degradadas, claramente participa da maturação do sistema imune a partir do desmame. Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram que a influência das interações com a dieta é tão importante quanto as interações da microbiota, na formação do GALT e na maturação do sistema imune. Em tal trabalho, animais foram alimentados exclusivamente com uma dieta experimental balanceada, mas livre de proteínas (à base de aminoácidos livres, para os animais não sofrerem de desnutrição), na tentativa de diminuir ao máximo o contato antigênico protéico via dieta. Essa dieta foi administrada desde o desmame, até o animal adulto e foram observadas diferenças em diversos aspectos, como redução nos níveis de sIgA presente no muco intestinal e nos níveis séricos de IgG e IgA, assim como uma diminuição na frequência de linfócitos T e B em vários sítios linfóides e um padrão de citocinas típico de neonatos (produção de altos níveis de IL-4, IL-10 e baixos níveis de IFN- γ) (MENEZES *et al.*, 2003). Essa deficiência imune não era irreversível e a introdução de uma dieta contendo 10% de proteínas por três dias restaurou a produção de imunoglobulinas desses animais alimentados com a dieta de aminoácidos (AMARAL *et al.*, 2006).

Outros componentes da dieta têm sido descritos como importantes na atividade do sistema imune. Micronutrientes, como zinco e selênio, são exemplos desses componentes. Algumas vitaminas também são essenciais para o funcionamento do sistema imune. Como muito bem colocado por Albert Szent-Gyorgyi, prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina, em 1937, “A vitamina é uma substância que te deixa doente se você não consumi-la” (*Vitamin is a substance that makes you ill if you don't eat it*). Essas substâncias têm um papel no sistema imune, que engloba desde as repostas imunes inatas e vai até as respostas imunes adaptativas. Embora a ação de algumas vitaminas, como a C, além de alguns membros do complexo B, no sistema imune, seja mais inespecífica, agindo como antioxidantes, por exemplo, outras vitaminas, como A e

D e E, influenciam esse sistema de forma mais específica. Recentemente foi descrita uma função da vitamina E na supressão do desenvolvimento de lesões aórticas ateroscleróticas, pela inibição da expressão de moléculas de adesão e inibição na ativação de monócitos e macrófagos (KOGA *et al.*, 2004). Já vitamina D pode ser metabolizada por células do sistema imune, por esse motivo, é fisiologicamente encontrada em altas concentrações em microambientes linfóides, o que acaba aumentando sua ação específica, inibindo a proliferação de células T, pela inibição da expressão de IL-2, IL-6, IL-23 e IFN- γ , e aumentando a expressão de IL-4. Dessa forma, é induzida uma troca no perfil da resposta imune CD4+ de T_H1 para T_H2. A indução de células T_H17 também fica reduzida, pois a presença de IL-6 e IL-23 é essencial para essa diferenciação. Já a vitamina A tem algumas ações opostas às da vitamina D, como indução da expressão de IL-2 e proliferação de células T. A vitamina A também é capaz de mudar o perfil da resposta imune, de T_H1 para T_H2, além de diminuir a diferenciação de T_H17 e aumentar a diferenciação de Tregs. Isso acontece pela influência na produção de citocinas, pois a vitamina bloqueia a produção de citocinas T_H1 e aumenta a produção das citocinas com perfil T_H2 (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008).

2.2. Vitamina A e seus efeitos no organismo

A vitamina A, também conhecida como retinol, é um nutriente essencial, necessário em pequenas quantidades para o funcionamento normal do organismo (Vitaminas, *Vitamina*, aminas da vida, apesar de hoje se saber que nem todas as vitaminas são aminas, o nome se manteve). O retinol (Fig.2A) é indispensável para o bom funcionamento do sistema visual, para o crescimento e desenvolvimento de todo o organismo, manutenção da integridade do epitélio celular, funcionamento normal do sistema imune, reprodução, além de possuir uma importante propriedade antioxidante (REIFEN *et al.*, 2002). Geralmente a vitamina A é consumida na própria forma de retinol ou na forma de pró-vitamina A, os carotenoides (Fig.2B). A unidade de medida adotada para essa vitamina é “Unidades Internacionais” (UI), na qual 1 UI equivale a 0,3 µg de retinol. A vitamina A pré-formada (retinol) é encontrada exclusivamente em derivados de animais como leite humano, carnes glandulares, fígado e óleo de fígado de peixes, gema de ovo e produtos lácteos em geral. Os carotenóides são encontrados em vegetais folhosos verde-escuros, vegetais amarelos e frutas amarelas ou alaranjadas não cítricas. É necessário um maior consumo de carotenóides para obter o mesmo efeito que o retinol - consumo de 1 UI de retinol equivale ao consumo de 3 UI de β-caroteno (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

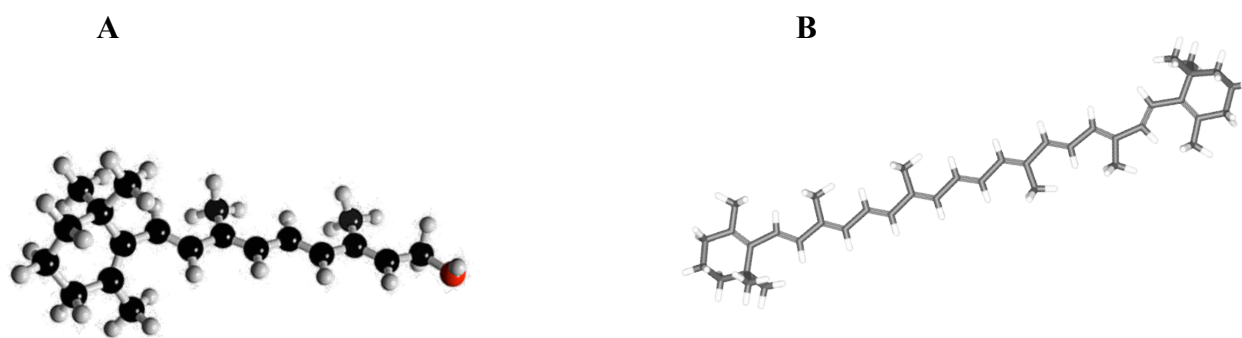


Figura 2 – Estrutura do retinol e do β-caroteno. Na imagem em (A) está representada a estrutura química do retinol (vitamina A) e em (B) está representado o β-caroteno, que é transformado em retinol na parede do intestino delgado (<http://www.molecularium.net/stereo/index.html>).

Para uma boa absorção da vitamina A, não é suficiente o consumo da mesma, pois por ser uma vitamina lipossolúvel, é necessário consumo associado de gordura. Por esse motivo, dietas deficientes em gordura ou doenças que levam à esteatorréia impedem a boa absorção do nutriente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A forma de estocagem dessa vitamina nos alimentos de origem animal é em forma de retinil ésteres em associação a lipídeos associados às membranas celulares e células armazenadoras de gordura. Já os carotenóides ficam associados a lipídeos celulares também, mas embebidos em estruturas celulares complexas como matriz de celulose dos cloroplastos ou na porção pigmentada dos cromoplastos, uma vez que uma de suas funções nas plantas é transferir a energia da luz para a clorofila para a realização da fotossíntese (GOODWIN, 1955). O processo digestivo libera tanto o retinol quanto os carotenóides dos locais de estocagem, mas o processo é mais eficiente quando feito dos tecidos animais que vegetais, por esse motivo, a absorção de retinol é mais eficiente que dos carotenóides. Certa quantidade de carotenóides passa pelos enterócitos e são incorporados diretamente em quilomícrons, porém a maior parte é convertida em retinol nos vilos intestinais por clivagem enzimática (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Os retinil ésteres são hidrolisados e liberados, durante a digestão, como retinol, assim como os carotenóides, que são então incorporados em quilomícrons e absorvidos pela mucosa intestinal, a partir daí são liberados no sistema linfático. A incorporação em micelas é essencial para a passagem eficiente pela membrana rica em lipídeos das células da mucosa intestinal. Esses quilomícrons contendo a maior parte da vitamina A são, então, captados pelo fígado e o retinol que não é utilizado imediatamente é reesterificado e armazenado na forma de retinil éster. O fígado é o órgão com maior quantidade de retinil éster e carotenóides armazenados. Quando esse elemento é necessário, o éster sofre hidrólise e é novamente transformado em retinol, que se liga à proteína ligadora de retinol (RBP, do inglês *Retinol-Binding Protein*). O retinol ligado à proteína cai então na corrente sanguínea e é encaminhado aos tecidos. Dentro das células, o retinol oxidado é transformado em ácido retinóico, que é a forma ativa da vitamina A (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001); (BIESALSKI; NOHR, 2004). O ácido retinóico se liga então nos receptores nucleares de retinóide (RAR, *Retinoic Acid Receptor* e RXR, *Retinoid X Receptor*) (BIESALSKI; NOHR, 2004) para

exercer seus efeitos específicos, principalmente como regulador transcricional (OLSON; MELLO, 2010).

Apesar de ser encontrada em diversos tipos de alimentos, a deficiência em vitamina A é um problema de saúde pública em diversos países, principalmente nos menos desenvolvidos (Fig. 3).

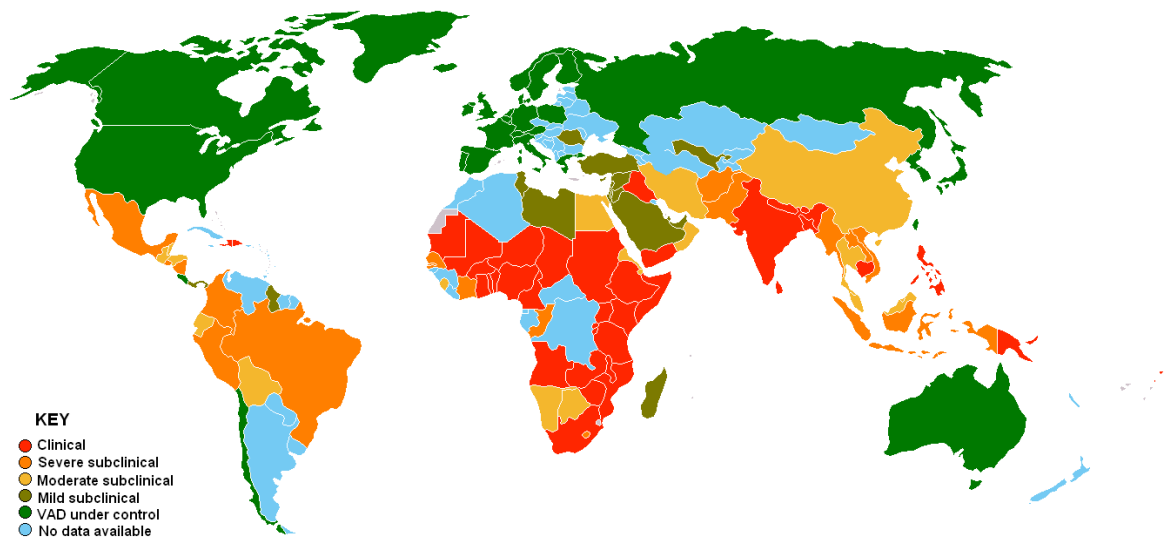


Figura 3 – Prevalência de deficiência de vitamina A no mundo. Mapeamento, feito em 1998 pela OMS, da distribuição global de deficiência de vitamina A e cada país foi categorizado de acordo com o grau de significância da deficiência como um problema público de saúde (World Health Organization, 2001).

O consumo diário mínimo recomendado para tal vitamina é de 5000 unidades internacionais para adultos e 8000 UI para mulheres grávidas ou lactantes (ELEDRISI; MCKINNEY; SHANTI, 2009).

A definição de deficiência de vitamina A pela Organização Mundial de Saúde (Fig. 3) é “concentrações teciduais de vitamina A baixas o suficiente para gerar conseqüências adversas na saúde mesmo que não exista evidência clínica de xeroftalmia” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). O “olho seco” (como também é conhecida a xeroftalmia) é a principal manifestação clínica de deficiência da vitamina A, e é definida como a falta de produção de lágrimas e muco (secretado por células caliciformes na conjuntiva), pelos olhos, levando a uma secura da conjuntiva e córnea, podendo levar a danos permanentes nas mesmas (SMITH; STEINEMANN, 2000). O termo xeroftalmia engloba toda manifestação ocular gerada pela deficiência de

vitamina A e há uma relação entre a severidade da doença e o grau de deficiência desse nutriente (SOMMER, 1998).

Efeitos não específicos dessa deficiência incluem aumento na morbidade e mortalidade infantil, alto risco de anemia, baixa saúde reprodutiva, crescimento e desenvolvimento mais lentos e menores, além de um aumento na susceptibilidade a infecções, devido ao mau desenvolvimento do sistema imune e falhas na integridade epitelial. O risco é maior para crianças abaixo de 6 anos, pois esse período demanda alta quantidade de vitamina A para suportar o rápido crescimento e a transição da amamentação materna para outras fontes alimentares. Se a única, ou maior, fonte de vitamina A são os carotenóides, também pode levar a um quadro de deficiência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Estudos também já mostraram que o ácido retinóico é fundamental, durante a vida fetal, para neurogênese, diferenciação celular, conectividade sináptica e potenciação eletrofisiológica, processos relacionados com a plasticidade neuronal. Também existem evidências de que a vitamina A continua exercendo ações importantes na fisiologia cerebral e aprendizado na vida pós-embriônica e adulta, sendo essencial para um bom armazenamento das coisas aprendidas (memória). A deficiência da vitamina em estágios iniciais da vida pode levar a efeitos irreversíveis no cérebro (OLSON; MELLO, 2010).

Como exposto acima, uma das conseqüências da deficiência de vitamina A é a baixa integridade epitelial. Isso ocorre, pois, acredita-se, que o ácido retinóico tenha um papel indispensável na diferenciação de células epiteliais, que leva ao estabelecimento da integridade do epitélio. Tal propriedade é, então, chave na mucosa intestinal, onde a integridade do epitélio é essencial para a manutenção da homeostase local. Evidências sugerem que a disponibilidade celular do ácido retinóico leva a alterações na expressão de genes associados às junções fortes (genes responsáveis pela tradução das proteínas claudinas e ocludinas, por exemplo, aumentando a permeabilidade intestinal) (OSANAI *et al.*, 2007). Além das alterações nas junções entre as células do epitélio intestinal, podem ocorrer outras alterações no intestino delgado, principalmente no comprimento dos vilos, que fica reduzido, no número de células caliciformes, também reduzido, assim como o número total de enterócitos. A atividade das enzimas produzidas no epitélio também fica reduzida ao longo da borda epitelial ciliada (REIFEN; ZAIGER; UNI, 1998).

A formação do sistema imune tem início durante a fase embrionária. Foi reportado que a vitamina A tem grande influência nesse desenvolvimento do sistema

imune no período pós-natal, pois afeta o número e porcentagem de subpopulações de linfócitos, assim como a concentração de IgG no plasma. O β -caroteno também possui efeitos imunorreguladores, aumentando o número de células CD3+, CD4+ e CD8+ (GARCIA *et al.*, 2003).

Trabalhos posteriores mostraram que, de fato, o ácido retinóico exerce um impacto positivo na diferenciação de células B virgens na mucosa. Também ocorre a conversão dessas células (*switch*) para células produtoras de IgA (VON BOEHMER, 2007); (BRANDTZAEG, 2009).

Os efeitos no sistema imune não se restringem à fase fetal e à infância. Em organismos adultos, o ácido retinóico pode aumentar a citotoxicidade, assim como a proliferação de células T, devido ao aumento na secreção de IL-2. Em contrapartida, a proliferação de células B é inibida pela ação desse ácido (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008).

O ácido retinóico também modula a apresentação de antígenos, principalmente a função das células dendríticas, uma apresentadora de antígenos profissional. Na presença de estímulos inflamatórios como TNF- α , o ácido retinóico aumenta a maturação dessa célula, assim como sua capacidade de apresentação de antígenos (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008). A vitamina A é metabolizada e o ácido produzido pela própria célula dendrítica, que leva a um aumento na expressão de CD1d (molécula similar ao MHC de classe I que apresenta antígenos lipídicos a células NK), assim como aumenta a produção de MMP-9 (do inglês, *Matrix Metalloproteinase-9*), que é essencial para migração das células dendríticas para sítios de inflamação e através das junções fortes do epitélio intestinal (DURIANCIK; LACKEY; HOAG, 2010). Além disso, evidências sugerem que há uma modulação do sistema imune por carotenóides pelo aumento da expressão de MHCII na superfície celular (GARCIA *et al.*, 2003).

O número de leucócitos circulantes fica aumentado, em até 43%, em animais deficientes em vitamina A, a resposta proliferativa de células T pode ficar até quatro vezes mais alta e a produção de IFN- γ pode dobrar. Animais deficientes em vitamina A, quando imunizados com injeção antigênica intracutânea ou injeção histamínica, apresentam uma reação cutânea mais forte e imediata do que animais controle. A deficiência desse nutriente, então, agrava manifestações clínicas de reações inflamatórias, inclusive a inflamação dependente de granulócitos, aumentando o risco de danos teciduais irreversíveis (WIEDERMANN *et al.*, 1996).

A vitamina A influencia o balanço celular T_H1/T_H2 , pois aumenta a expressão do gene da IL-4, que aumenta a geração de células T_H2 , e bloqueia a produção de citocinas T_H1 , como IFN- γ , *in vitro* e *in vivo* (MUCIDA *et al.*, 2007); (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008). A ativação de células T virgens, *in vitro*, na presença de células dendríticas CD103+, TGF- β e IL-6 leva à diferenciação de células T_H17 (Fig. 4). A adição de ácido retinóico a essa cultura, inibe a diferenciação dessas células inflamatórias, mediada pela IL-6 e aumenta a frequência de células T reguladoras, pelo aumento na expressão de FoxP3 e CTLA-4 (MUCIDA *et al.*, 2007). A inibição da diferenciação em T_H17 pode estar relacionada à inibição do ROR γ t (do inglês, *Retinoic-acid-receptor-related Orphan Receptor- γ t*), que é um fator de transcrição para diferenciação de células T virgens em T_H17 (MUCIDA *et al.*, 2007); (NISHIHARA *et al.*, 2007); (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008). As células dendríticas do baço, linfonodo mesentérico (MUCIDA *et al.*, 2007); (COOMBES *et al.*, 2007) e lâmina própria do intestino delgado são capazes de produzir ácido retinóico e induzir diferenciação de T virgens em Tregs (SUN *et al.*, 2007).

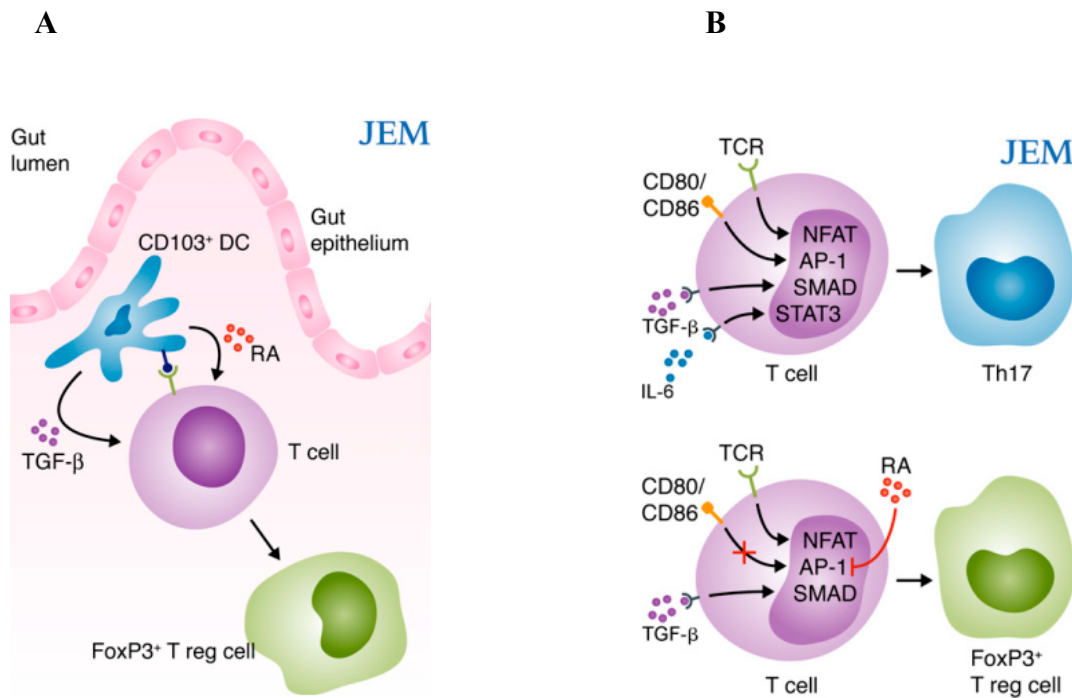


Figura 4 – Diferenciação de células Treg no intestino mediada por ácido retinóico. (A) O ácido retinóico, associado ao TGF- β , produzidos por células dendríticas da mucosa intestinal, leva a um aumento na expressão de FoxP3, diferenciando células T CD4⁺ virgens em Tregs. (B) A citocina TGF- β , abundante na mucosa intestinal, pode mediar a diferenciação de classes tão antagônicas de linfócitos T CD4⁺ tais como Th17 ou Treg dependendo da sua associação, no momento da ativação dos linfócitos T CD4⁺ virgens, com IL-6 ou ácido retinóico secretados, ambos pelas células dendríticas da mucosa intestinal (von Boehmer, 2007).

Além de induzir geração e proliferação de Tregs, o ácido retinóico induz expressão de moléculas de direcionamento ao intestino, a quimiocina CCR9 e a integrina $\alpha 4\beta 7$, adquirindo então a capacidade de migrar para a lâmina própria intestinal (BENSON *et al.*, 2007) e, aparentemente, essa capacidade migratória para o intestino surge sob condições de inflamação ou linfopenia (MENNING *et al.*, 2010).

Estudos já mostraram que a suplementação com vitamina A pode ser usada para reduzir sintomas de algumas doenças. Esse é o caso da doença de obstrução pulmonar crônica (COPD, do inglês *Chronic obstructive pulmonary disease*), doença comum em fumantes. Essa doença é caracterizada pela substituição do epitélio respiratório normal por um epitélio metaplástico escamoso e, acredita-se, que seja causada por uma deficiência local de vitamina A, provavelmente devido à constante exposição à fumaça do cigarro. Apesar de a deficiência ser local, a suplementação oral desse nutriente por um mês consegue atenuar os sintomas da doença (BIESALSKI; NOHR, 2004).

Assim como nas doenças de inflamação pulmonar, os estudos em inflamação intestinal também tem tido a vitamina A como foco para novos tratamentos. Pesquisadores chineses mostraram que a administração intraperitoneal de ácido retinóico é capaz de melhorar colite aguda induzida por TNBS (ácido trinitro-bezeno-sulfônico, do inglês, *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*), provavelmente pela troca do perfil celular e humoral de T_H1 para T_H2 (BAI *et al.*, 2010). Para corroborar tais evidências, já foi visto que a deficiência dessa vitamina exacerba a colite em modelo de indução de colite também por TNBS, em ratos. Acredita-se que esse aumento na inflamação esteja associado a um aumento da atividade do fator nuclear NF-κB, na mucosa do cólon (REIFEN *et al.*, 2002).

Assim como a deficiência em vitamina A é prejudicial e leva a graves conseqüências, a hipervitaminose também o é. Como esse nutriente pode ser largamente estocado, principalmente no fígado, o consumo exagerado da vitamina por um longo período de tempo pode resultar em sintomas de intoxicação, como danos no fígado, anormalidades nos ossos e dor nas articulações, dores de cabeça, alopecia, vômito e escamação da pele. Além do consumo exagerado, uma má distribuição do nutriente no organismo pode levar a sintomas de hipervitaminose (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). O organismo tem ótimos mecanismos de absorção da vitamina, mas os mecanismos de excreção ou de quebra do excesso são poucos, então pode haver danos nas membranas celulares ou até no genoma (BATES, 1995).

2.3. A perda da homeostase e as doenças inflamatórias intestinais

Como mencionado, vários fatores contribuem para a homeostase imunológica na mucosa intestinal. Em geral, o contato crônico com antígenos naturais como a microbiota e as proteínas da dieta, na presença desses fatores, gera atividades não inflamatórias no intestino tais como a IgA secretória e a tolerância oral. O retinol figura como um dos fatores envolvidos tanto na produção de IgA secretória por linfócitos B1 quanto na geração de células Treg no intestino e, portanto, na manutenção dessa homeostase. Isso acontece, pois o ácido retinóico ativa o fator nuclear NFATc1 (do inglês, *Nuclear Factor of Activated T Cells C1*), ao qual o desenvolvimento das células B1 é dependente (MARUYA *et al.*, 2011) e, como relatado anteriormente, essas células são muito importantes na produção de sIgA na mucosa intestinal. Quando as atividades fisiológicas que mantêm a homeostase intestinal estão perturbadas, esse contato pode levar à indução de respostas inflamatórias crônicas no intestino. Tais respostas resultam nas chamadas doenças inflamatórias do intestino. As doenças inflamatórias intestinais, geralmente chamadas de IBD (do inglês, *Inflammatory Bowel Diseases*) são doenças multifatoriais, estando entre os fatores principais para sua ocorrência, a predisposição genética. Acredita-se que uma resposta imune desregulada contra as bactérias intestinais também está associada com as IBD, além da interferência de fatores externos. O grupo de doenças de inflamação crônica do trato gastrointestinal compreende a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa.

Os estudos a respeito do assunto apontaram interações gene-gene e gene-ambiente, que são uma chave para a complexa desordem imunológica que acompanha os pacientes com IBD. É extremamente difícil identificar os fatores que desencadearam a inflamação intestinal nos pacientes com essas doenças. A caracterização da patologia se torna mais difícil devido à grande heterogeneidade clínica e genética dos pacientes (UHLIG; POWRIE, 2009).

A obtenção de um quadro detalhado de como os genes, e outras seqüências de DNA, funcionam juntos, e interagem com fatores ambientais, têm levado à descoberta de vias envolvidas nos processos fisiológicos e na patogênese dessas doenças (ISHIHARA *et al.*, 2009).

Já foram identificados aproximadamente 30 loci de susceptibilidade para as duas doenças. O primeiro gene de susceptibilidade à doença de Crohn descoberto foi o gene envolvido no sistema imune, NOD2 (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization*

domain containing 2), antigamente conhecido como CARD15. Já foi descoberto que a falta desse gene leva a um aumento no número de bactérias comensais, porém com uma menor capacidade de prevenir a colonização por parte das bactérias patogênicas (HENDERSON *et al.*, 2011); (ISHIHARA *et al.*, 2009).

Após as primeiras descobertas, numerosas outras sugeriram rapidamente, inclusive vários genes envolvidos na ativação do sistema imune, como o fator de regulação do interferon-1 (IRF1) e de importantes citocinas como IL-4, IL-13, IL-5 e IL-3.

Investiu-se muito na tentativa de descobrir relações entre a susceptibilidade às IBD e o MHC e atualmente já foi estabelecida relação entre diferentes genes para HLA em doença de Crohn e colite ulcerativa.

Além da influência genética, idade e sexo têm grande influência na manifestação dessas doenças. Ambas acometem, geralmente, adultos jovens, tendo como pico de incidência a faixa entre 15 e 30 anos (ISHIHARA *et al.*, 2009).

Dentre os fatores externos que influenciam a ocorrência das IBD está o estilo de vida e alimentação. A amamentação materna, por exemplo, confere imunidade ao bebê enquanto seu sistema imune intestinal ainda está em desenvolvimento. Estudos mostraram que a amamentação também é capaz de conferir proteção contra doenças inflamatórias (ISHIHARA *et al.*, 2009).

Essa questão alimentar ainda é bem discutida, mas seu papel na doença já é um consenso, pois as proteínas ingeridas na dieta têm um papel fundamental tanto no desenvolvimento do sistema imune, quanto na tolerância que existe ali (STROBEL; MOWAT, 1998); (MENEZES *et al.*, 2003). Uma desregulação na resposta a esses antígenos pode ter um papel decisivo no desenvolvimento da inflamação. Os pacientes com a doença ativa podem perder, temporariamente ou não, essa tolerância oral a componentes específicos da dieta e a resposta a esses componentes pode contribuir para a lesão na mucosa (MURCH; WALKER-SMITH, 1998). Além disso, a inflamação no intestino leva a uma menor absorção dos nutrientes ingeridos, devido à perda da arquitetura da mucosa. Estudos relacionam o consumo exagerado de carboidratos e ácidos graxos poliinsaturados, associado ao baixo consumo de fibras, com a ocorrência dessas doenças. Além disso, alguns alimentos, como leite e castanhas, parecem estar relacionados à intolerância em pacientes com Crohn, mas não se chegou a nenhuma conclusão ainda, devido às dificuldades metodológicas e variações entre os pacientes (PEARSON *et al.*, 1993); (MURCH; WALKER-SMITH, 1998); (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

Regiões em desenvolvimento apresentam baixas taxas de inflamação intestinal, enquanto América do Norte e Europa apresentam as taxas mais altas. Parte da explicação para essa diferença geográfica são as condições de higiene precárias ou deficitárias em muitos países em desenvolvimento, provavelmente tendo relação com a hipótese da higiene que relaciona esse mesmo fator às baixas taxas de doenças respiratórias nesses locais. Uma baixa exposição a antígenos externos, nos países desenvolvidos, pode prejudicar a maturação funcional do sistema imune das mucosas e diminuir a indução da tolerância, que resultaria em respostas imunes inapropriadas, como a inflamação intestinal e nas mucosas do trato respiratório. Depressão e stress também são dois fatores que influenciam as IBD, mas parecem estar mais ligadas ao aumento das crises inflamatórias em portadores da doença do que a um iniciador da mesma (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004).

Apesar da microbiota ter um papel indiscutível na inflamação, acredita-se que não há um microrganismo específico que seria o agente causador da desordem, mas esse dado também é controverso, uma vez que a bactéria *Mycobacterium paratuberculosis* causa em ruminantes uma doença muito similar à doença de Crohn. No entanto, a maioria dos pesquisadores acredita que a microbiota comensal tem esse papel chave no desencadeamento das doenças (DANESE; SANS; FIOCCHI, 2004); (BAUMGART; CARDING, 2007).

Conforme relatado anteriormente, a barreira epitelial e as células epiteliais produzem muco e um extenso repertório de proteínas antimicrobianas, que fazem parte dos mecanismos inatos que controlam a microbiota intestinal, prevenindo a translocação e modulando a composição da mesma. Defeito na produção de muco ou problema na interação, reparo ou homeostase de células epiteliais leva a um desenvolvimento de colite em camundongos e tal observação demonstra a importância da barreira epitelial. As defensinas e RNAses também já mostraram ter um papel fundamental na imunidade intestinal, uma vez que alterações na sua secreção foram descritas em pacientes com doença de Crohn assim como em colite experimental murina (HENDERSON *et al.*, 2011); (UHLIG; POWRIE, 2009).

Devido à grande quantidade de antígenos no intestino, provenientes da dieta e a microbiota ali presente, é necessária uma supressão da resposta imune local, caso contrário, haveria constantemente uma inflamação patogênica ali, pois o tecido linfóide da mucosa é repleto de células T, B, granulócitos, mastócitos, células NK e NKT (BAUMGART; CARDING, 2007); (STROBER; FUSS; MANNON, 2007).

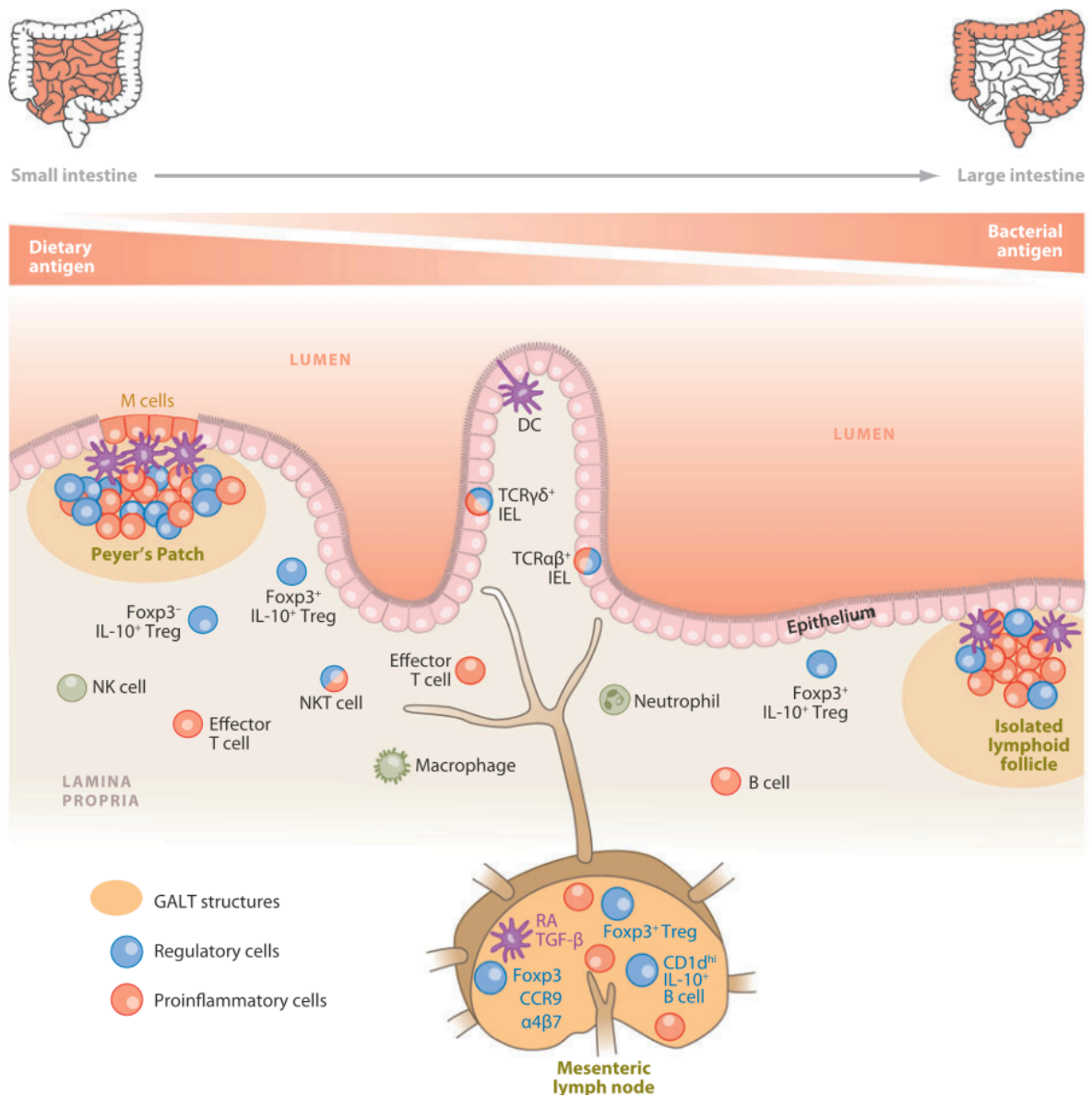


Figura 5 – Ambiente imune intestinal. Na lâmina própria intestinal coexistem as células efetoras e as células reguladoras, de modo que a inflamação fica controlada. Do intestino delgado ao cólon, as principais fontes de estimulação variam, sendo os antígenos da dieta os principais fatores no intestino delgado, uma vez que a degradação e absorção dos alimentos ocorrem ali. Como foi exposto, esses podem influenciar as células do sistema imune da lâmina própria, como as células dendríticas, linfócitos T e B e células da imunidade inata, como as NK e NKT. Já os antígenos bacterianos são as principais fontes de estimulação no cólon, pois ali se encontra a maior concentração de microrganismos (Izcue, Powrie et al., 2009).

Para tal função, o intestino emprega diversos mecanismos. Um deles é o recrutamento de células reguladoras e secreção de citocinas antiinflamatórias, que limitam a resposta imune inata inicial. Outro mecanismo é o desenvolvimento de células

B produtoras de IgA. Como já citada, a IgA secretória também tem um papel essencial nessa manutenção da homeostase, reduzindo a sinalização intestinal pró-inflamatória e a expressão de epitopos bacterianos, facilitando a apresentação de antígenos às células M, dentre outros mecanismos.

Existe uma considerável comunicação entre as células do epitélio intestinal e as células dendríticas presentes na lâmina própria e essas células dendríticas têm um importante papel na homeostase do epitélio intestinal (BAUMGART; CARDING, 2007) (Fig. 5).

Com essa função de barreira contra a invasão dos microrganismos e supressão do sistema imune, é de se supor que anormalidades na barreira intestinal, como aumento na permeabilidade ou interações alteradas entre as células epiteliais e células imunes, têm uma contribuição determinante na ocorrência das IBD. E, como já mostrado, alguns microrganismos, inclusive, têm como mecanismo de invasão danificar as junções intercelulares (HENDERSON *et al.*, 2011).

Para agravar a situação, em alguns casos de pessoas com IBD, o reconhecimento e processamento antigênico por parte das células apresentadoras de antígenos profissionais pode sofrer distúrbios (células dendríticas reconhecendo erroneamente bactérias comensais como patogênicas e levando a uma resposta T_H1 ou T_H17), potencializando a ativação de células T efetoras. Defeito na apoptose de células T na mucosa intestinal também tem uma importante contribuição na patogênese das IBD, sendo que a proteína Bax, uma das reguladoras da apoptose, tem níveis reduzidos em cólon de pacientes com colite ulcerativa (NEUMAN, 2007). O próprio fator stress, já citado, pode ser um gatilho para o início da cascata inflamatória causada pela exacerbação da resposta imune, através de interações neuroimunológicas (HENDERSON *et al.*, 2011).

O esquema abaixo mostra a interação desses diversos fatores que culminam na inflamação intestinal (Fig. 6).

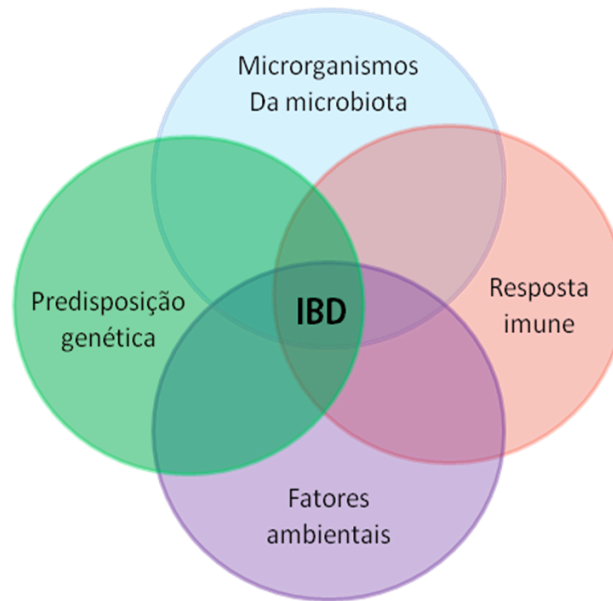


Figura 6 – Interação dos fatores envolvidos na ocorrência das IBD. Fatores genéticos, ambientais, imunes e locais (como a microbiota) interagem e culminam na inflamação da mucosa intestinal.

Dentre os mecanismos reguladores estão as células CD4+FoxP3+ (Tregs), tanto as naturais quanto as induzidas, e elas têm uma contribuição chave na homeostase intestinal. A produção de citocinas predominantemente antiinflamatórias como IL-10 e TGF- β também é de grande auxílio para evitar uma inflamação indesejada e as células reguladoras do tipo 1 (Tr1) são grandes produtoras, principalmente de IL-10. Essas células não apresentam o fator de transcrição FoxP3 (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009); (UHLIG; POWRIE, 2009).

Dessa forma, colocando a atividade regulatória de um lado da balança e a atividade efetora e inflamatória, junto com a microbiota, do outro lado da balança, tanto uma diminuição do lado regulador, quanto um aumento na microbiota ou na atividade inflamatória podem culminar na inflamação intestinal. E a homeostase intestinal não é atingida novamente apenas com a redução da quantidade de células inflamatórias ou aumento na atividade reguladora, mas também é necessária uma reintegração da barreira intestinal (Fig. 7) (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009).

transmural como característica (BAUMGART; SANDBORN, 2007). Evidências sugerem que uma disfunção na barreira intestinal está associada com a patogênese da doença de Crohn (TURNER, 2009). Quando a doença de Crohn está ativa, é caracterizada por um aumento no número de linfócitos T ativados na mucosa e que secretam IFN- γ , além de um aumento na produção, na mucosa, de citocinas características de respostas T_H1, como IL-12 e IL-8 (MACDONALD; MONTELEONE; PENDER, 2000) e T_H17, como IL-17 e IL-23 (NEURATH, 2007).

Hoje, existem vários modelos murinos para se estudar IBD, e eles se assemelham a aspectos inflamatórios de doenças intestinais em humanos. Tais modelos forneceram dados de mecanismos que controlam a homeostase e regulação da inflamação intestinal (UHLIG; POWRIE, 2009).

No caso da colite, a maioria desses modelos reflete processos que envolvem a presença de estímulos que desencadeiam a inflamação, como bactérias específicas ou stress epitelial por agentes químicos. Alguns deles combinam rompimento da barreira intestinal com etanol, por exemplo, combinado a agentes químicos como ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) ou oxazolona, que produzem colite aguda. No caso desses modelos a administração é intrarectal (WIRTZ *et al.*, 2007).

A colite também pode ser induzida super expressando mediadores inflamatórios como, por exemplo, TNF- α e IFN- γ , assim como removendo os elementos regulatórios. (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002); (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009). O IFN- γ é uma citocina indispensável para o desenvolvimento da colite, uma vez que animais deficientes em IFN- γ não desenvolvem a doença ou desenvolvem de uma forma muito atenuada (ITO *et al.*, 2006). Porém, um dos principais modelos de indução de colite é por dextran sulfato de sódio (ao qual será dado maior enfoque a seguir).

Um dos principais modelos murinos de doença de Crohn é o animal deficiente de IL-10, caracterizado por uma deficiência na sinalização imune, que leva à destruição da barreira intestinal, seguida de hiperplasia celular e inflamação transmural. Nesse modelo, a presença da microbiota é essencial e quanto maior a quantidade desses microrganismos, mais severa é a doença. Outro modelo dessa doença são animais que super expressam TNF- α , e nesse caso a doença é localizada principalmente no íleo terminal e, ocasionalmente, no cólon proximal (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002).

2.3.1. Colite induzida por administração oral de DSS

Outra forma de induzir a colite é pela administração do agente químico dextran sulfato de sódio (DSS) à água de beber dos animais. Esse modelo leva a lesões à barreira intestinal que desencadeia uma colite aguda (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009). Caso seja necessário um modelo de colite crônica, os pesquisadores fazem vários ciclos com o agente químico (em geral, de dois a cinco), administrando por uma semana, deixando uma semana de descanso e administrando por mais uma semana e assim por diante (WIRTZ *et al.*, 2007); (MELGAR; KARLSSON; MICHAELSSON, 2005).

Acredita-se que a microbiota não seja essencial no modelo de colite por DSS, uma vez que animais isentos de germes (*germ-free*) também desenvolvem inflamação intestinal quando submetidos ao tratamento com DSS (KITAJIMA; MORIMOTO; SAGARA, 2002). Dados sugerem que a ação do DSS, na indução da colite, acontece após a lesão da mucosa intestinal por citotoxicidade direta, interferência na interação normal entre linfócitos intraepiteliais, células epiteliais e a matriz extracelular, além de alterações na expressão de receptores de integrinas e outros receptores celulares e suas funções (NI; CHEN; HOLLANDER, 1996). Com a lesão na barreira intestinal a invasão de bactérias no tecido intestinal é facilitada, e o DSS também age impedindo a ação fagocítica de macrófagos (ITO *et al.*, 2006).

O fator de transcrição T-bet é responsável por manipular genes tanto da resposta imune adaptativa quanto inata, controlando a resposta imune da mucosa a bactérias comensais, regulando a produção de TNF- α por células dendríticas do cólon. Desse modo, o T-bet é capaz de influenciar o comportamento da atividade inflamatória do hospedeiro e das bactérias comensais e a sua ausência já foi relacionada à severidade ou ocorrência da colite ulcerativa (GARRETT *et al.*, 2007).

Outros fatores imunes auxiliam na determinação da severidade da doença como, por exemplo, o MyD88, uma proteína de diferenciação mielóide essencial para sinalização via Toll-Like Receptors (TLR), que em sua ausência, os animais exibem uma maior susceptibilidade à colite (ARAKI *et al.*, 2005). IL-6, IL-21 e IL-17 são outras citocinas presentes e necessárias para o desenvolvimento e maior severidade das inflamações intestinais em modelos murinos. Essas citocinas estão envolvidas com a resposta das células inflamatórias T_H17 (UHLIG; POWRIE, 2009), sendo que a IL-21 geralmente está super expressa em animais com doenças inflamatórias intestinais e

animais deficientes de IL-21 são menos susceptíveis à colite induzida tanto por DSS quanto por TNBS (FINA *et al.*, 2008). A IL-6 juntamente com o fator TGF- β induz células CD4⁺ virgens a se diferenciar também em células T_H17 (MUCIDA *et al.*, 2007); (NISHIHARA *et al.*, 2007). Já a citocina pró-inflamatória IL-27 inibe a diferenciação de T_H17, pois auxilia na geração de células T_H1 (COLGAN; ROTHMAN, 2006).

2.3.2. Tratamentos em uso para as IBD

Algumas drogas são amplamente utilizadas para tentar uma remissão na doença e evitar intervenções cirúrgicas, que são muito invasivas. Atualmente terapias com antiinflamatórios, imunossupressores e imunomoduladores têm sido utilizada com algum sucesso. Essas drogas conseguem induzir uma remissão e a manter por certo tempo, porém uma parcela significativa dos pacientes não responde à terapia e outra parcela sofre efeitos negativos. Além disso, nenhuma droga consegue curar as IBD em longo prazo (UHLIG; POWRIE, 2009). Exemplos de drogas imunossupressoras são azatioprina, 6-mercaptopurina, e metotrexato, que são citotóxicas, conseguindo induzir e manter temporariamente remissão na doença de Crohn, mas aparentemente nenhuma dessas é capaz de reduzir a necessidade de cirurgia. As tiopurinas também têm se mostrado eficazes para colite ulcerativa. Os imunomoduladores geralmente são anticorpos monoclonais que têm como alvo principal citocinas como IL-6, IL-12, TNF- α , ou administração de citocinas recombinantes como IL-10 (BRAUS; ELLIOTT, 2009).

Outra terapia muito utilizada são os corticosteróides que são bons para inibir respostas imunes e na maioria dos pacientes é a principal terapia utilizada (MACDONALD; MONTELEONE; PENDER, 2000). A desvantagem dessa terapia é que uma quantidade substancial de pacientes se torna esteróide-dependente (BRAUS; ELLIOTT, 2009).

Diversos autores sugerem como terapias modificações na dieta dos pacientes, tendo sido sugeridas por médicos e inclusive alguns pacientes autonomamente têm feito alterações alimentares. A ação desse tipo de tratamento seria na modificação da provisão de nutrientes que alcança o intestino (antígenos da dieta), que acaba induzindo alterações na microbiota, alterando todo o estímulo antigênico ali, diminuindo as causas da inflamação e, inclusive, podendo auxiliar no reparo tecidual (RAJENDRAN; KUMAR, 2010).

Alguns autores sugerem alimentação elementar ou alimentação polimérica, o que parece surtir alguns efeitos no sentido de diminuir as crises, reduzindo a inflamação, além de auxiliar a absorção dos nutrientes. A alimentação polimérica é mais aceita, pois a elementar é menos palatável, e ambas parecem ter o mesmo efeito (RAJENDRAN; KUMAR, 2010).

Algumas alternativas terapêuticas experimentais têm sido propostas e poucas delas estão atualmente em fase de estudo clínico, como é o caso do uso do microrganismo *Lactococcus lactis* produtor de IL-10 (STEIDLER *et al.*, 2000). Essa busca por novas formas de tratamento das doenças inflamatórias do intestino se justifica exatamente pelas dificuldades e pelos efeitos colaterais associados à terapia convencional. Nossa hipótese de trabalho é que os efeitos da vitamina A na indução de linfócitos B1 produtores de IgA secretória e na geração de células T reguladoras no intestino a qualificam como um agente dietético importante para a manutenção da homeostase da mucosa intestinal. Assim, ela pode ter um potencial terapêutico para as situações onde essa homeostase está perturbada como ocorre nas doenças inflamatórias agudas ou crônicas do intestino.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar os efeitos de uma dieta com ausência e suplementação de vitamina A no organismo saudável e na homeostase da mucosa intestinal, utilizando modelo de colite ulcerativa.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar os efeitos imunológicos e metabólicos da ausência de vitamina A na dieta de camundongos saudáveis, bem como os efeitos da suplementação da mesma, observando-se os seguintes parâmetros:
 - Imunoglobulinas séricas no sangue, IgG, IgM e IgA, e fezes, sIgA
 - Análise fenotípica de células do sistema imune no baço, linfonodo mesentérico, placa de Peyer e lâmina própria
 - Níveis sanguíneos de glicose, colesterol, triglicérides e enzima hepática
 - Determinação da quantidade de lipídeos no fígado
 - Análise morfológica da mucosa intestinal e hepática
 - Secreção de citocinas IFN- γ , TGF- β e IL-10 por células do baço, linfonodo mesentérico e intestino
 - Avaliar os efeitos da vitamina A no desenvolvimento dos animais pela verificação semanal do peso

2. Determinar os mesmos efeitos imunológicos da ausência e suplementação de vitamina A na dieta de camundongos com colite ulcerativa, como uma tentativa de prevenção - ou agravamento - da colite, pela manutenção da homeostase intestinal, utilizando os mecanismos já citados acima, além dos parâmetros que se seguem:
 - Média do consumo de DSS durante os 6 dias de indução da colite
 - Média do consumo de ração durante os 6 dias de indução da colite
 - Score da colite por peso dos animais e comprimento do cólon

2. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 3-4 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CeBio) da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no biotério do laboratório de Imunobiologia, no Instituto de Ciências Biológicas da mesma instituição.

Foram também utilizados camundongos transgênicos, com fundo genético C57BL/6, com um cDNA de proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) provenientes da *Aequorea Victoria* (água viva) (Okabe et al, 1997), sob o controle do gene FoxP3. Os camundongos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Howard Weiner, Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School, Boston, MA, EUA. Esses animais foram mantidos em gaiolas microisoladoras até o desmame com 4 semanas e após essa data foram transferidos para gaiolas tradicionais, onde permaneceram todo o tempo durante a realização do tratamento.

4.2. Modificação da Dieta AIN-93

O Instituto Americano de Nutrição (AIN – American Institute of Nutrition) desenvolveu uma dieta padrão para estudos nutricionais em roedores, nos quais não seria possível utilizar a ração normal. Para esse fim, foi criado um comitê para se desenvolver uma dieta saudável para os animais e que ao mesmo tempo diminuiria a variação entre as dietas de diferentes laboratórios, facilitando assim a interpretação e entendimento de resultados entre diferentes grupos de pesquisa. A dieta AIN-93G (*American Institute of Nutrition 93 Growth*) foi desenvolvida para as fases de crescimento, gravidez e lactação de roedores, pois contém uma composição com maior teor de proteína e gordura, enquanto a dieta AIN-93M tem uma quantidade menor desses componentes, recomendável para manutenção dos adultos (REEVES; NIELSEN; FAHEY, Jr., 1993).

De acordo com o estudo que o pesquisador irá fazer, e de acordo com as necessidades desse, serão feitas modificações na dieta padrão, como por exemplo, a retirada ou suplementação de algum componente específico que já compõe a dieta, ou suplementação com algum componente novo.

Abaixo seguem os ingredientes da dieta com os respectivos pesos e os componentes do mix mineral e do mix vitamínico (Tabela 1 - Tabela 4).

Componentes da dieta AIN-93G	Quantidades (g/kg de dieta)
Amido	397,486
Caseína (> 85% de proteína)	200,000
Amido Dextrinizado	132,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja	70,000
Fibra (Celulose)	50,000
Mix Mineral (AIN-93G-MX)	35,000
Mix Vitamínico	10,000
L-Cistina	3,000
Bitartarato de Colina (41,1% de colina)	2,500
Tetra-butilhidroquinona	0,014

Tabela 1 – Componentes da dieta AIN-93G. Componentes da dieta AIN-93G em grama por quilograma de dieta (Reeves et al., 1993).

Componentes do Mix Mineral	Quantidades (mg/kg de dieta)
Minerais Essenciais	
Cálcio	5000,0
Fósforo	1561,0
Potássio	3600,0
Enxofre	300,0
Sódio	1019,0
Cloro	1571,0
Magnésio	507,0
Ferro	35,0
Zinco	30,0
Manganês	10,0
Cobre	6,0
Iodo	0,2
Molibdênio	0,15
Selênio	0,15

Tabela 2 – Minerais essenciais que compõem a dieta AIN-93G. Minerais essenciais que compõem o Mix Mineral da dieta AIN-93G em 35 gramas do mix, por quilograma de dieta. Valores em miligrama por quilograma (Reeves et al., 1993).

Componentes do Mix Mineral	Quantidades (mg/kg de dieta)
Minerais Potencialmente Benéficos	
Silício	5,0
Cromo	1,0
Fluoreto	1,0
Níquel	0,5
Boro	0,5
Lítio	0,1
Vanádio	0,1

Tabela 3 – Minerais benéficos, não essenciais, que compõem a dieta AIN-93G. Minerais benéficos que compõem o Mix Mineral da dieta AIN-93G em 35 gramas do mix. Valores em miligrama por quilograma de dieta (Reeves et al., 1993).

Componentes do Mix Vitamínico	Quantidades (mg/kg de dieta)
Ácido nicotínico, mg	30,0
Pantotenato, mg	15,0
Piridoxina, mg	6,0
Tiamina, mg	5,0
Riboflavina, mg	6,0
Ácido fólico, mg	2,0
Vitamina K, µg	750,0
D-Biotina, µg	200,0
Vitamina B12, µg	25,0
Vitamina A, UI	4000,0
Vitamina D3, UI	1000,0
Vitamina E, UI	75,0

Tabela 4 – Componentes vitamínicos da dieta AIN-93G. Vitaminas que compõem o Mix Vitamínico da dieta AIN-93G em 10 gramas do mix por quilograma de dieta. Valores em miligrama ou micrograma por quilograma (Reeves et al., 1993).

A dieta utilizada para alimentar os camundongos durante esse trabalho seguiu o padrão da AIN-93G e os ingredientes em marcas estão especificados na tabela abaixo:

Componentes da dieta AIN-93G	Quantidades (g/kg de dieta)
Amido Aro®	397,486
Caseína (> 85% de proteína) Rhoster®	200,000
Amido Dextrinizado Rhoster®	132,000
Sacarose União®	100,000
Óleo de soja Liza®	70,000
Fibra (Celulose) Synth®	50,000
Mix Mineral (AIN-93G-MX) Rhoster®	35,000
Mix Vitamínico Rhoster®*	10,000
L-Cistina Synth®	3,000
Bitartarato de Colina (41,1% de colina) Rhoster®	2,500
Tetra-butilhidroquinona Rhoster®	0,014

Tabela 5 – Componentes da dieta AIN-93G, com as respectivas marcas utilizadas. Lista dos componentes da dieta AIN-93G em grama por quilograma de dieta, com as respectivas marcas que utilizadas e mantidas durante todo o período experimental.

* Os mix vitamínicos específicos foram fabricados pela Rhoster®, de acordo com as especificações que se seguem: mix com ausência total de vitamina A, mix padrão com 4.000 unidades internacionais (U.I.) por quilo de dieta e mix suplementado com vitamina A, com 10.000 unidades internacionais por quilo de dieta. Um quarto mix vitamínico foi utilizado com 50.000 U.I. de suplementação de vitamina A, no qual foi adicionado 0.1 grama de vitamina A pura ao mix vitamínico deficiente de vitamina A. A vitamina pura utilizada estava a 500.000 U.I. por grama de vitamina, obtida também da Rhoster®. As outras vitaminas que compõe os mix não tiveram qualquer alteração em relação ao mix padrão.

Os outros componentes da dieta não sofreram quaisquer alterações, em relação à dieta padrão estabelecida por Reeves e colaboradores (REEVES; NIELSEN; FAHEY, Jr., 1993).

De acordo com o proposto acima, foram utilizadas quatro dietas diferentes em quatro grupos, sendo que uma foi feita sem nenhuma alteração, seguindo a dieta padrão proposta por Reeves e colaboradores e as outras três tiveram apenas a vitamina A do Mix Vitamínico alterada, como explicado acima.

As dietas foram administradas *ad libitum* desde o desmame, por oito semanas.

4.3. Delineamento experimental

Os animais utilizados nesse estudo foram camundongos C57BL/6 normais, saudáveis e ingeriram diferentes tipos de dieta para analisar os efeitos da vitamina A no organismo, ou seja, quais alterações seriam observadas devido à deficiência (controle negativo) e suplementação oral dessa vitamina. Apesar de evidências sugerirem que o aumento de vitamina A no plasma é maior com administração intramuscular da vitamina, o método oral também parece ser eficiente e muito menos invasivo (RUSH *et al.*, 1994). Como controle, utilizamos um grupo alimentado com a dieta normal, com as quantidades de vitamina de acordo com o padrão AIN-93G, já especificado. Em metade desses animais, na última semana de dieta foi induzida colite através do tratamento oral com DSS (dextran sulfato de sódio) a 2,0% (peso/volume) na mamadeira, segundo protocolo para indução de colite, desenvolvido por Okayasu (OKAYASU *et al.*, 1990) com adaptações. Essa solução foi administrada uma vez (1 ciclo) durante 6 dias, após 7 semanas de dieta, e durante a administração do DSS os animais continuaram recebendo a mesma dieta. A solução da mamadeira foi medida e renovada diariamente durante o período citado e os animais pesados diariamente durante a administração, sendo que a água contida na mamadeira com o DSS foi a única disponível para os animais durante esses 6 dias.

Nesse estudo foi feita uma tentativa de prevenção da colite, uma vez que os animais foram submetidos à dieta com suplementação de vitamina A antes de induzirmos a doença nos mesmos.

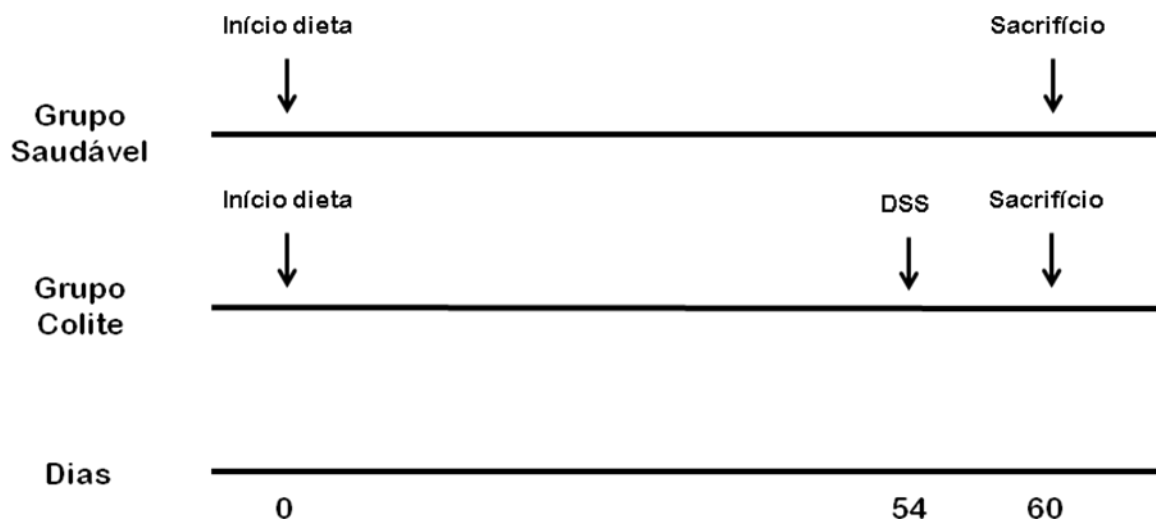
No protocolo utilizado, os animais foram divididos em 8 grupos. Quatro grupos de animais saudáveis até o fim do experimento (não foi induzida colite) e quatro grupos cujos animais foram tratados com DSS. Os animais do grupo saudável receberam 4 tipos de dieta diferentes. A primeira dieta deficiente em vitamina A, outra dieta controle, com 4000UI de vitamina A, a terceira suplementada com 10000UI da vitamina e a última também suplementada com 50000UI do mesmo nutriente. Os animais do grupo colite foram subdivididos nos mesmos quatro grupos que os animais saudáveis. Cada animal foi pesado semanalmente, e a quantidade de dieta ingerida por gaiola foi medida três vezes por semana.

A segunda etapa do procedimento experimental foi a eutanásia dos animais no final da oitava semana após o início da dieta, e obtenção de soro para testes bioquímicos e ELISA, fígado para histologia e dosagem de gordura, cólon para histologia, *score*

macroscópico da colite e dosagem de citocinas (utilizando a técnica de ELISA de extrato de tecido) e intestino delgado (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo), também para dosagem de citocinas de extrato de tecido. Também foi retirado o baço e linfonodo mesentérico para cultura e citometria de fluxo (FACS) e placa de Peyer e lâmina própria apenas para análise por FACS.

O esquema abaixo representa um resumo do delineamento experimental para cada grupo. Os animais saudáveis com dieta deficiente, normal e suplementada foram sacrificados no mesmo dia (fim da 8ª semana), para retirada dos órgãos e soro, assim como os três grupos de animais com colite.

Protocolo utilizado



4.4. Obtenção do soro

Para obtenção do soro, os animais foram previamente anestesiados, mediante aplicação de injeção intraperitoneal de 100 µl de solução de Cloridato de Ketamina a 25% (Dopalen – Vetbrands) e de Xilazina a 25% (Rompum – Bayer), diluídas em 50% de salina fisiológica 0,85%, via intraperitoneal. Os animais foram então, exsanguinados pelo plexo subaxilar e o sangue coletado em tubos de centrifugação de 500µl sem anticoagulante. Em seguida, foram eutanasiados por deslocamento cervical. Para separação do soro, o sangue foi deixado por 15 min em uma estufa, a temperatura de 37°C e em seguida, 15 min na geladeira. A seguir o sangue e o soro foram separados por centrifugação a 600g por 15 minutos.

Após a separação, o soro retirado, rotulado e congelado a -20°C para análises posteriores.

4.5. Remoção do intestino e cólon

O intestino delgado dos camundongos foi removido e, em seguida, dividido em quatro partes, correspondentes ao duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. Essas partes foram pesadas e congeladas para e posterior dosagem de citocinas de extrato de tecido.

O comprimento de todos os cólons foi medido com auxílio de uma régua para score macroscópico (AXELSSON; LANDSTROM; BYLUND-FELLENIOUS, 1998) e, de alguns animais, o cólon foi acondicionado em formol tamponado para análise histológica, de outros, o órgão foi pesado e congelado para dosagem de citocinas.

4.6. Remoção do fígado

Uma parte do fígado foi coletada e armazenada em um tubo Falcon contendo formol, para posterior análise histológica. A outra parte foi armazenada em freezer para posterior análise lipídica pelo método FOLCH.

4.7. Coleta do conteúdo fecal

Os camundongos foram separados por gaiola. As fezes de cada animal foram recolhidas com pinça em tubos de 1,5 ml (previamente pesados) e mantidas no gelo (para não reduzir os níveis de sIgA). Os tubos contendo as fezes foram pesados novamente e foi feita a diferença entre os pesos para determinação do peso das fezes. Para cada 0.1g de fezes 1mL de PBS 1x gelado foi adicionado ao tubo. A seguir, o conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 600g a 4°C. O nível de sIgA foi dosado no dia da coleta por ELISA.

4.8. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida de imunoglobulinas do soro

A avaliação dos anticorpos presentes no soro dos camundongos foi realizada através do método ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*).

Microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight*, por no mínimo 18 horas, a 4°C em câmara úmida, com solução contendo anticorpo anti-imunoglobulinas totais de camundongos em tampão de cobertura (tampão carbonato pH 9,6) concentração de 1µg/mL. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com salina-Tween (salina contendo 0,05% Tween-20 – SIGMA Chemical Co) e em seguida bloqueadas com 200 µl PBS-caseína (0,25% caseína diluída em PBS) e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente duas vezes em salina-Tween e incubadas com o soro dos camundongos em diluição seriada em PBS-caseína (1:10000 a 1:1280000 no caso de IgG e Ig total e 1:1000 a 1:12800 no caso de IgM e IgA) durante uma hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e anticorpos anti-Ig, IgG, IgM ou IgA de camundongo conjugados com biotina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) e diluídos em PBS-caseína foram adicionados aos poços (100 µL/poço) durante uma hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (HRP) (Sigma, St. Louis, Missouri) diluída 15000 vezes em PBS-caseína durante uma hora à temperatura ambiente.

A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µl/mL de H₂O₂ e 0,4 mg/mL de ortofenileno-diamino (OPD)

em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarela. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A absorbância ($\lambda = 492$ nm) de cada poço foi obtida pela leitura em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader).

4.9. ELISA para detecção de IgA secretória nas fezes

Os procedimentos para sensibilização e bloqueio são comuns aos procedimentos realizados para ELISA de Imunoglobulinas. Ao se diluir as amostras, o sobrenadante originado da centrifugação das fezes deve obedecer a uma diluição (1:20). Desta diluição, retira-se 20µl e coloca-se em 180µl de PBS-caseína em microplaca de poliestireno de 96 poços (Nunc, Roskilde, Denmark). O controle deve ser realizado utilizando padrão Mouse IgA-UNLB (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). Pipeta-se 20µl do padrão diluído em 180 µl de PBS-caseína realizando, posteriormente, diluição seriada. Os procedimentos restantes de incubação com conjugado HRP e revelação são comuns às ELISAs de Imunoglobulinas séricas.

4.10. Análises bioquímicas

Todos os Kits que foram utilizados neste trabalho foram obtidos pela empresa KATAL Biotecnológica Ind. Com. Ltda. São Paulo - Brasil. Registro ANVISA: 10377390104.

4.10.1. Determinação das concentrações de triglicerídeos séricos

As concentrações de triglicérides séricos foram mensurados de acordo com o método enzimático colorimétrico (FOSSATI; PRENCIPE, 1982). O método consiste na hidrólise dos triglicerídeos do soro pela lipase lipopretéica produzindo glicerol livre, que é, então, fosforilado pela glicerol quinase, cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase a qual, em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Esse, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina), com máximo de absorção a 500nm. As dosagens foram feitas em microplaca como descrito acima na dosagem de colesterol, na qual 5µl das amostras de soro é plaqueada, em seguida

adicionando-se 500µl do reagente de cor. Para obtenção do reagente de cor, adiciona-se o volume do reagente 2 (10%) em um dos frascos tampão (90%). Após um período de incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 500nm em um leitor de microplaca. Para o cálculo temos: Triglicérides (mg/dl) = (Absorbância do teste / Absorbância do padrão) x 200.

4.10.2. Determinação das concentrações de colesterol total sérico

As concentrações de colesterol foram medidas por método enzimático (ALLAIN *et al.*, 1974), que consiste na hidrólise dos ésteres pela enzima colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado com absorção máxima de 500nm. A concentração de colesterol no soro ou plasma dos animais será determinada por um ensaio em microplaca de 96 poços (FAZIO *et al.*, 1997). Nesse procedimento, 2µl de cada amostra de soro é plaqueada e em seguida adiciona-se 200µl do reagente enzimático. O mesmo é realizado para o padrão, com 2 µl do padrão em 200 µl do reagente enzimático. O branco, como controle negativo, contém apenas o reagente enzimático, sem nenhuma amostra. Após um período de incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 492nm em um leitor de microplaca. Para o cálculo temos: Colesterol (mg/dL) = (Absorbância do teste / Absorbância do padrão) x 200.

4.10.3. Determinação das concentrações de HDL

A dosagem do colesterol HDL também foi realizada pelo método enzimático colorimétrico. A dosagem foi realizada após a precipitação seletiva de LDL e VLDL em polietilenoglicol tamponado em pH 10. Esse precipitante não altera a solubilidade das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Após a centrifugação no sobrenadante, teremos então a fração de interesse, HDL, que será determinada pelo sistema enzimático utilizado para dosagem de colesterol total sérico. Para dosagem, adiciona-se 15 µl de reagente precipitante em 15µl do soro, agitando-se vigorosamente cada amostra por 30 segundos. Após este período os eppendorfs contendo a amostra foram mantidos em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois do tempo de repouso, os

ependorfs foram centrifugado por 15 minutos a 300g. Em seguida, 10 µl do sobrenadante (contendo o HDL da amostra) foi adicionado a 100 µl de reagente de cor (reagente enzimático colesterol total) em microplacas e incubadas em estufa a 37°C por 10 minutos. A leitura será realizada a 492nm. O mesmo procedimento foi feito utilizando 10 µl de reagente padrão (100mg/dL). Para o cálculo das concentrações de HDL, temos que: (Absorbância do teste / Absorbância do padrão) x 40. O colesterol da fração aterogênica VLDL foi calculado a partir da concentração de triglicérides/5.

4.10.4. Determinação GAMA GT

A determinação da γ -glutamilttransferase (gamaGT) através de método cinético com o emprego do L- γ -glutamil-p-nitroanilida é recomendado pela Federação Internacional de Química Clínica. No presente método, a γ -glutamilttransferase cataliza a transferência do radical glutamil do substrato para um aceptor (glicil-glicina) formando γ -glutamilglicil-glicina e p-nitroanilina. A velocidade de formação da p-nitroanilina em 405 nm é proporcional à atividade da enzima presente. Para determinação, mistura-se 4 partes do Reagente nº 1 (Tampão – Contém Tampão Tris 133 mmol/L, Glicil-glicina 138 mmol/L e azida sódica 15,38 mmol/L) com 1 parte do Reagente nº 2 (Substrato – Contém γ - glutamil p- nitroanilida 23 mmol/L e azida sódica 15,38 mmol/L). Adiciona-se 4 µL de amostra diretamente na placa com 80 µL do reagente de trabalho. A placa é então coberta por papel alumínio por 5 minutos em estufa a 37°C. Após este período le-se a 405nm. Repete-se a leitura após 1, 2 e 3 minutos. Calcula-se a diferença entre as leituras ($\Delta A/\text{min}$), entre as medias das absorbâncias e utiliza-se este valor para o cálculo : GamaGT (U/L) = ΔA médio x 2121 (O Resultado é expresso em U/L).

4.10.5. Determinação dos níveis de Glicose

No presente método, a glicose da amostra sofre a ação da glicose oxidase em presença de oxigênio produzindo peróxido de hidrogênio. Este, em presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase produzindo um composto róseo-avermelhado (quinonimina) com máximo de absorção em 505nm. Para dosagem, pipeta-se 5 µL do reagente padrão, em triplicata e pipeta-se 5 µL da amostra, em duplicata. Acrescenta-se 500 µL do reagente de glicose em todos os poços, incuba-se

por 15 minutos na estufa de 37°C. Após este período foi determinada a absorvância das amostras em 505nm. Para o cálculo da concentração da glicose em mg/dL aplica-se a fórmula: Glicose (mg/dL) = (Absorvância do teste / Absorvância do padrão) x 100.

4.11. Análise histológica do cólon

Amostras do cólon de camundongos C57BL/6 saudáveis ou com colite induzida por DSS foram fixadas em formalina e processadas para análise histológica. Um corte de cada grupo, corado com hematoxilina e eosina (HE), foi fotografado utilizando-se uma câmera digital (Moticam 2500, China), acoplada em um microscópio óptico (Olympus Optical Co., Japan).

4.12. Análise histológica das amostras de fígado

Procedimento semelhante ao descrito em histologia do colón, no qual os órgãos foram fixados em formalina e processados para análise histológica.

4.13. Inclusão e Coloração lâminas Histológicas - técnica HE (Hematoxilina-Eosina).

Cada amostra contendo o cólon ou fígado foi colocada em cassetes®, previamente identificados, e estes foram colocados em soluções de álcool obedecendo os referidos tempos e concentrações (Álcool 70% - 30 min/ Álcool 80% - 30 min Álcool L 90% - 30 min). Após a imersão nos três alcoóis, os cassetes® foram imersos em uma solução de álcool etílico absoluto que foi colocada em dois diferentes compartimentos. (ABSOLUTO I - 30 min/ ABSOLUTO II- 30 min). Após a imersão em álcool etílico absoluto, os cassetes® foram imersos em xilol, também separados em dois diferentes compartimentos (XILOL I – 30 min/ XILOL II – 30 min). Após a imersão em xilol, os cassetes® são finalmente imersos em parafina líquida acondicionada em estufa 60°. Deve-se observar os tempos e os 2 diferentes compartimentos. (PARAFINA I - 30 min / PARAFINA II - 30 min). Ao final deste processo, os cassetes foram abertos, os cólons e fígados retirados e colocados em parafina em forma própria para secagem final e formação de blocos de parafina contendo os órgãos em questão. Acondicionou-se os blocos por 24h para secagem. Após este período, os blocos são desenformados e acondicionados em freezer. Os

blocos de parafina, contendo os tecidos incluídos, são seccionados pela navalha de aço do micrótomo, obtendo-se geralmente cortes de 6 µm de espessura.

A coloração é então realizada através da técnica HE, conforme descrito por Lev e Spicer (LEV; SPICER, 1964).

As análises histológicas do cólon e fígado foram feitas utilizando um processador de imagens acoplado a um microscópio óptico, como já descrito.

4.14. Preparo das Células para cultura e Citometria de fluxo

4.14.1. Meio de cultura

Foi utilizado meio RPMI 1640 Gibco BRL como meio incompleto e, como meio completo, foi utilizado RPMI 1640 enriquecido com 2nM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercapto-etanol, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de fungizona, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 5-10% de soro fetal bovino inativado, pH 7,2.

4.14.2. Suspensão celular do baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer

Após o sacrifício dos animais, baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer foram retirados cuidadosamente com uma pinça cirúrgica, sendo em seguida colocado em tubos Falcon de 15 ml contendo 2 ml de meio de cultura incompleto, no caso dos baços, ou completo, no caso dos linfonodos e placas de Peyer, e mantidos em gelo até o plaqueamento das células. O baço foi então macerado com um macerador de vidro estéril, na mesma solução em que se encontrava e, depois de macerado, a solução foi transferida novamente para os tubos Falcon de 15 mL. Os linfonodos foram macerados com auxílio de lâminas estéreis friccionando-as uma contra a outra em 2mL de meio RPMI completo em uma placa de Petri também estéril.

Em seguida os tubos foram centrifugados a 300g, por 10 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, no caso dos linfonodos e placas de Peyer, o sedimento ressuspensionado em 500 µL de meio completo. Nos tubos contendo células do baço adicionou-se, a cada tubo, 9 ml de água bidestilada estéril e 1 ml de PBS concentrado 10x, afim de hemolisar as hemácias restantes no sedimento. A suspensão foi centrifugada novamente a 1200 rpm, por mais 10 minutos, a 4°C. O

sobrenadante foi novamente desprezado e o concentrado celular foi ressuspensionado em 1000 µl de meio incompleto, para fazer a contagem de células.

4.14.3. Contagem de células

Inicialmente, a suspensão celular foi diluída 100 vezes, no caso do baço e 50 vezes no caso dos linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, para contagem. Para a marcação de células inviáveis (mortas) foi utilizado o corante eritrocina, e essas células não foram contadas. Cinquenta µl dessa suspensão celular foram misturados a 50 µl de eritrocina. Posteriormente, as células foram colocadas na Câmara de Neubauer para contagem em microscópio óptico. Após contar as células não-coradas (viáveis), o número de células foi expresso de acordo com a fórmula: $n^\circ \text{ de células/ml} = [(células \text{ viáveis} \times diluição \times 10^4) / n^\circ \text{ campos contados na Câmara de Neubauer}] \times \text{volume inicial da suspensão celular}$.

A partir do número de células obtidas, as concentrações das suspensões foram todas padronizadas pela adição do volume necessário de RPMI completo para se obter 10^7 células/mL para o FACS e 10^6 células/mL para cultura celular.

4.14.4. Linfócitos da lâmina própria

O intestino delgado foi removido e lavado com 20 mL de HBSS gelado. Toda gordura aderida e as placas de Peyer foram cuidadosamente removidas. Os intestinos foram abertos longitudinalmente e cortados em pedaços de 0,5-1,0 cm. Os pequenos pedaços foram colocados em tubos de centrífuga de 50 mL com 20 mL de HBSS gelado e mantidos no gelo. Os intestinos foram filtrados e lavados por três vezes com HBSS gelado. A seguir foram incubados com 25 mL de meio IEL por 30 minutos em *shaking* (150/m) a 37°C. Os tubos foram submetidos à agitação mecânica por cerca de 30 segundos para que toda a camada de células epiteliais fosse liberada. O conteúdo de todos os tubos foi filtrado em redes de 70µm. Os pequenos pedaços de intestino restantes foram incubados com 10 mL de colagenase do tipo II (100U/mg) a 37°C por 30-40 minutos em *shaking* (150/m). Os intestinos foram novamente filtrados em redes de 70µm e 30 mL de meio IEL foram acrescentados. O conteúdo foi então centrifugado a 300g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 4,5mL de percol a 44% em um tubo de centrífuga de 15 mL. Cuidadosamente

2,3mL de percol a 66% foram adicionados ao fundo do tubo para que se obtivesse um gradiente de concentração. Duas fases foram claramente vistas e delimitadas. Os tubos foram centrifugados a 600g por 20 minutos a 20°C. As frações de linfócitos foram vistas em um anel na interfase de 44-66% de percol. Os linfócitos foram retirados com uma pipeta de 2 mL e colocados em um novo tubo de 15mL. O meio IEL foi adicionado até o volume de 12 mL e o tubo foi centrifugado a 300g por 5 minutos a 4°C. O *pellet* foi então ressuspensionado a 200 µL e as células foram contadas e submetidas a marcação celular para citometria de fluxo.

4.14.5. Cultura de células e coleta do sobrenadante da cultura

As células de baço e linfonodos mesentéricos foram plaqueadas (500 µL/poço) em placas de 24 poços (Falcon, Lincon Park) e incubadas por 72 horas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ com mais 500 µL de RPMI completo (controle negativo) ou RPMI mais 500 µL de solução do mitógeno Concanavalina A (2 µg/ml) como estímulo.

4.15. Preparação das células e Aquisição no citômetro de fluxo

O plaqueamento para leitura no citômetro de fluxo foi feito em uma placa de 96 poços de fundo em U, na qual foram colocados 25 µl de suspensão celular e 10 µl de anticorpos (na diluição padronizada) conjugados com fluorocromos – PE(ficoeritrina), FITC (fluoresceína) ou CyChrome 5 – que se ligam às moléculas de interesse, tais como, CD4, CD25, CD3, expressas nas células de camundongos. Nesse trabalho, as moléculas de interesse foram CD4, CD8, CD25, CD69, CD19, CD5 e FoxP3.

As placas foram então incubadas a 4°C durante 30 minutos, decorrido este tempo foi então acrescentado 200 µl de PBS azida por poço para retirada do excesso de anticorpos da placa, foram então centrifugadas a 4 °C durante 10 minutos a 300g. Esta lavagem foi realizada por três vezes. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O sedimento foi, então, ressuspensionado em 200 µl de fixador paraformaldeído 4% e as suspensões armazenadas a 4°C e protegidas de luz até aquisição em citômetro de fluxo.

No caso de anticorpos que não estavam marcados diretamente com fluorocromo (ex: conjugados com biotina), após a primeira lavagem as células foram incubadas com

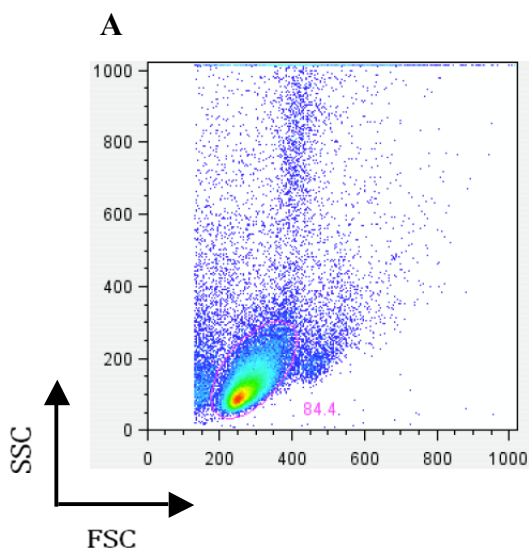
10 μ l de solução contendo estreptavidina conjugada ao fluorocromo durante mais 30 minutos e posteriormente foram realizadas mais duas lavagens e as células foram então fixadas em paraformaldeído para aquisição.

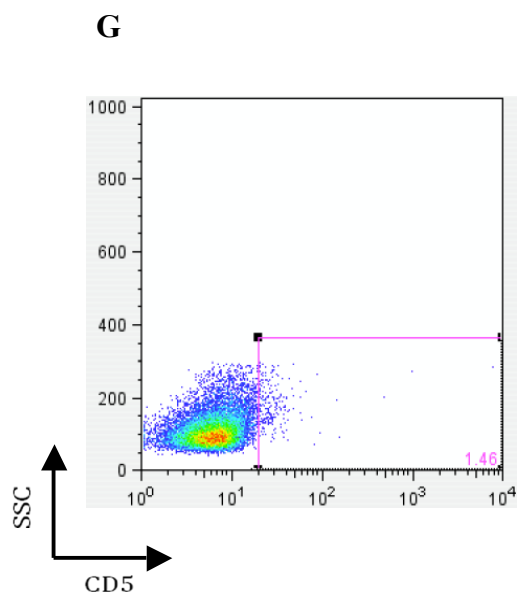
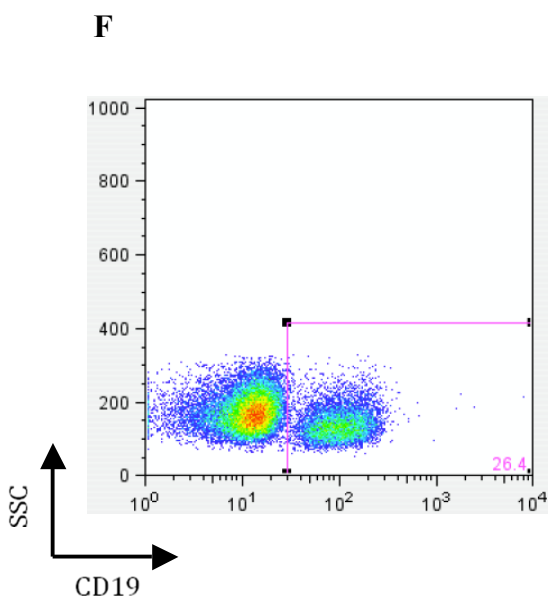
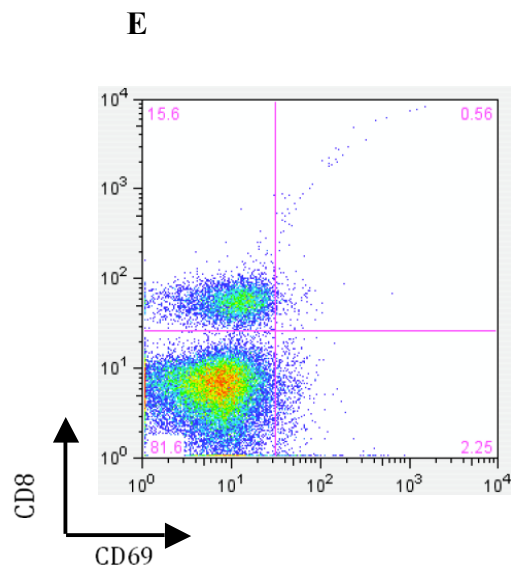
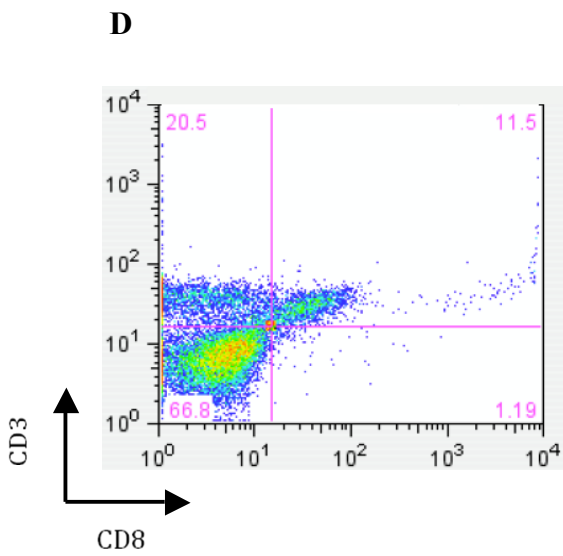
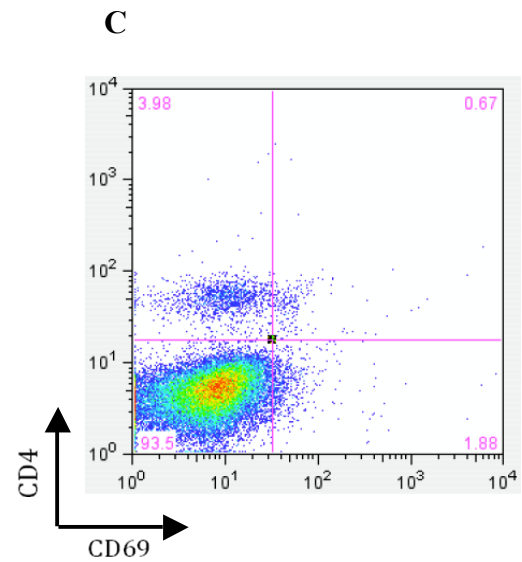
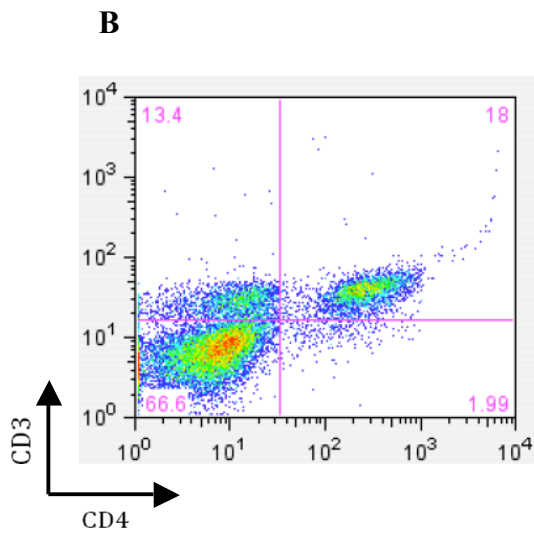
Em todos os órgãos foram utilizados os anticorpos IgG2a-FITC, IgG2a-PE e IgG2a-Cy5 como controle negativo.

Foram feitas triplas marcações com os anticorpos anti-CD3/anti-CD4/anti-CD8, anti-CD4/anti-CD8/anti-CD69, anti-CD4/anti-LAP/FoxP3-GFP e dupla marcação com anti-CD19/anti-CD5.

A análise dos dados foi realizada utilizando um citômetro de fluxo FACScan de três cores (Becton Dickison, Mountain View, Califórnia). A percentagem de células positivas foi analisada através do *software* Flow Jo.

A seguir estão representados os *gates* utilizados nas análises para todos os órgãos (Fig. 8).





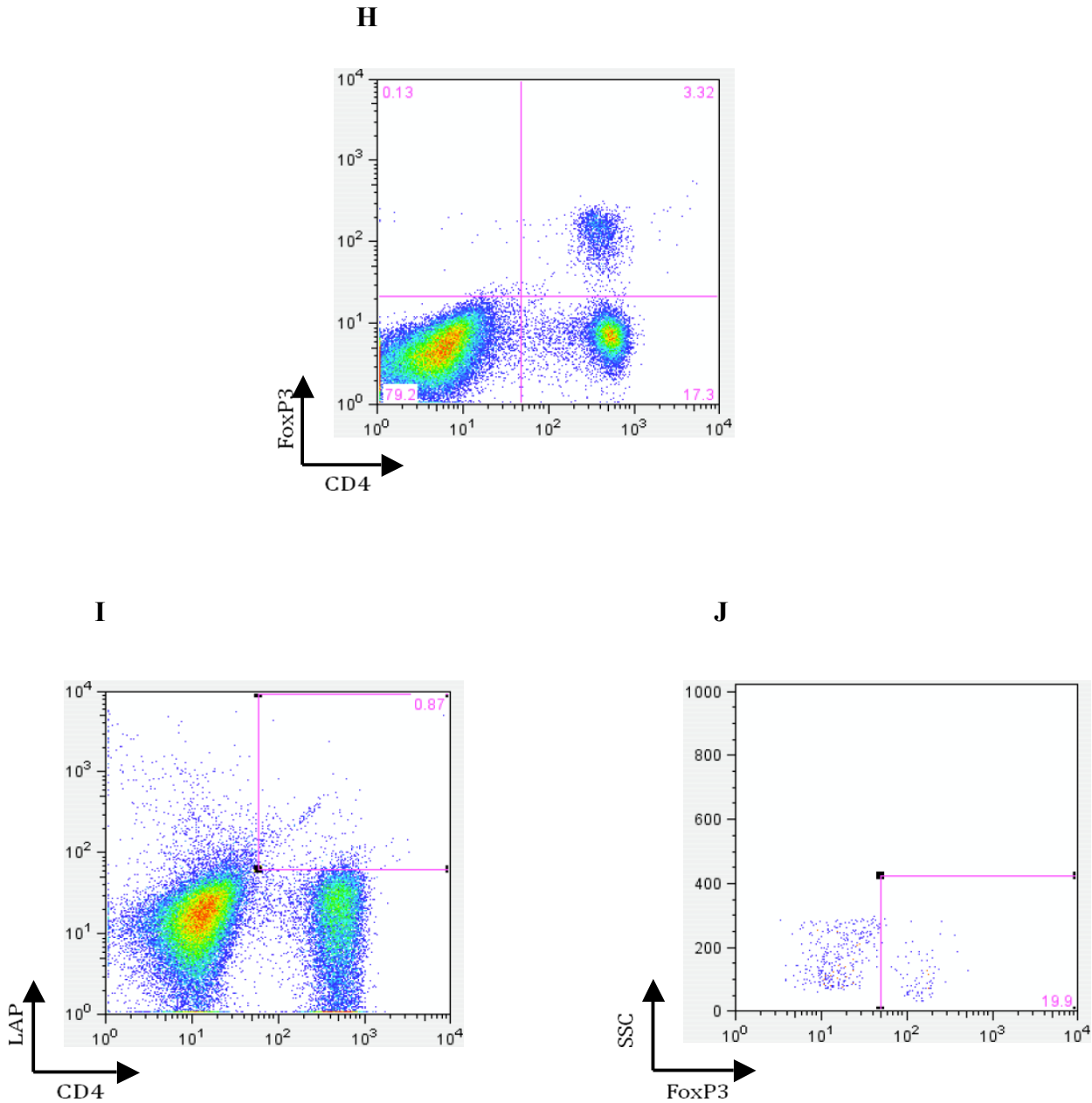


Figura 8– Análise de linfócitos do baço por citometria de fluxo. A Figura (A) representa um perfil celular de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de linfócitos. A Figura (B) representa FL1 (CD3-FITC) *versus* FL2 (CD4-Cy5) dentro da população de linfócitos totais. Em (C) está representada a população dos linfócitos T CD4 ativados FL1 (CD4-FITC) *versus* FL2 (CD69-Cy5). A Figura (D) representa os linfócitos T citotóxicos, FL1 (CD3-FITC) *versus* FL2 (CD8-PE) e a população ativada desses linfócitos está representada em (E) com FL1 (CD8-PE) *versus* FL2 (CD69-Cy5). A Figura (F) mostra os linfócitos B SSC *versus* FL2 (CD19-PE) e em (G) as subpopulações de linfócitos B, B1 e B2, dentro de CD19+, SSC *versus* FL2 (CD5-FITC). Por fim temos a população de células reguladoras, representada em (H) com FL1 (FoxP3-GFP) *versus* FL2 (CD4-PE). A Figura (I) representa a outra população de células T reguladoras FL1 (LAP-Cy5) e (CD4-PE) com (J) FoxP3-GFP dentro da população CD4+LAP+.

4.16. ELISA para determinação da concentração de citocinas

Para determinar a presença de citocinas nos órgãos de interesse foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA.

As placas de 96 poços (*Nunc-Immuno Plates MaxiSorp*) foram sensibilizadas com 100 µl/poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra INF- γ , IL-10, IL-6 e TGF- β , diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C.

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

No terceiro dia, as placas foram novamente lavadas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com 100 µL/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para IFN- γ , IL-10 (BD Pharmingen) e TGF- β (R&D SYSTEMS) marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/mL. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (100 µL/poço) (Southern Biotechnology Associate Inc.) foi adicionada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

A reação enzimática foi então revelada incubando-se as placas, no escuro, com uma solução contendo 0,2 µL/mL de H₂O₂ e 0,4 mg/mL de ortofenileno-diamino (OPD) em tampão citrato pH 5,0 até o desenvolvimento de uma coloração amarelo-escuro. Após essa etapa, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico a 2N. A absorbância ($\lambda = 492$ nm) de cada poço foi obtida pelo leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader). Os valores das absorbâncias foram convertidos em ng/mL baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes, utilizadas como padrão.

4.17. Quantificação das concentrações de lipídes hepáticos pelo método FOLCH

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método FOLCH (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957).

Em suma, 100 mg de fígado foram triturados em homogeneizador de tecidos com 1900µl de solução de clorofórmio: metanol (2:1). Adicionou-se 400 µl de metanol aos tubos, que foram então centrifugados por 10 min a 600g. O sobrenadante foi

recolhido em tubo de ensaio de vidro previamente pesado e, posteriormente, foi acrescentado 800 µl de clorofórmio e 640 µl de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 min a 3000 rpm, a fase superior foi desprezada. A parede interior de cada tubo foi lavada 3 x com 600 µl de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,29%). Os extratos lipídicos obtidos foram deixados secar em estufa overnight a 37° C e os lipídeos foram quantificados.

4.18. Medida de colesterol e triglicérides hepáticos

Para a medida de colesterol e triglicérides hepáticos os extratos lipídicos foram homogeneizados com 500 µl de isopropanol e as determinações das concentrações de colesterol total foram feitas conforme descrito para as amostras de soro.

4.19. Análise Estatística dos Dados

A significância estatística dos dados obtidos para os grupos será analisada por meio da utilização do teste de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, a fim de comparar os grupos experimentais. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

O programa utilizado na análise dos dados foi o GraphPad Prism versão 5.

4.20. Soluções Utilizadas

A. Soluções para preparação celular

PBS 10x – pH 7,2

80,00 g de NaCl;

2,00 g de KCl;

21,70 g de Na₂HPO₄;

2,00 g de KH₂PO₄;

1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Salina 10x

85 g de NaCl;

1000 mL de água bidestilada ou deionizada

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

100 mL da solução salina 10X;

900 mL de água bidestilada ou deionizada;

Filtrada em fluxo laminar ou autoclavada

RPMI 1640 incompleto - pH 7,3

16,2g RPMI 1640 (Gibco)

2 g de NaHCO₃

3,6 g/L de HEPES

1000 mL com água milli-Q.

Filtrado em fluxo laminar e conservado em 4°C

RPMI 1640 completo

450 ml de meio RPMI incompleto;

50 mL de soro fetal bovino;

5 mL de solução de aminoácidos não essenciais (100X - 10mM);

5 mL de solução de piruvato de sódio (100X - 100mM) ou 55 mg de piruvato de sódio;

5 mL de L-glutamina (100x - 200 mM);

0.450 mL de 2-mercaptoetanol.

2,5mL de gentamicina (5mg/mL);

1,5mL de fungizona

B. Soluções usadas no teste de ELISA (diluídas em água bidestilada ou deionizada)

Tampão Carbonato pH 9,6 (*Coating Buffer*)

1,86 g de Na₂CO₃;

2,93 g NaHCO₃ - 0,035M;

1000 mL de água destilada ou deionizada

Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

NaCl 0,0015M

KCl 0,0081M

Na₂HPO₄ x 7 H₂O 0,1369M

KH₂PO₄ 0,0027M

PBS-caseína 25%

Tampão fosfato pH 7,2

2,5 g de caseína.

1000 mL de solução PBS 1x

Salina fisiológica

NaCl 0,85%

Salina-Tween 10x

85 g de NaCl;

5 mL de Tween 20;

1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Tampão Citrato pH 5

13,41 g de Na₂HPO₄

5,19 g de Ácido cítrico (C₆H₈O₇)

1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Solução de ácido sulfúrico 2N

53,24 mL de H₂SO₄

1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Solução do substrato (por placa)

OPD: 4 mg

H₂O₂: 2 µl

Tampão citrato pH 5: 10 mL

C. Soluções usadas na marcação fenotípica de linfócitos

PBS-azida

Tampão fosfato pH 7,2
0,1 g de azida sódica
1000 ml de PBS 1X

HBSS

Tampão fosfato pH 7,3
0.4 g de KCl
0.06 g de KH₂PO₄
0.35 g de NaHCO₃
8.0 g de NaCl
0.04788 g de NaHPO₄
1.0 g de D-glicose
0.011 g de vermelho de fenol
1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Meio IEL

1000 ml RPMI
20 ml de soro fetal bovino
20 ml 1M Hepes buffer
10 ml penicillin/streptomycin 100x
0.50 ml gentamicina (40 mg/ml)

D. Soluções de FOLCH

Solução de FOLCH

3 mL clorofórmio
48 mL metanol
2 mL NaCl a 0,2%
47 mL água destilada

5. RESULTADOS

5. Resultados

Nesse estudo, examinamos os efeitos da suplementação e da deficiência de Vitamina A em camundongos saudáveis (apresentados na Parte I) e em camundongos portadores de colite induzida pela administração oral de dextran sulfato de sódio (apresentados na Parte II).

No nosso trabalho, na parte do perfil celular, as populações de células T e B foram analisadas em porcentagem, pois essa forma ficou bem representativa da quantidade de células. Para as duas subpopulações de células T reguladoras houve necessidade de serem apresentadas em número absoluto, pois a porcentagem estava mascarando o resultado real.

5.1. Parte I – Efeitos da vitamina A em animais sem indução de doença

5.1.1. Peso dos animais durante as 8 semanas de dieta

O primeiro parâmetro analisado foi o efeito das diferentes dietas (controle, deficiente ou suplementada com vitamina A) no desenvolvimento ponderal dos animais. Já foi relatado pela Organização Mundial de Saúde (SOMMER, 1998) que o crescimento e desenvolvimento de crianças que têm deficiência no consumo de vitamina A é mais lento e menor. Para verificar se o mesmo ocorria com os camundongos, o peso dos mesmos foi avaliado uma vez por semana. O resultado obtido difere do efeito descrito em humanos (Fig. 9), pois os animais que receberam dieta deficiente em vitamina A apresentaram crescimento normal em relação aos animais que receberam a dieta normal (grupo controle). Os animais que receberam dieta suplementada com 10000 UI de vitamina A também apresentaram crescimento similar ao dos animais do grupo controle, mas quando a suplementação foi com 50000 UI da vitamina, os animais tiveram um menor aumento de peso desde o início da administração da dieta.

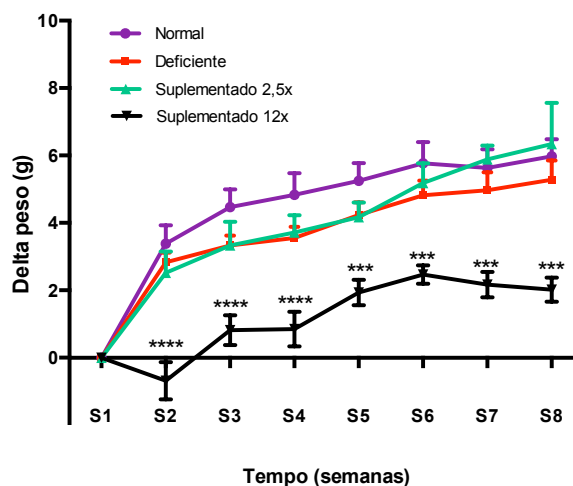


Figura 9 – Peso dos animais sem indução de doença durante as 8 semanas de dieta. Os animais foram separados após o desmame e divididos em 4 grupos (normal, deficiente, suplementado 10000 UI e suplementado 50000 UI). Cada animal foi pesado semanalmente e foi feita a diferença de peso de uma semana para a outra a média dessa diferença de peso por grupo foi analisada. A linha roxa representa o controle, a linha vermelha representa o grupo deficiente em vitamina A, a verde mostra o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A e a linha preta representa o grupo suplementado com 50000 UI da vitamina. A análise estatística é referente à comparação com o grupo controle e foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

5.1.2. Parâmetros bioquímicos

Para verificar se a suplementação com ou deficiência da vitamina A não causaria nenhum distúrbio metabólico no organismo, decidimos testar alguns parâmetros bioquímicos nos camundongos tratados com dieta deficiente ou suplementada com vitamina A. Todos os testes bioquímicos foram realizados com os animais em jejum de 8 horas.

O primeiro parâmetro bioquímico analisado foi o nível de glicose no sangue dos animais 8 semanas após o consumo das dietas específicas. Não foi observada nenhuma alteração significativa nesse parâmetro (Fig. 10A). O nível de triglicérides no soro também foi analisado e apresentou leves alterações entre os grupos. O grupo deficiente em vitamina A estava com esse parâmetro aumentado em comparação com o grupo controle. Já os animais suplementados apresentaram níveis similares aos apresentados pelos animais controle, enquanto o grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A apresentou níveis reduzidos desses glicérides, quando comparados com o grupo controle (Fig. 10B). O colesterol foi o outro parâmetro metabólico analisado e seu nível estava reduzido nos animais suplementados com 50000 UI de vitamina A em comparação com os outros grupos. Os animais deficientes em vitamina A e suplementados com 10000 UI de vitamina A não mostraram alterações em comparação com os animais controle (Fig. 10C). O HDL também foi avaliado e não apresentou alterações quando comparados todos os grupos (Fig. 10D). A última análise feita foi da atividade enzimática da γ -glutamilttransferase, uma enzima produzida pelo fígado e utilizada como medida da função hepática. Nesse caso, apenas o grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A apresentou um maior atividade sérica da enzima. Os animais de cada grupo apresentaram grande diferença na atividade dessa enzima, de um para o outro. Esse teste será realizado novamente com um maior número de animais por grupo, para confirmar esse resultado (Fig. 10E).

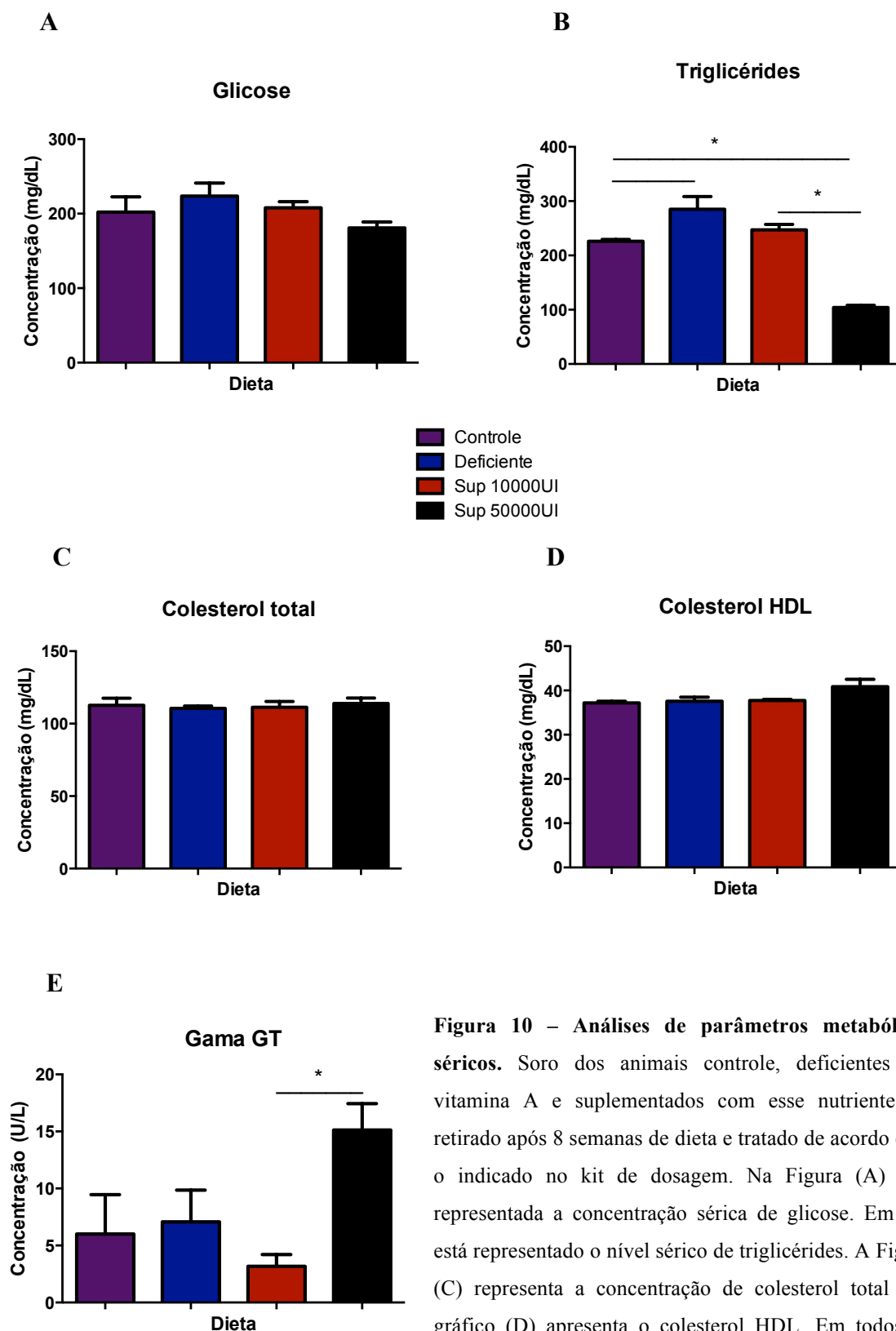


Figura 10 – Análises de parâmetros metabólicos séricos. Soro dos animais controle, deficientes em vitamina A e suplementados com esse nutriente foi retirado após 8 semanas de dieta e tratado de acordo com o indicado no kit de dosagem. Na Figura (A) está representada a concentração sérica de glicose. Em (B) está representado o nível sérico de triglicérides. A Figura (C) representa a concentração de colesterol total e o gráfico (D) apresenta o colesterol HDL. Em todos os

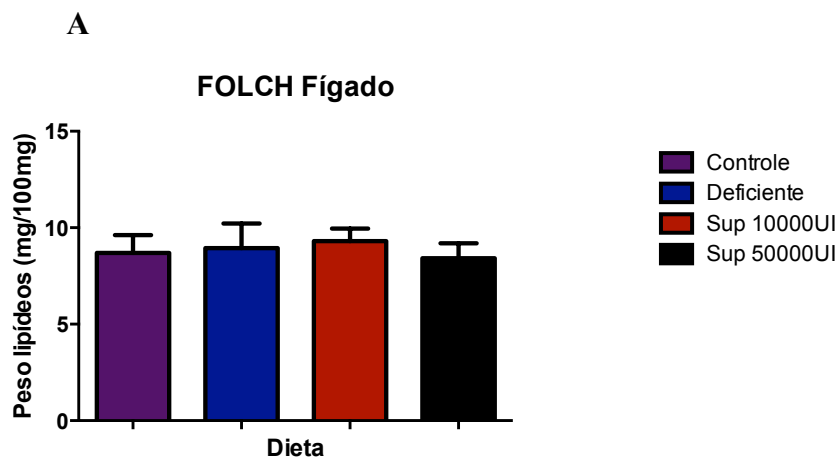
casos a unidade de medida é mg/dL. Em (E) está representada a enzima γ -glutamilttransferase. Para todos os gráficos o grupo controle está representado com a cor roxa, o deficiente com a cor azul, o grupo suplementado 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 5 animais por grupo.

5.1.3. Análise lipídica do fígado

Como a vitamina A é uma vitamina lipossolúvel e é armazenada no fígado, ficamos com receio de ocorrer esteatose hepática, que é o acúmulo de gordura nos hepatócitos. Para verificar essa possibilidade, uma amostra do fígado de cada animal foi coletada e mantida congelada até o dia de manipulação. As amostras foram analisadas pelo método proposto por Folch (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957) segundo o qual estas são tratadas com clorofórmio, metanol e NaCl nas devidas concentrações e a fração lipídica presente no tecido é separada e pesada. Posteriormente, foi acrescentado isopropanol nos tubos contendo os lipídeos extraídos e é realizada a medida de colesterol e triglicérides, para testar possíveis alterações metabólicas.

Foi observado que a quantidade total de lipídeos extraídos do fígado não sofreu alteração em nenhum dos grupos, quando os animais foram submetidos a 8 semanas de privação total de vitamina A, nem quando eles receberam suplementação dessa dieta com 10000 ou 50000 UI. Logo, mesmo a suplementação com altas concentrações de uma vitamina lipossolúvel não trouxe complicações nesse sentido (Fig. 11A).

Os testes bioquímicos mostraram que os níveis do colesterol total não sofreram alterações em nenhum dos 3 grupos, quando comparados com o grupo controle (Fig. 11B). Já no caso dos níveis de triglicérides, o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A apresentou aumento quando comparado com o grupo controle. A suplementação com 50000 UI não apresentou alterações nesse parâmetro, assim como a deficiência de vitamina A (Fig. 11C).



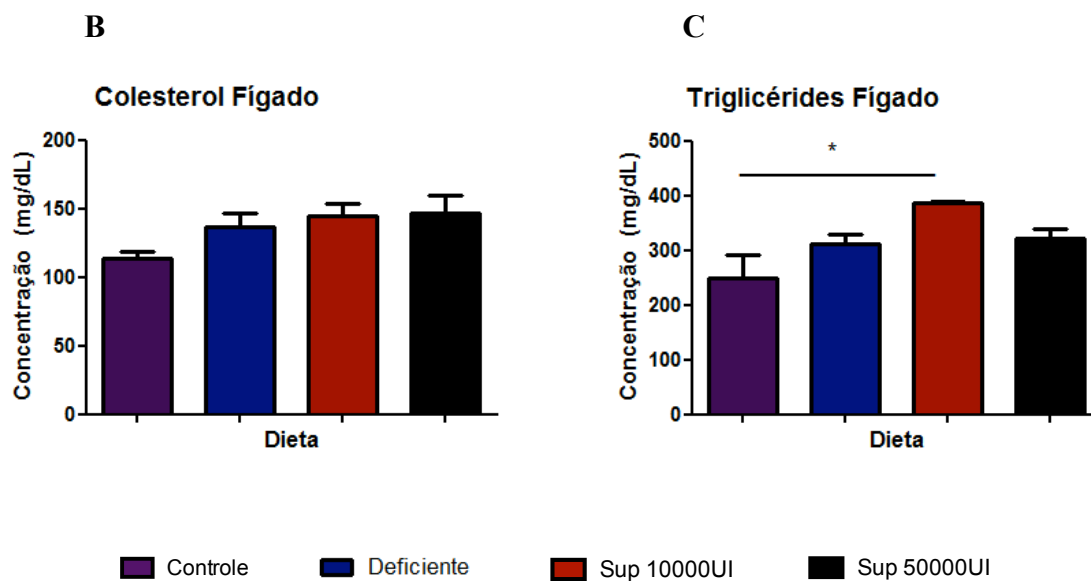


Figura 11 – Análise dos níveis lipídicos no fígado. Na Figura (A), foi realizada a técnica FOLCH. Para a análise dos níveis de lipídeos do fígado foi coletado 100mg de tecido hepático e a esse tecido foi realizado um tratamento para extração dos lipídeos. O resultado foi expresso em miligrama de lipídeo para cada 100mg do fígado. Na Figura (B) e (C) estão representadas a concentração em miligrama/decilitro do colesterol total e triglicérides do fígado, respectivamente. Em todos os casos, os grupos, tratados com vitamina A ou deficiente, foram comparados com o grupo controle (dieta normal) para realização dos testes estatísticos. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 5 animais por grupo.

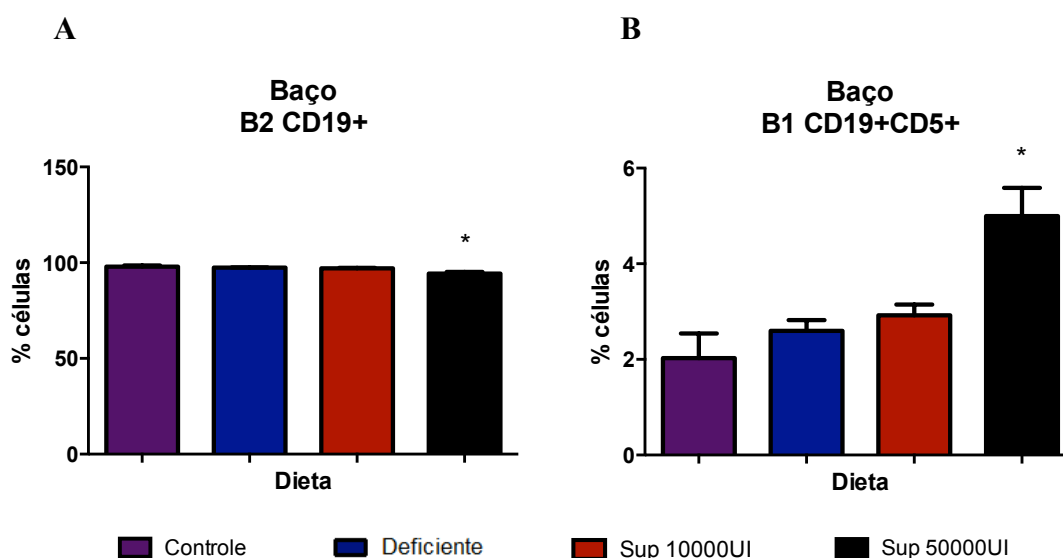
5.1.4. Perfil de células do sistema imune

Já foi descrito que a suplementação com ácido retinóico leva a algumas alterações no perfil celular do sistema imune (KIM, 2008). Dentre todas as células desse sistema, os linfócitos B e as células Treg estão entre os mais afetados por esse nutriente, devido à ação do ácido retinóico (MARUYA *et al.*, 2011); (MUCIDA *et al.*, 2007).

5.1.4.1. Perfil celular do baço

Sendo o baço um dos principais órgãos linfóides do organismo, foi feita a análise do perfil das células ali presentes pela técnica citometria de fluxo. Foram, então, analisadas as células B1 e B2, as células T CD4+, T CD8+ e as células T reguladoras.

No caso das células B foi observado um aumento na porcentagem das B1 no grupo suplementado com 50000 UI em comparação com os outros grupos (Fig. 12B), e, conseqüentemente, uma redução nas freqüências de células B2, dos animais desse mesmo grupo (Fig. 12A). As freqüências de linfócitos T auxiliares (CD4+) (Fig. 12C) e de citotóxicos (CD8+) (Fig. 12D) não sofreram quaisquer alterações em nenhum dos grupos. Para o estudo dos linfócitos T reguladores, foram analisados duas subpopulações: as células CD4+FoxP3+ e as células CD4+FoxP3+LAP+. No caso da primeira subpopulação não houve aumento significativo (Fig. 12E). As Treg LAP+, ao contrário, estavam aumentadas no grupo suplementado 10000 UI (Fig. 12F).



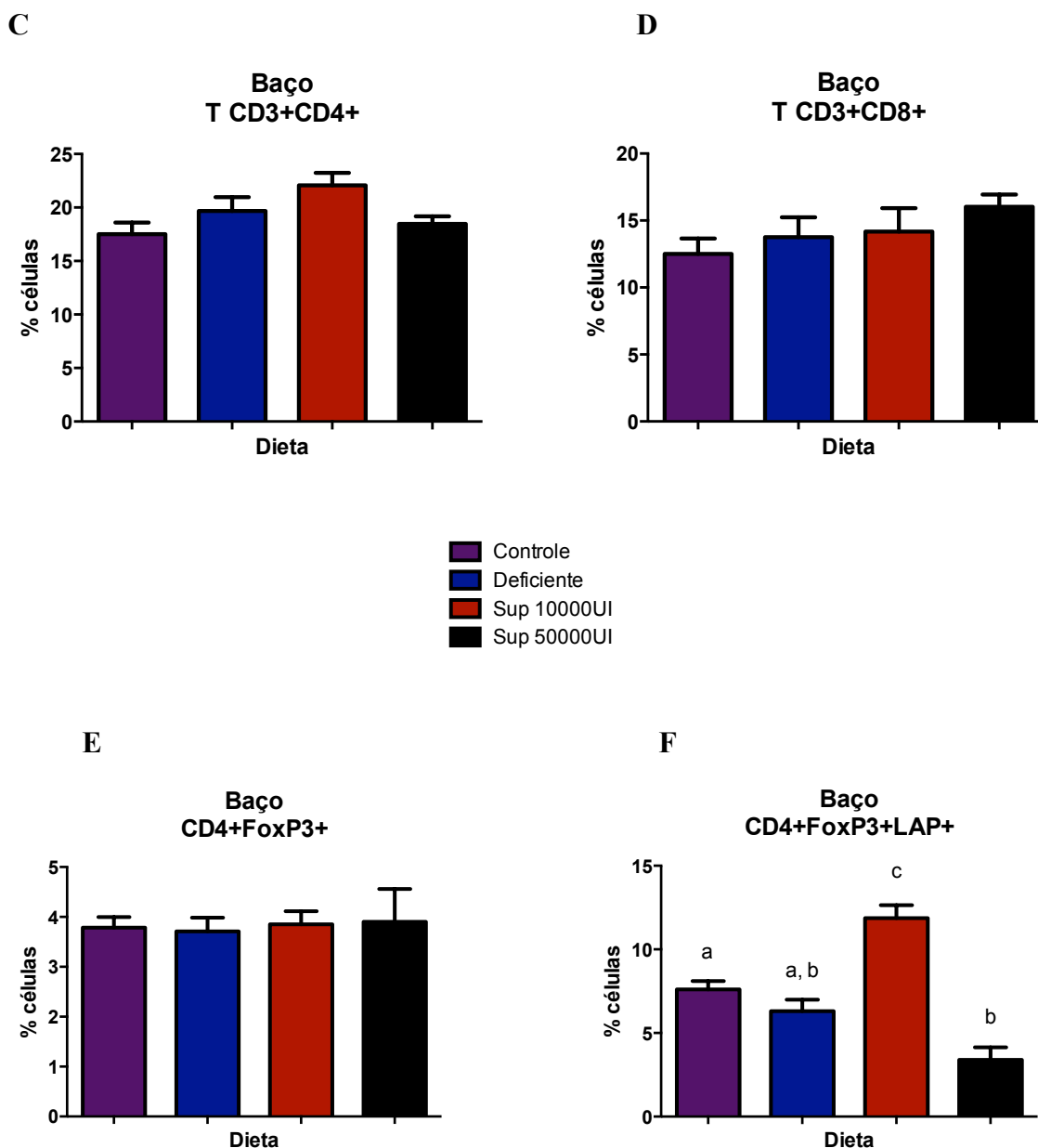
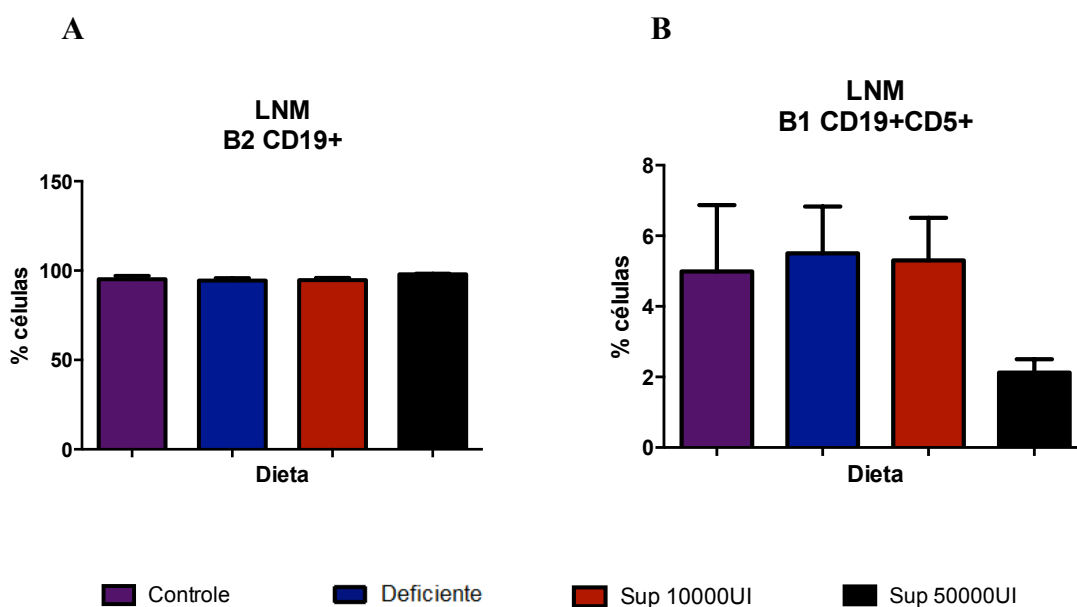


Figura 12 – Perfil das células do sistema imune no baço. Os animais tratados por 8 semanas com ou sem vitamina A, assim como os animais controle foram sacrificados e o baço retirado para análise por citometria de fluxo. Na Figura (A) está representada a população de linfócitos B2, marcadas com anticorpo CD19. A Figura (B) representa os linfócitos B1, marcados com anticorpos CD19 e CD5. O gráfico em (C) representa a população de linfócitos T auxiliares, marcados com anticorpos CD3 e CD4. A Figura (D) mostra o resultado dos linfócitos T citotóxicos, marcados com anticorpos CD3 e CD8. As células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP geneticamente (E) e a outra subpopulação também foi marcada com anticorpo anti-LAP (F), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos, o grupo controle está representado com a cor roxa, o deficiente com a cor azul, o grupo suplementado 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.1.4.2. Perfil celular do linfonodo mesentérico

Como os linfonodos mesentéricos são os linfonodos drenantes do intestino, consideramos fundamental avaliar seu perfil celular. As mesmas populações analisadas no baço foram analisadas nesse órgão.

Nos animais saudáveis, os linfócitos B dos linfonodos mesentéricos não apresentaram alterações. Houve um leve aumento nos linfócitos B2 no grupo suplementado 50000 UI (Fig. 13A), e uma redução nos linfócitos B1 desse mesmo grupo (Fig. 13B), mas não foi uma diferença significativa ($p=0,2$). Pode ser que com um maior número de animais essa diferença se torne relevante, uma vez que os desvios foram altos. Os linfócitos T auxiliares também não apresentaram alterações entre os grupos (Fig. 13C), já os linfócitos T citotóxicos se mostraram levemente alterados, estando um pouco aumentados no grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A, quando comparado com o grupo suplementado 50000 UI (Fig. 13D). Porém ao comparar esse último com os animais controles, não foi observada redução. Já no caso das duas subpopulações de células T reguladoras analisados, a frequência da CD4+FoxP3+ (Fig. 13E) não sofreu alteração, já o número de células (Fig. 13G) estava aumentado no grupo suplementado com 10000 UI da vitamina. A subpopulação CD4+FoxP3+LAP+ (Fig. 13F), estava com a frequência e número de células aumentado no grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A quando comparado com os outros três grupos.



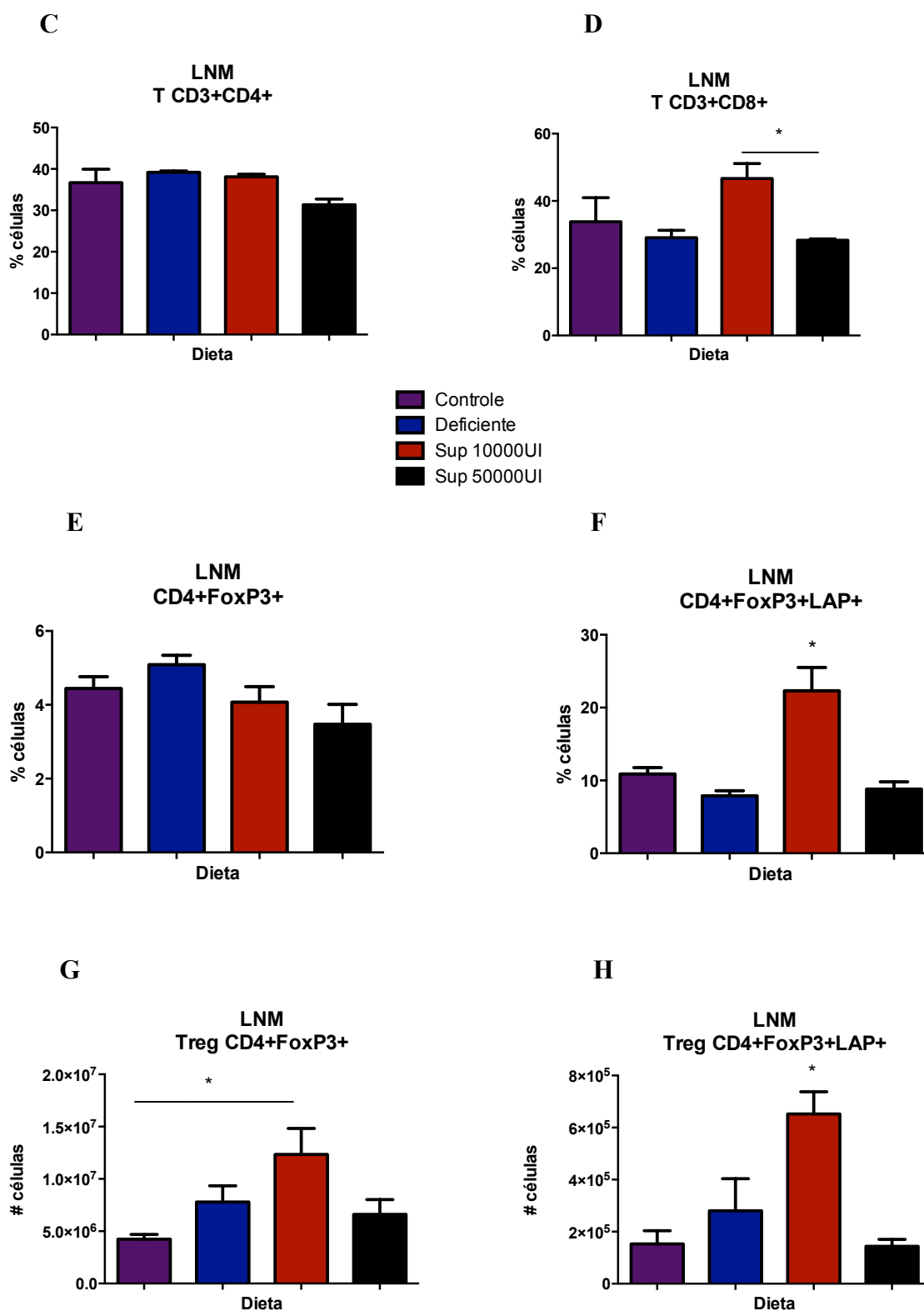


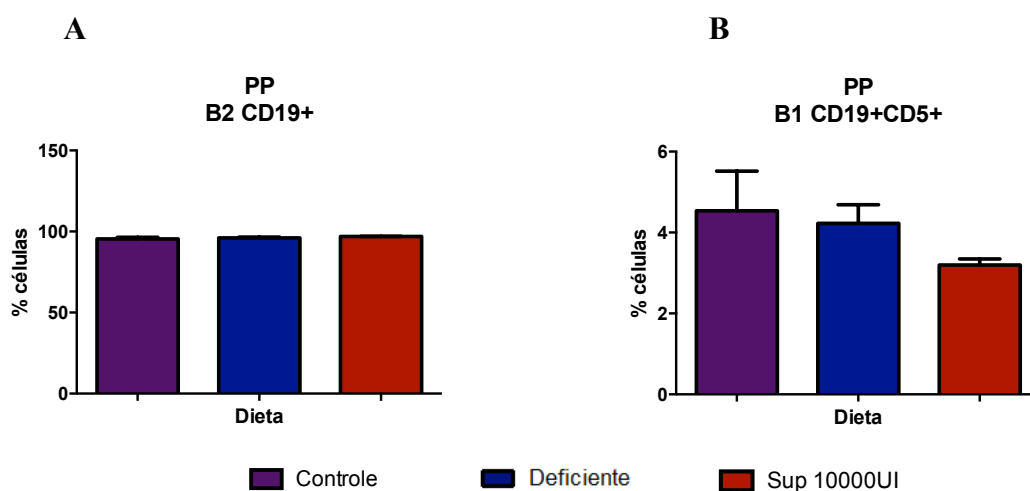
Figura 13 – Perfil das células do sistema imune nos linfonodos mesentéricos. Os animais tratados por 8 semanas com dieta deficiente ou suplementada com vitamina A (10000 UI e 50000 UI), assim como os animais controle (4000 UI de vitamina A) foram sacrificados e os linfonodos mesentéricos retirados para análise por FACS. Na Figura (A) está representada a população de linfócitos B2, marcadas com anticorpos anti-CD19. A Figura (B) representa os linfócitos B1, marcadas com anticorpos anti-CD19 e

anti-CD5. O gráfico em (C) representa a população de linfócitos T auxiliares, marcados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4. A Figura (D) mostra o resultado dos linfócitos T citotóxicos, marcados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD8. As células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP geneticamente (E) e a outra subpopulação também foi marcada com anticorpo anti-LAP (F), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos o grupo controle está representado com a cor roxa, o grupo deficiente com a cor azul, o grupo suplementado 10000 UI com a cor vermelha e o suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.1.4.3. Perfil celular da placa de Peyer

A próxima análise feita para o perfil celular foram as placas de Peyer, pela sua localização na mucosa intestinal. As células B, T e T reguladoras foram avaliadas, assim como no baço e linfonodos mesentéricos. Por problemas na realização do protocolo, não conseguimos aproveitar o experimento do grupo Suplementado 50000 UI para as células B e T efectoras. Os gráficos referentes às Treg apresentam todos os quatro grupos.

As frequências dos linfócitos B1 e B2 (Fig. 14B e 14A, respectivamente) não apresentaram alterações, assim como as frequências de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos (Fig. 14C e 14D, respectivamente). Já o número de linfócitos T reguladores CD4+FoxP3+ se mostrou reduzida nos animais deficientes em vitamina A, quando comparada com aquela dos animais controle e suplementados com 50000 UI da vitamina (Fig. 14E). Quando a análise foi feita nas Treg FoxP3+LAP+, o perfil seguiu o do baço e LNM, com aumento na frequência de células do grupo suplementado com 10000 UI da vitamina A (Fig. 14F).



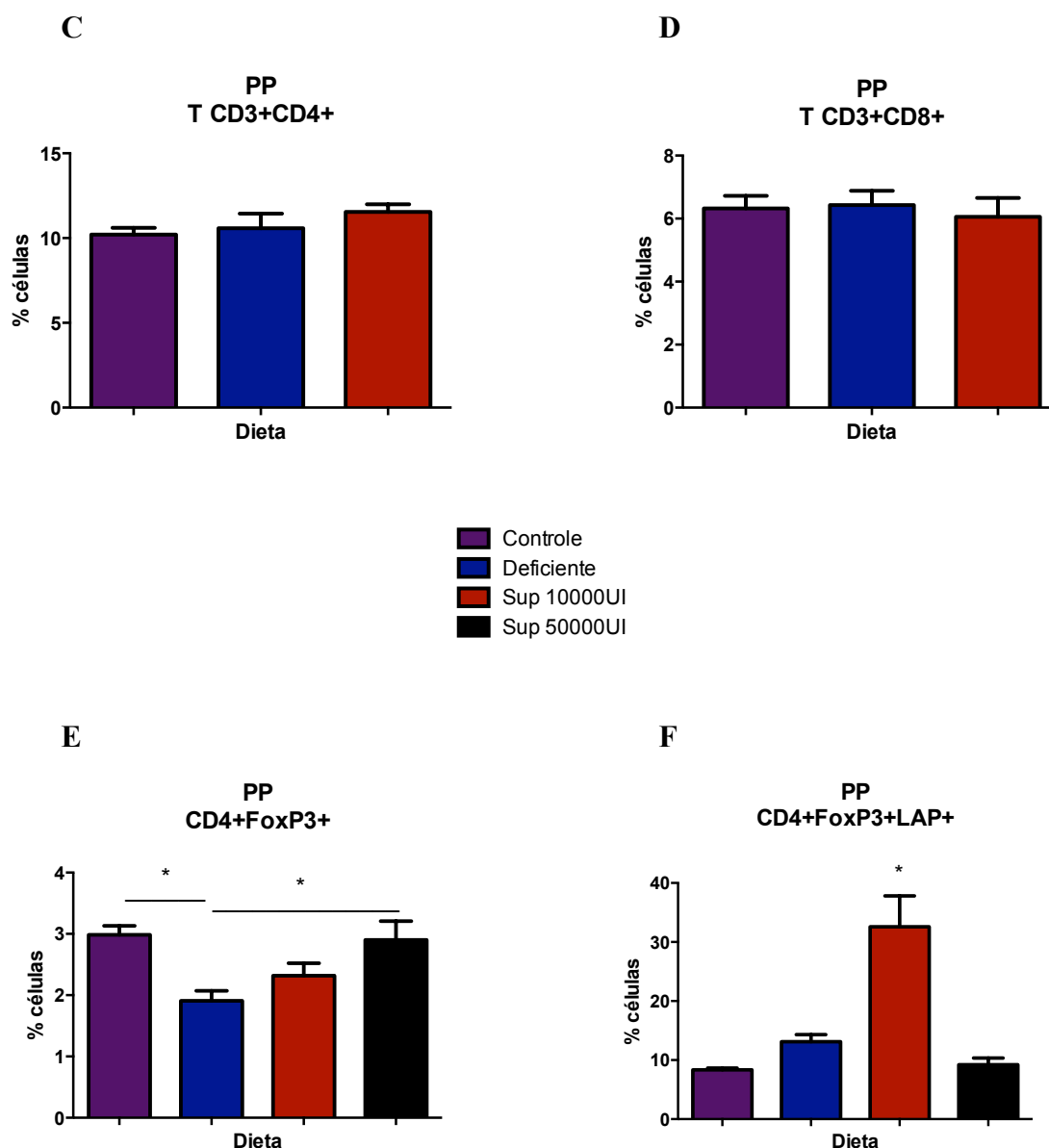


Figura 14 – Perfil das células do sistema imune nas placas de Peyer. Os animais tratados por 8 semanas com dieta deficiente ou suplementada com vitamina A (10000 UI e 50000 UI), assim como os animais controle (4000 UI de vitamina A) foram sacrificados e as placas de Peyer ao longo de todo o intestino delgado foram retiradas para análise por citometria de fluxo. Na Figura (A) está representada a população de linfócitos B2, marcadas com anticorpos anti-CD19. A Figura (B) representa o número de linfócitos B1, marcados com anticorpos anti-D19 e anti-CD5. O gráfico em (C) representa a frequência de linfócitos T auxiliares, marcados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4. A Figura (D) mostra a frequência de linfócitos T citotóxicos, marcados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD8. As células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP geneticamente (E) e a outra subpopulação também foi marcada com anticorpo anti-LAP (F), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos, o grupo controle está representado com a cor roxa, o deficiente com a cor azul, o grupo suplementado 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.1.4.4. Linfócitos T reguladores da lâmina própria

Como já foi relatado, o ácido retinóico induz a expressão da integrina $\alpha 4\beta 7$, que direciona as células para a mucosa do intestino delgado e do cólon e do receptor de quimiocina CCR9 responsável pela migração linfocitária para o intestino delgado (BENSON *et al.*, 2007). Para saber se o número de células T reguladoras na lâmina própria do intestino estava aumentada com a suplementação com vitamina A, as mesmas subpopulações de células T reguladoras foram analisadas. No caso das células CD4+FoxP3+, não houve alteração alguma em nenhum dos grupos quando comparados ao grupo controle, mas comparando com o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A, os grupos deficiente e suplementado com 50000 UI estavam aumentados (Fig. 15A). Quando a população LAP+ foi analisada, apenas o grupo deficiente apresentou um número de células aumentado, quando comparado com o controle e com o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A (Fig. 15B).

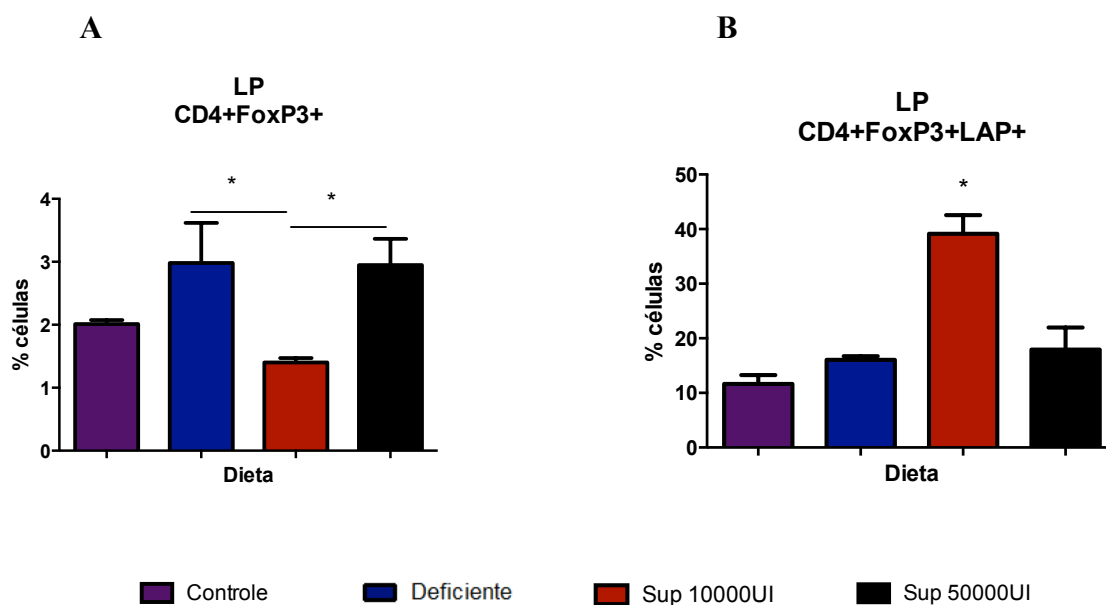


Figura 15 – Número de células T reguladoras na lâmina própria. Os animais tratados por 8 semanas com dieta deficiente ou suplementada com vitamina A (10000 UI e 50000 UI), assim como os animais controle (4000 UI de vitamina A) foram sacrificados e foi retirada a lâmina própria do cólon para análise por FACS. As células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP geneticamente (A) e a outra subpopulação também foi marcada com anticorpo anti-LAP (B), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos o grupo controle está representado com a cor roxa, o grupo deficiente com a cor azul, o grupo suplementado 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.1.5. Imunoglobulinas totais séricas (IgG, IgM, IgA) e imunoglobulina secretória (sIgA)

Já foram relatados, por diversos grupos de pesquisa, dados sobre a influência da vitamina A ou do ácido retinóico na produção de imunoglobulinas. O tratamento *in vitro* (TOKUYAMA; TOKUYAMA, 1997) ou *in vivo* (WATANABE *et al.*, 2010) de células B com ácido retinóico é capaz de induzir, nessas células, a troca de isotipo para IgA. Foi descrito por Bates em 1995 que as imunoglobulinas séricas são menos sensíveis ao tratamento com vitamina A (BATES, 1995). Como foi observado um aumento na frequência de células B1 no baço de animais suplementados com 50000 UI de vitamina A, decidimos avaliar se a simples suplementação de animais saudáveis com esse nutriente, ou se a deficiência do mesmo, levaria a alterações na produção de imunoglobulinas *in vivo*. Então, 8 semanas após o início da administração das dietas específicas, os níveis de IgG, IgM e IgA no soro dos animais, foram analisados pelo método de ELISA (Fig. 16). A única imunoglobulina secretória analisada foi a IgA, uma vez que é a mais abundante na mucosa intestinal, além de já ter sido descrito ser ela a principal afetada em animais infectados por alguns microrganismos, animais deficientes ou suplementados com vitamina A (BRANDTZAEG, 2009); (BATES, 1995).

Os níveis de IgG total apresentaram um aumento no grupo deficiente em vitamina A, quando comparado ao grupo controle (normal), assim como quando comparado aos dois grupos suplementados. Entre esses três últimos grupos não foi observada qualquer diferença (Fig. 16A).

Já os níveis de IgM e IgA séricas, assim como de IgA secretória não apresentaram alterações significativas em nenhum dos grupos (Fig. 16B, 16C e 16D, respectivamente).

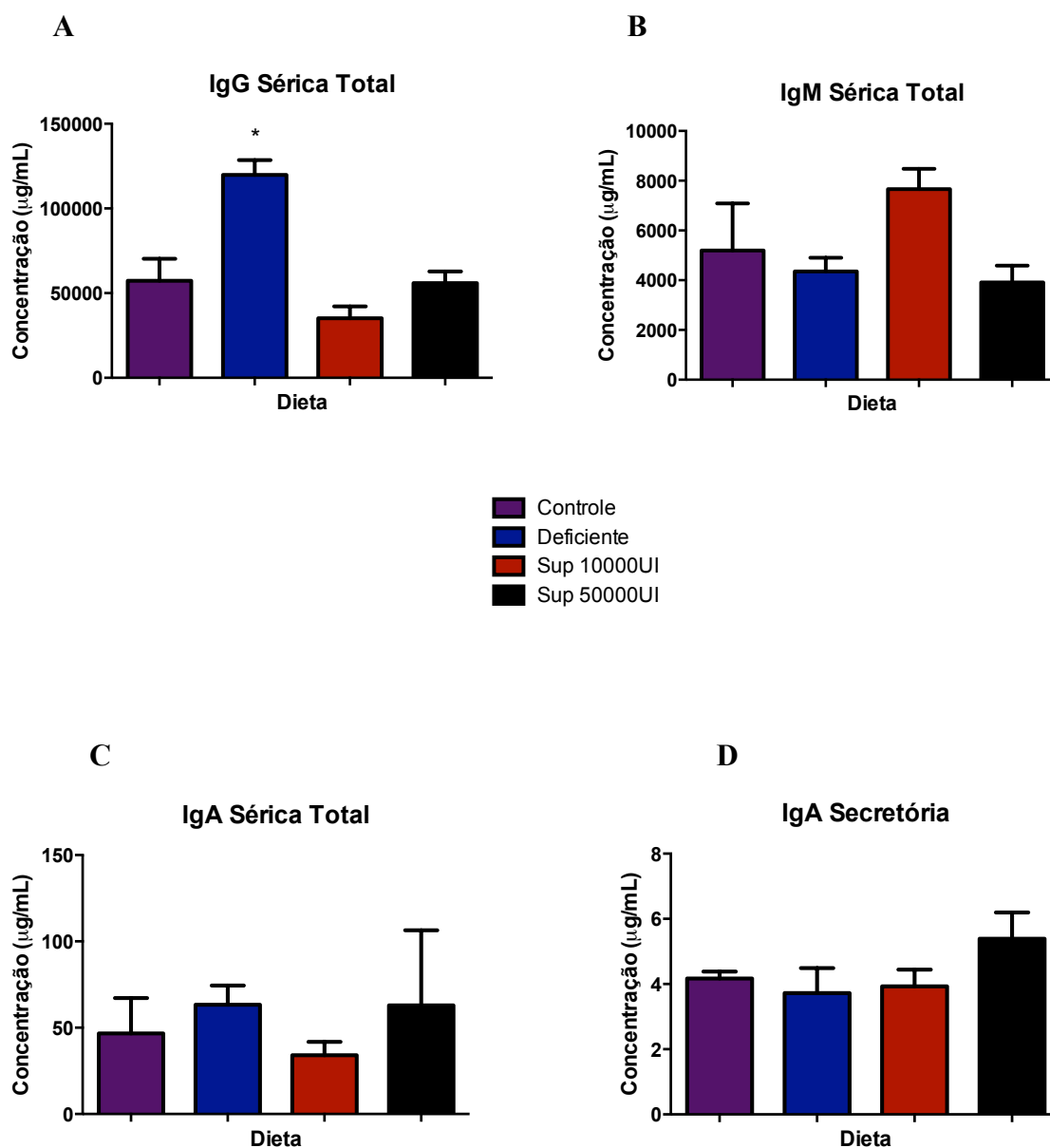


Figura 16 – Produção de imunoglobulinas totais séricas, IgG, IgM e IgA, e secretória, IgA. Para avaliar a produção de imunoglobulinas após 8 semanas das dietas específicas foi utilizada a técnica de ELISA para detecção dos anticorpos IgG, IgM e IgA do soro de animais saudáveis deficientes ou suplementados com vitamina A, assim como dos animais controle alimentados com a dieta normal. Também foram retiradas fezes de cada animal e do sobrenadante das fezes foi realizado o mesmo teste para detecção de IgA secretória. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 5-6 animais por grupo.

5.1.6. Análise da produção de IFN- γ por células do baço e linfonodo mesentérico

O interferon- γ é uma citocina pró-inflamatória, produzida por células de perfil T_{H1} . Como a vitamina A tende a diminuir respostas do tipo T_{H1} e aumentar respostas dos tipos T_{H2} e reguladoras (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008), decidimos analisar se essa citocina está aumentada nos animais sem colite, deficientes em vitamina A ou reduzida nos animais suplementados. Também foram realizados testes para medir a produção da citocina TGF- β pelas células desses órgãos, porém tais testes não detectaram níveis significativos dessas citocinas.

As células de baço e dos linfonodos mesentéricos foram colocadas em cultura com a proteína concanavalina A (ConA), que tem a propriedade de estimular populações de células T, induzindo sua proliferação (KRAUSS; BUTTGEREIT; BRAND, 1999). No caso das células de baço dos animais saudáveis, o estímulo com ConA não alterou a produção de IFN- γ em nenhum dos grupos (Fig. 17A). Já as células dos linfonodos mesentéricos apresentaram produção de IFN- γ aumentada no grupo deficiente em vitamina A quando comparada com o grupo controle (dieta normal) e suplementado com 50000 UI de vitamina A (Fig. 17B). Os dois grupos suplementados não apresentaram produção alterada em comparação com os animais controle.

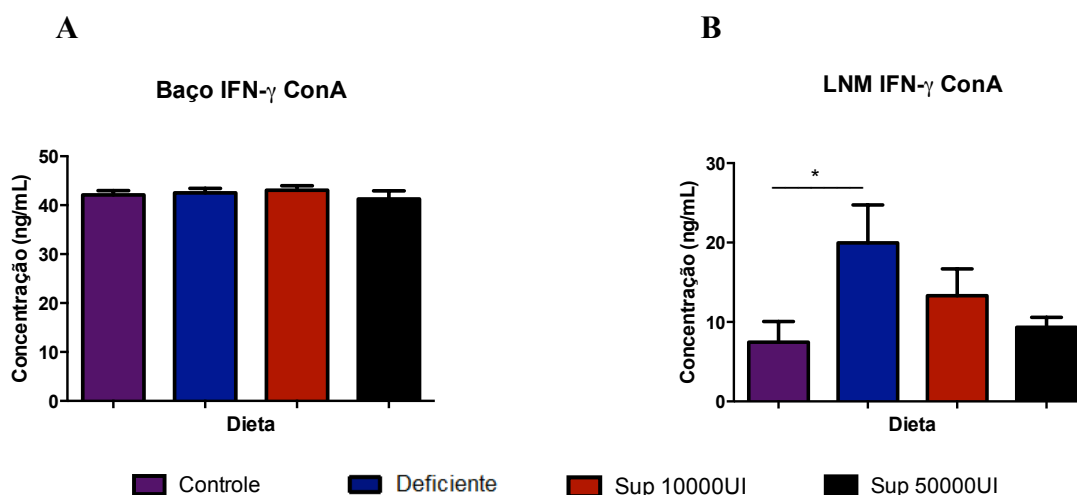


Figura 17 – Produção de IFN- γ pelas células de baço e dos linfonodos mesentéricos. Após 8 semanas de dieta, as células de (A) baço e (B) LNM foram colocadas em cultura para avaliar a produção da citocina IFN- γ . Foi adicionado ao meio de cultura $2\mu\text{g/mL}$ de ConA como estímulo para as células T. A citocina foi medida pela técnica de ELISA. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 4-5 animais por grupo.

5.2. Parte II – Efeitos da vitamina no desenvolvimento da colite experimental

Nessa segunda parte, apresentaremos os resultados da deficiência ou suplementação com vitamina A no desenvolvimento da colite induzida por DSS em camundongos.

5.2.1. Peso dos animais durante as 8 semanas de dieta

Nesse caso, o primeiro parâmetro analisado também foi o desenvolvimento ponderal dos animais durante a administração das dietas e durante o desenvolvimento da colite. Nesse caso, foram realizadas pesagens diárias durante o consumo de DSS, pois o agente químico leva a uma drástica perda de peso durante a indução da colite (WHITTEM; WILLIAMS; WILLIAMS, 2010); (CHO; CHI; CHUN, 2010). Nesse experimento, apenas o grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A aparentou diferença quando comparado com o grupo normal, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Comparando-se os grupos deficiente e suplementado 10000 UI com o grupo controle também não houve diferença no peso dos animais (Fig. 18). O peso dos animais durante a semana do DSS foi analisado separadamente e será apresentado no tópico que trata do *score* da colite.

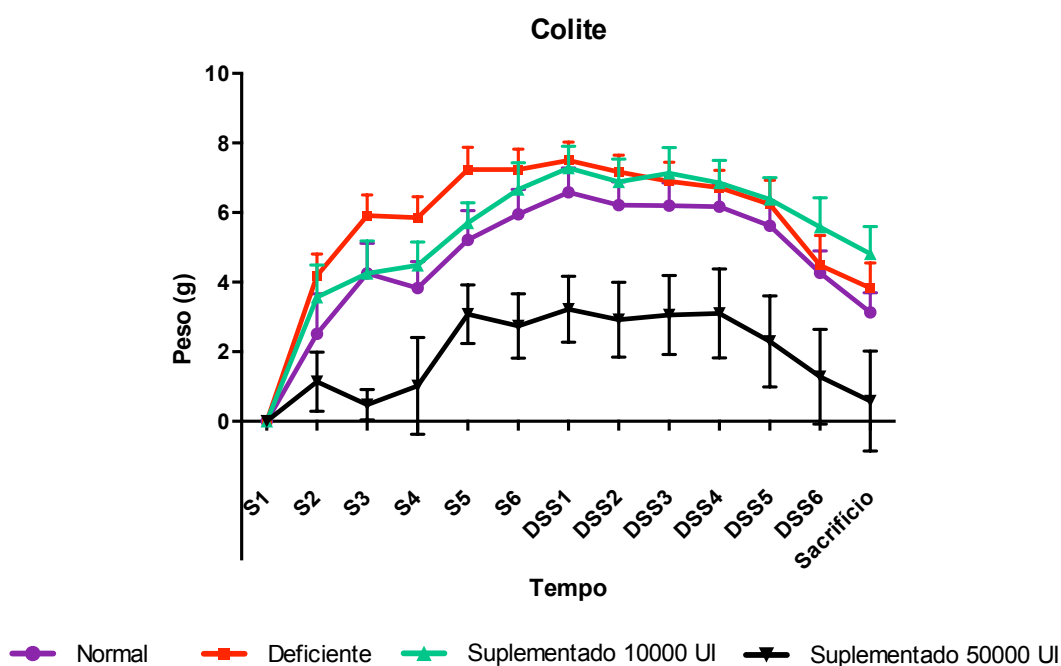


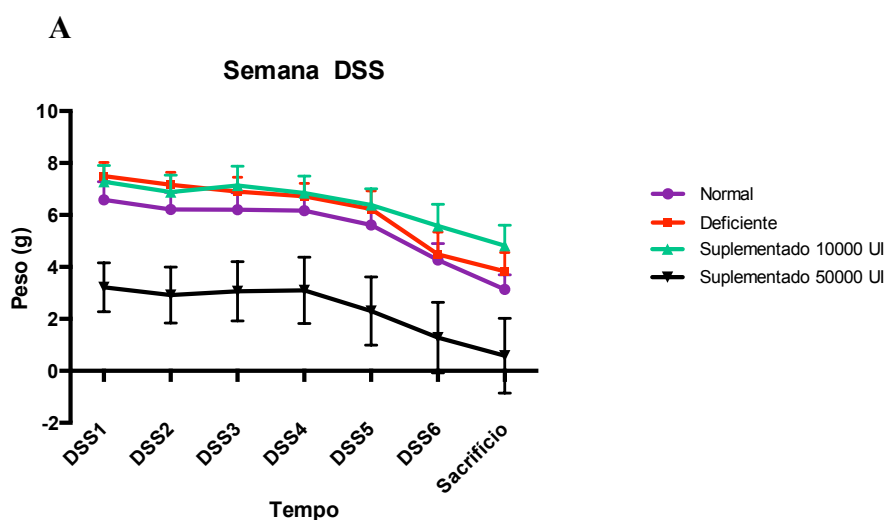
Figura 18 – Peso dos animais durante as 8 semanas de dieta e durante os dias de administração do DSS. Do mesmo modo que os animais saudáveis, estes foram separados após o desmame e divididos em 4 grupos (normal, deficiente, suplementado 2,5x e suplementado 12x). Cada animal foi pesado semanalmente, e foi feita a diferença de peso de uma semana para a outra. A média do ganho ou perda de peso por grupo foi analisada. A partir da administração da primeira dose de DSS (DSS1) até o sacrifício foram feitas pesagens diárias. A linha roxa representa o controle, a linha vermelha representa o grupo deficiente em vitamina A, a verde mostra o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A e a linha preta representa o grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Foram comparados todos os grupos com o controle.

5.2.2. Peso e consumo de DSS na indução de colite

O segundo passo foi avaliar o *score* macroscópico da colite. Nesse trabalho, foram considerados os seguintes parâmetros: perda de peso durante a semana de administração do DSS e o comprimento do cólon no fim do experimento.

Como mencionado anteriormente, o tratamento com DSS leva a uma grave perda de peso dos animais (MCCAFFERTY, 2000). Em geral, quanto mais severa a colite, maior a perda de peso. Porém no nosso experimento não foi observada diferença na perda de peso entre os grupos. Os quatro grupos analisados perderam um média de aproximadamente 4g. (Fig. 19A).

Na análise do comprimento do cólon, também não foi observada diferença significativa entre os grupos (Fig. 19B).



B

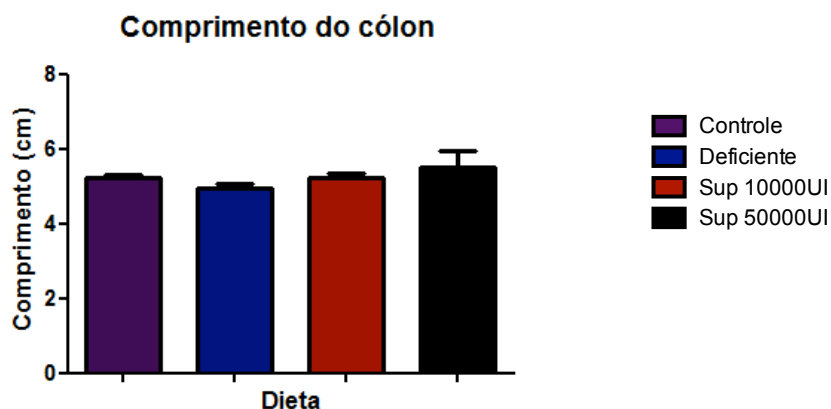


Figura 19 – Peso dos animais e comprimento do cólon em animais com colite. (A) Quando foi iniciada a administração do DSS, os animais foram pesados e, após esse dia, foram realizadas pesagens diárias dos mesmos. A linha roxa representa o controle, a linha vermelha representa o grupo deficiente em vitamina A, a verde mostra o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A e a linha preta representa o grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A. (B) O comprimento do cólon foi medido com auxílio de uma régua, antes de ser retirado o ceco. As barras representam as médias dos valores por grupo. A barra roxa corresponde ao grupo controle, a barra azul representa o grupo deficiente em vitamina A. Os animais suplementados com 10000 UI de vitamina estão representados pela barra vermelha e a barra preta corresponde ao grupo suplementado com 50000 UI do nutriente. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

5.2.3. Fotos dos animais para ilustração do estado clínico dos mesmos

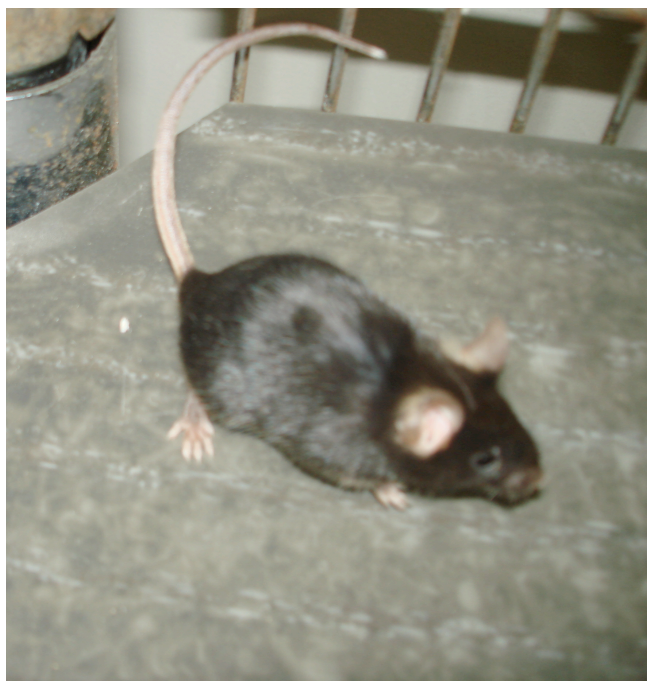
Para uma melhor compreensão do estado clínico dos animais no fim dos 6 dias de administração do DSS, os mesmos foram fotografados e filmados.

Os animais do grupo controle apresentaram colite de moderada a severa, com sangramento retal em todos os animais e diarreia. No fim do 6º dia, eles se locomoviam pouco e apresentavam-se encurvados, característica comum em animais com colite, uma vez que a mesma afeta órgãos abdominais gerando dor. Os animais deficientes em vitamina A praticamente não se locomoviam nos últimos dias de indução da colite (foi necessário que a dieta fosse colocada dentro da gaiola). Todos apresentaram sangramento retal intenso e diarreia, assim como as costas muito arqueadas. O grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A apresentou um estado clínico menos severo. Apesar de ainda apresentarem diarreia e sangramento retal, em alguns casos o sangramento era menos intenso e houve uma maior preservação da postura e atividade por parte dos animais. O arqueamento nas costas era pouco perceptível e apenas em alguns animais. Já o grupo com maior suplementação de vitamina A permaneceu com comportamento similar ao dos animais sem colite, se locomovendo e agindo normalmente. Não foi percebido arqueamento das costas, levando-se a crer que o intestino estava mais preservado.

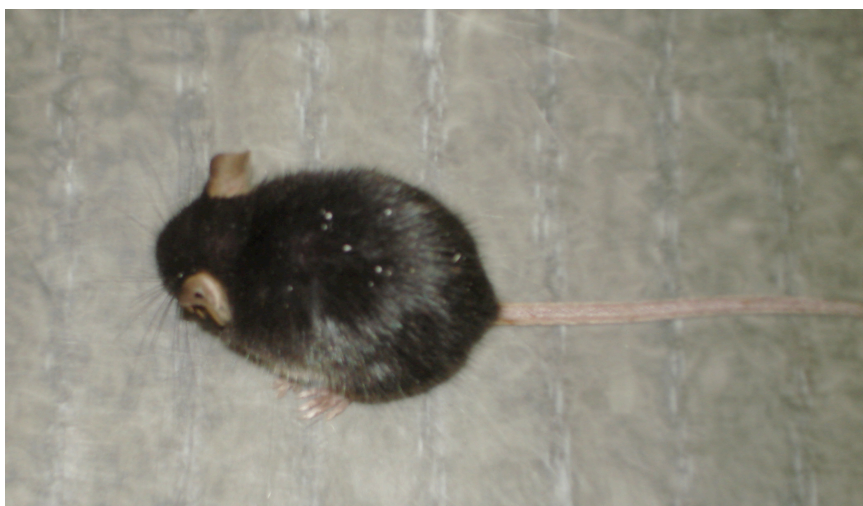
A



B



C



D



E



Figura 20 – Estado clínico dos animais no 6º dia de indução da colite. Após 6 dias de administração do DSS, os animais foram fotografados e filmados para a avaliação do seu estado clínico. Um animal controle saudável também foi fotografado e filmado para comparação. Em (A) está apresentado um animal saudável do grupo alimentado com a dieta normal. Em (B) temos um animal alimentado com essa mesma dieta controle, porém após 6 dias de indução da colite. Em (C) é um camundongo deficiente em vitamina A com colite severa. A foto (D) representa um animal suplementado com 10000 UI de vitamina A e apresentou uma colite mais branda. A última foto em (E) traz um animal suplementado com 50000 UI de vitamina A. Foi fotografado apenas um animal por grupo, a título de ilustração, e não foi feita nenhuma análise ou teste estatístico para comparar o estado clínico dos animais.

5.2.4. Consumo de DSS e do alimento durante a administração do mesmo

Como foi observada uma melhor manutenção do peso dos animais suplementados com 50000 UI de vitamina A, e como o estado clínico dos animais de ambos os grupos suplementados estava melhor que dos outros dois grupos, foi feita uma somatória do consumo de DSS durante os 6 dias de administração para cada grupo. Essa somatória nos permitiu analisar se os grupos suplementados estavam consumindo menos DSS do que os animais dos grupos controle e deficiente, o que levaria a uma menor severidade da doença, não pelo tratamento com a vitamina A, mas pelo consumo deficitário de DSS.

A dieta também foi pesada a cada três dias para verificar se o grupo deficiente, que foi o grupo que apresentou maior perda de peso, estava consumindo menos alimento e isto justificaria a perda de peso.

No caso do consumo de DSS, foi observado que o grupo deficiente consumiu menos dextran sulfato de sódio do que os dois grupos suplementados, mas não apresentou diferença quando comparado com o grupo controle (Fig. 21A).

Já foi descrito na literatura que à medida que os animais se tornam doentes pelo consumo do DSS, eles bebem cada vez menos água contendo o composto químico (OKAYASU *et al.*, 1990). Aparentemente, foi o que aconteceu no nosso caso: o grupo deficiente apresentou um estado clínico (analisado pela postura e atividade dos animais) apenas levemente pior que o grupo alimentado com a dieta normal (controle). No entanto, quando esse grupo foi comparado com os dois grupos suplementados, a diferença era muito mais pronunciada. E seguiu o padrão de consumo do DSS. Os grupos que se encontravam menos acometidos pela colite, continuaram consumindo DSS até o fim dos 6 dias de administração.

O consumo de dieta foi levemente aumentado no grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A, mas quase nenhuma diferença foi percebida entre o grupo controle com o deficiente ou com o suplementado com 50000 UI da vitamina (Fig. 21B). Nesse caso não foi realizado teste estatístico, pois os valores utilizados foram de um único experimento, a título ilustrativo.

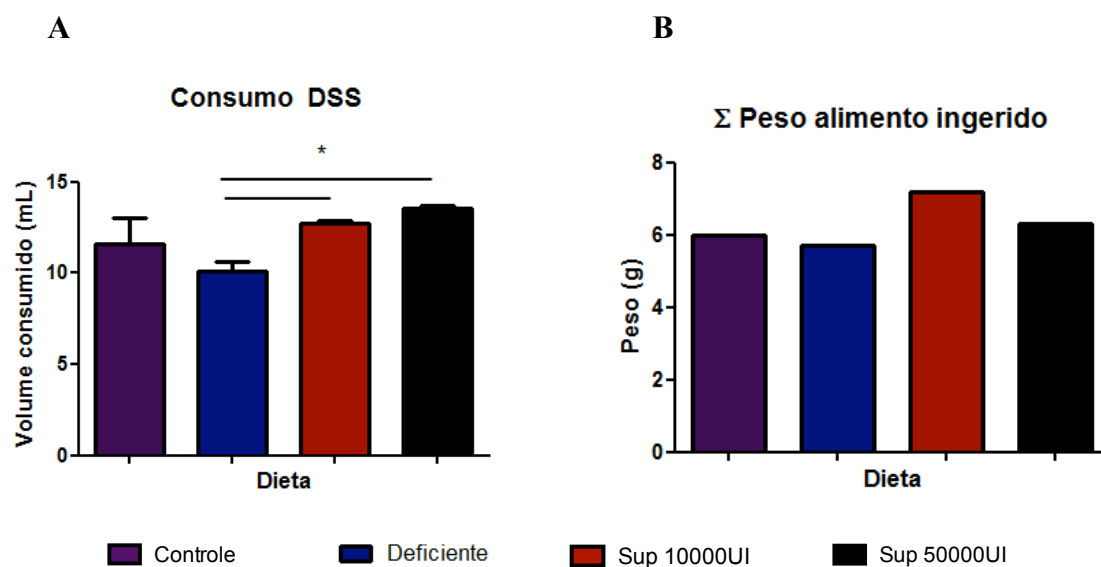


Figura 21 – Consumo médio de DSS e de dieta durante 6 dias de indução da colite. Em (A) está representado a média do consumo de DSS de três experimentos. Foi feita somatória dos 6 dias de administração do composto químico e calculada a média da somatória. No gráfico do consumo de DSS, foi realizado o teste t de *Student*. Em (B) está representado o consumo da dieta como a somatória da quantidade ingerida pelos animais durante os 6 dias de indução de colite. Nesse caso, o gráfico foi feito utilizando os valores de um único experimento, não sendo possível realizar um teste estatístico. Esse dado tem intenção de ilustrar a observação de que o consumo de dieta sofreu apenas pequenas alterações (de aproximadamente 1 grama).

5.2.5. Análise histológica do cólon

Como foi observada uma melhora significativa nos animais suplementados com vitamina A quando comparados com o grupo controle e com o grupo deficiente em vitamina A, foi feita histologia do cólon dos animais. Essa é a parte do intestino afetada pela colite induzida por DSS.

Uma mucosa normal do cólon está com arquitetura preservada, ou seja, mucosa íntegra, sem erosão ou ulceração, sem áreas de congestão, ou hemorragia e é possível visualizar as células caliciformes (indicada como 1). A camada muscular da mucosa apresenta espessamento normal e contínuo (indicada como 2) e a submucosa também está preservada, sem edema ou infiltrado inflamatório (indicada como 3). É possível visualizar a camada muscular também, abaixo da submucosa (Fig. 22A).

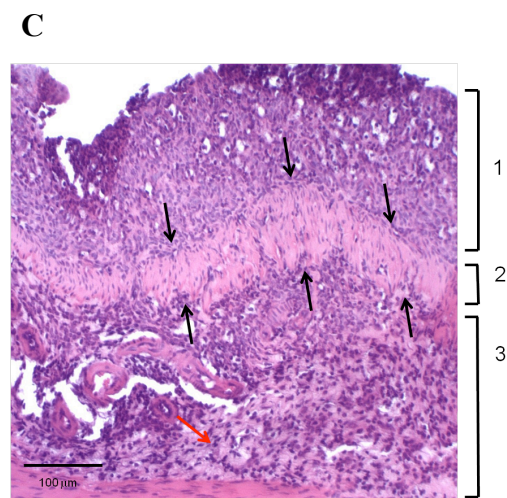
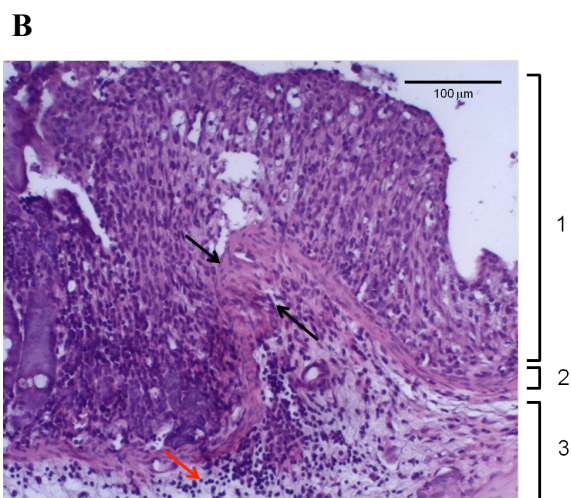
Após a administração de DSS, toda a mucosa intestinal do animal alimentado com a dieta controle apresenta-se alterada (Fig. 22B). Na camada mucosa (indicada como 1), é possível visualizar um infiltrado inflamatório, com perda total da arquitetura de criptas e ausência de células caliciformes. A muscular da mucosa (indicada como 2) apresenta poucas alterações, sem espessamento contínuo, mas com um leve espessamento na região indicada entre as duas setas pretas. A última camada que podemos visualizar é a submucosa (indicada como 3), que apresenta um infiltrado inflamatório moderado (linfócito apontado com seta vermelha) e um espessamento também moderado.

Os animais deficientes em vitamina A apresentaram a mucosa intestinal mais inflamada (Fig. 22C), com infiltrado inflamatório na camada mucosa, perda total da sua arquitetura de criptas e ausência de células caliciformes (1). A camada muscular da mucosa (2) também se apresentou alterada, com um espessamento abrupto que inicia na região entre as primeiras setas pretas à esquerda e continua até o fim do corte (toda a região espessada está entre duas setas pretas). A camada submucosa (3) apresentou intenso infiltrado inflamatório (um linfócito indicado com seta vermelha), que levou a um grande espessamento.

O grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A (Fig. 22D) também apresentou infiltrado inflamatório na camada mucosa (1), com perda da arquitetura de criptas e ausência de células caliciformes. Porém, a camada muscular da mucosa (2) se apresentou completamente inalterada, sem espessamento. A camada submucosa (3) também estava menos inflamada que nos outros dois grupos, com um infiltrado menor

de linfócitos (pontos roxos, com um indicado pela seta vermelha) e sem espessamento da camada. Neste corte também é possível visualizar a camada muscular, abaixo da submucosa.

Não foi possível fazer os cortes do tecido do último grupo, suplementado com 50000 UI de vitamina A, para histologia. Assim como a foto do cólon saudável, que foi gentilmente cedida pela professora colaboradora Denise Carmona Cara, do seu banco de dados. Foto do cólon de um animal alimentado com a mesma dieta padrão (normal) e da mesma linhagem. Foi inserida apenas para comparação com os animais com inflamação intestinal, para evidenciar a melhora no cólon do animal tratado com vitamina A, mesmo com a dosagem mais baixa. Será realizado um novo experimento para repetir as análises histológicas.



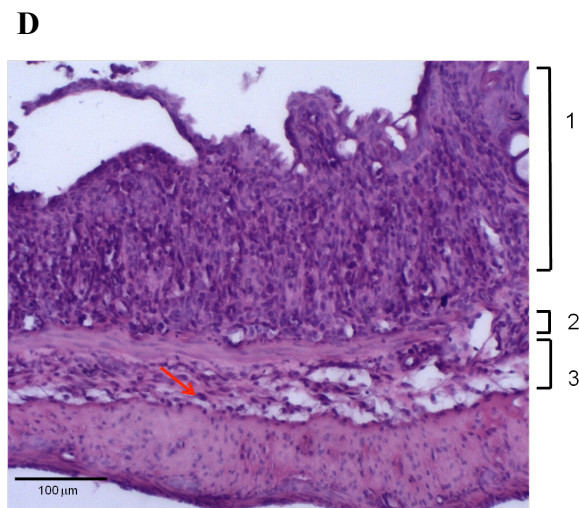
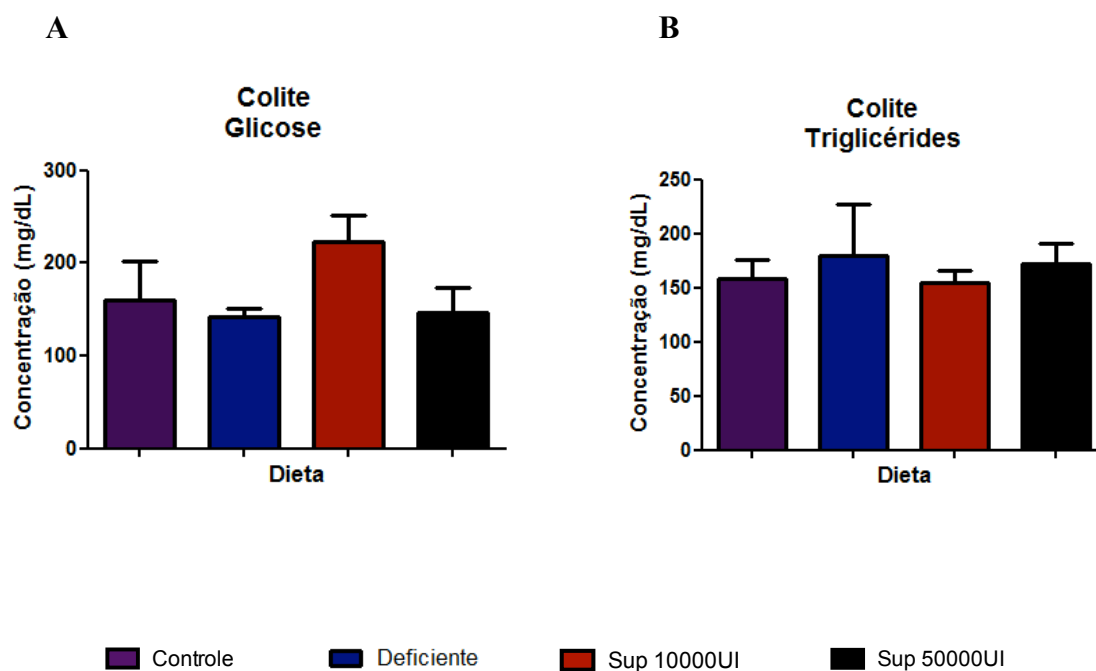


Figura 22 – Análise histológica da mucosa do cólon. Em (A) está representada a mucosa do cólon saudável, de um animal saudável alimentado com a dieta controle (imagem gentilmente cedida pela professora colaboradora Denise Carmona Cara). A Figura (B) mostra a mucosa intestinal, inflamada, também de um animal alimentado com a dieta normal, porém com indução de colite. Um leve aumento na muscular da mucosa está indicado entre as setas e um linfócito (pontos roxos) está apontado com uma seta vermelha. A Figura (C) apresenta o cólon de um animal deficiente em vitamina A, com setas pretas indicando o espessamento da muscular da mucosa e uma seta vermelha indicando um linfócito do infiltrado inflamatório. Em (D) vemos a mucosa do cólon de um animal suplementado com 10000 UI de vitamina A, com uma seta vermelha indicando um linfócito do infiltrado na submucosa. Em todas as fotos, a camada mucosa está indicada com o número 1, a camada muscular da mucosa está indicada com o número 2 e a submucosa com o número 3. Todas as fotos foram tiradas em aumento 10x e a barra no canto das mesmas indica a escala, em 100 μ m.

5.2.6. Parâmetros bioquímicos

Observamos que a deficiência ou suplementação de vitamina A, em animais saudáveis, leva a algumas alterações metabólicas, mesmo sem indução de colite. Com a indução da colite, essas alterações poderiam ser mais pronunciadas. Foram realizados testes bioquímicos para verificar o nível de glicose no sangue, assim como de triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, e atividade da enzima γ -glutamilttransferase (gama-GT). Nesse caso os animais também foram deixados em jejum por 8 horas.

No caso dos animais com colite, não foi observada alteração alguma em nenhum dos parâmetros. A concentração de glicose apresentou-se equivalente em todos os grupos (Fig. 23A). Os níveis de triglicérides estavam similares nos quatro grupos (Fig. 23B), assim como o nível de colesterol total (Fig. 23C). O colesterol HDL apresentou uma redução nos animais deficientes em vitamina A e não sofreu alteração nos suplementados, quando comparados com o grupo controle (Fig. 23D). Por último, a enzima gamma-GT apresentou resultados muito heterogêneos entre os animais de um mesmo grupo, resultando em desvios-padrão altos, porém, a atividade dessa enzima em animais deficientes em vitamina A parece estar abaixo do normal (Fig. 23E). Talvez um número maior de animais seja necessário para obtermos um resultado mais homogêneo.



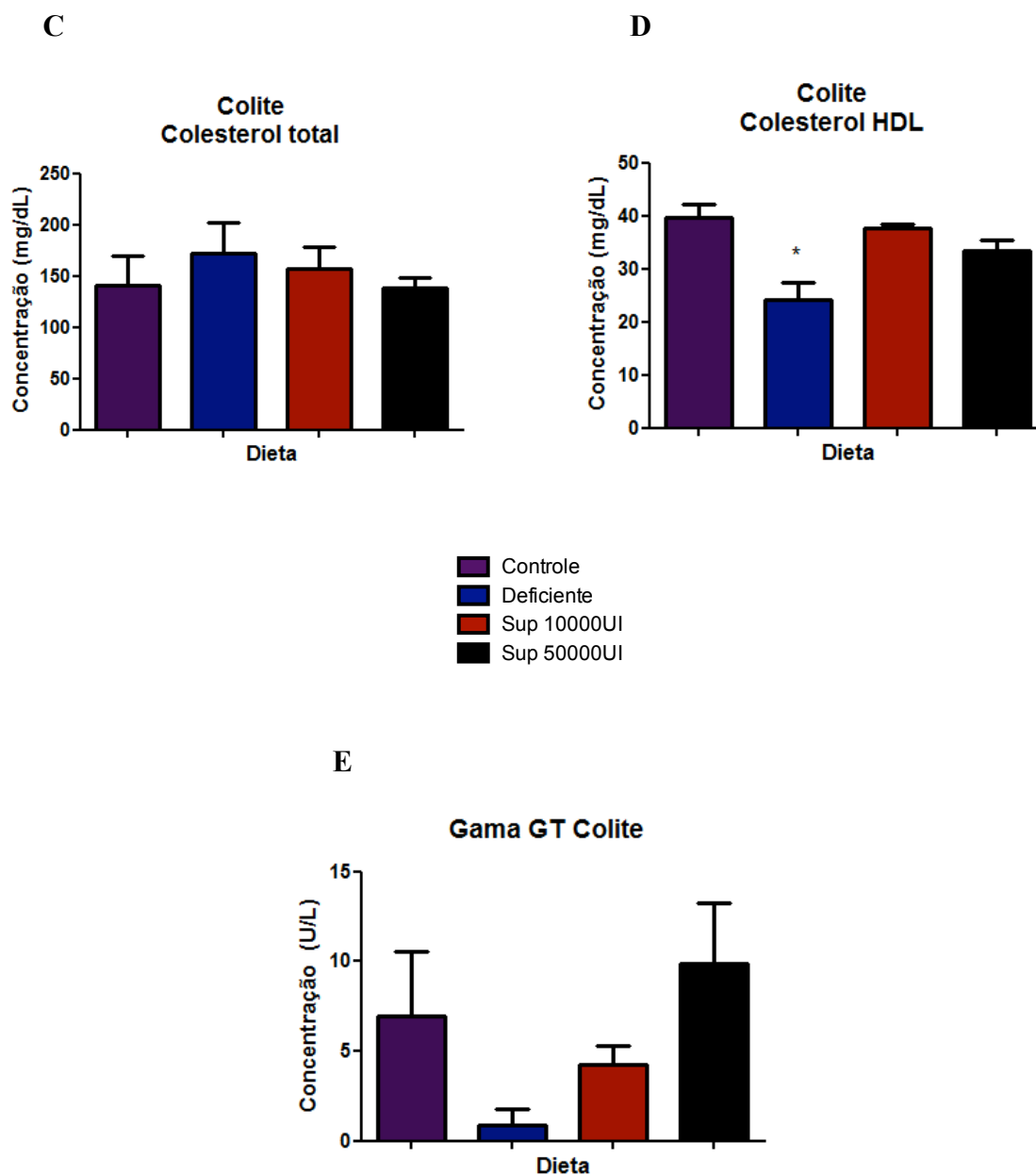


Figura 23 – Análises séricas de parâmetros metabólicos em animais com colite. Soro dos animais controle, deficientes em vitamina A e suplementados com esse nutriente, foi retirado após 8 semanas das dietas e tratado de acordo com o indicado para os testes bioquímicos. Na Figura (A) está representada a concentração sérica de glicose, em mg/dL. Em (B) está representado o nível sérico de triglicérides, também em mg/dL. A Figura (C) representa a concentração de colesterol total e o gráfico (D) trata do colesterol HDL, ambos também em mg/dL. Em (E) temos a atividade enzimática da γ -glutamilttransferase, expresso em Unidades /L. Para todos os gráficos o grupo controle está representado com a cor roxa, o deficiente com a cor azul, o grupo suplementado 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 5 animais por grupo.

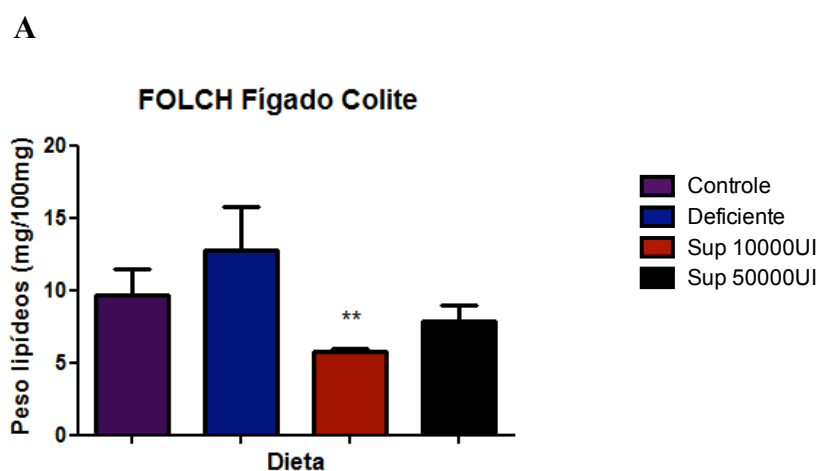
5.2.7. Análise lipídica do fígado

Foi observado, no teste com os animais saudáveis, que a vitamina A não causou alterações metabólicas no fígado, nem aumento no acúmulo de gorduras. Nos animais com colite, no entanto, o fígado estava morfológicamente alterado. Ele se apresentava maior e mais claro, levemente amarelado. Tais características são sinais característicos de esteatose hepática (Denise Carmona Cara, comunicação pessoal).

O resultado do teste de FOLCH mostrou uma redução no acúmulo de gordura no fígado dos animais suplementados com 10000 UI de vitamina A. Houve uma leve redução no outro grupo suplementado, porém, não significativa. O grupo deficiente em vitamina A tinha uma quantidade um pouco maior de gordura, em comparação com o grupo controle, mas também não significativa (Fig. 24A).

Os níveis de colesterol hepático total apresentaram-se reduzidos nos animais suplementados com 10000 UI de vitamina A, quando comparado com os dos animais controles. O grupo suplementado com 50000 UI também apresentou uma leve redução, porém não significativa. O grupo deficiente em vitamina A estava com os níveis similares aos dos animais controle (Fig. 24B).

O outro parâmetro metabólico analisado foi o nível de triglicérides do fígado e nesse caso o grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A estava com tal componente em valores reduzidos, quando comparado com o grupo controle e quando comparado com o grupo deficiente em vitamina A (Fig. 24C).



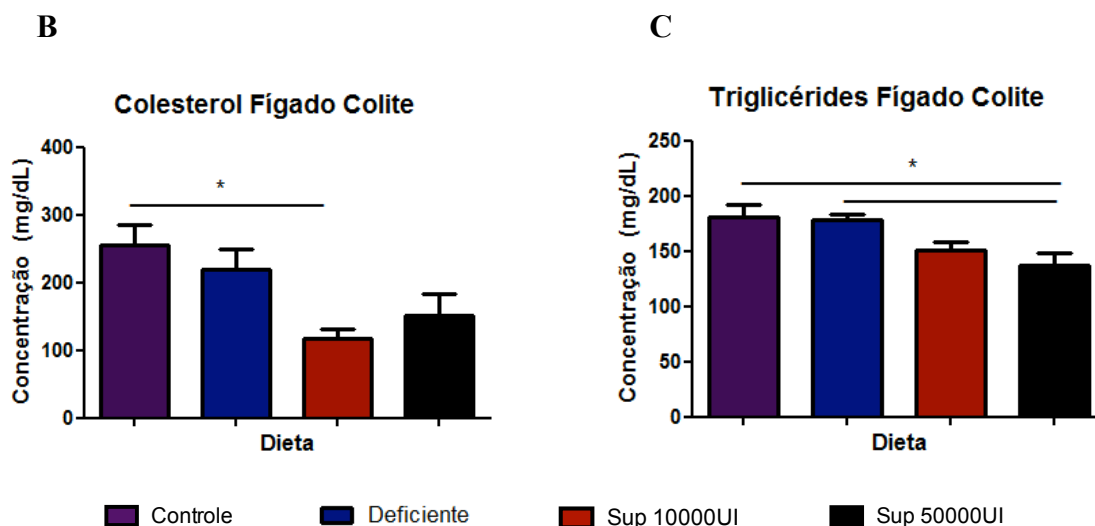
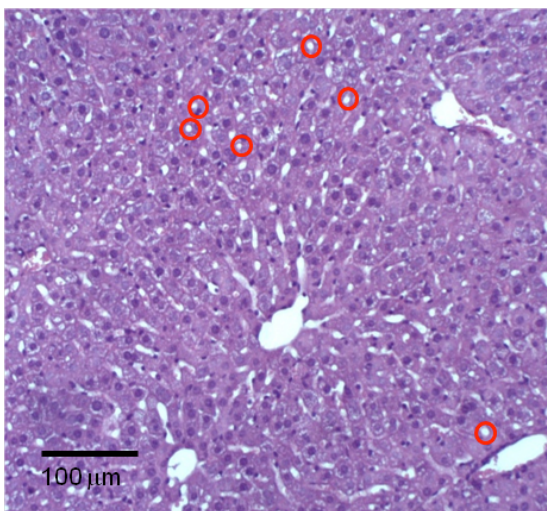
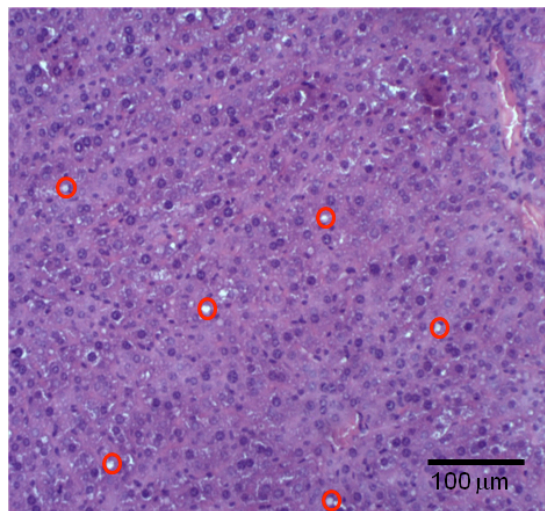


Figura 24 – Análise lipídica e bioquímica do fígado de animais com colite. Na Figura (A) foi realizada a técnica FOLCH. Para a análise lipídica do fígado dos animais com colite, foi coletado 100mg de tecido hepático e a esse tecido foi realizado um tratamento para extração dos lipídeos. O resultado foi expresso em miligrama de lipídeo para cada 100mg do fígado. Na Figura (B) e (C) estão representadas a concentração em miligrama/decilitro do colesterol total e triglicérides do mesmo órgão, respectivamente. Em todos os casos, os grupos, tratados com vitamina A ou deficiente, foram comparados com o grupo controle (dieta normal), assim como os grupos tratados entre si, para realização dos testes estatísticos. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 5 animais por grupo.

5.2.8. Histologia do fígado

Por fim, como a análise dos lipídeos do fígado mostrou uma redução na quantidade de gordura, bem como redução nos níveis de colesterol total e triglicérides hepáticos, nos grupos suplementados com vitamina A quando comparados com os grupos controle e deficiente, decidimos fazer uma análise histológica do órgão. Nessa análise, foi observada uma leve esteatose hepática no grupo controle, que consumiu a dieta normal, sendo possível a visualização dos sinusóides do fígado (Fig. 25A). Analisando o grupo deficiente em vitamina A, observamos uma esteatose um pouco mais pronunciada, com inchaço do órgão, não sendo possível visualizar quase nenhum sinusóide (Fig. 25B). Já no grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A, quase não foram observados pontos de esteatose no fígado e os sinusóides também estão levemente aparentes (Fig. 25C). Não foi possível fazer a lâmina histológica do grupo controle saudável, assim como do grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A, por problemas metodológicos. Essa histologia, assim como a histologia do cólon, será repetida, mas foi incluída na dissertação a título de ilustração.

A**B**

C

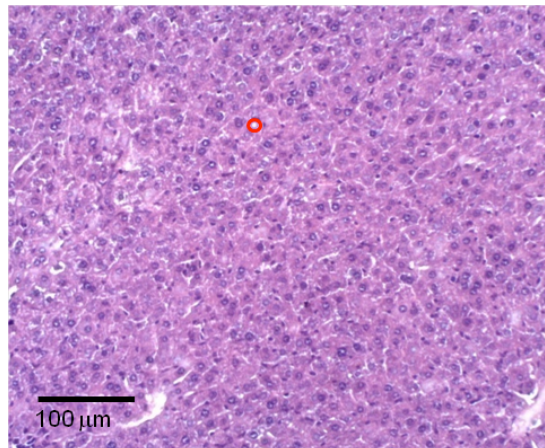


Figura 25 – Análise histológica do fígado. Em (A) está representado um corte do fígado de um animal com colite, alimentado com a dieta normal, apresentando um tecido com alguns pontos bem redondos, que caracterizam a esteatose, circulosos em vermelho. A Figura (B) apresenta o fígado de um animal deficiente em vitamina A, com os pontos redondos de esteatose também circulosos em vermelho. Em (C) temos o fígado de um animal suplementado com 10000 UI de vitamina A, com um único círculo ao redor do único ponto de esteatose presente no corte. Todas as fotos foram tiradas em aumento 10x e a barra no canto das mesmas indica a escala, em 100μm.

5.2.9. Perfil de células do sistema imune

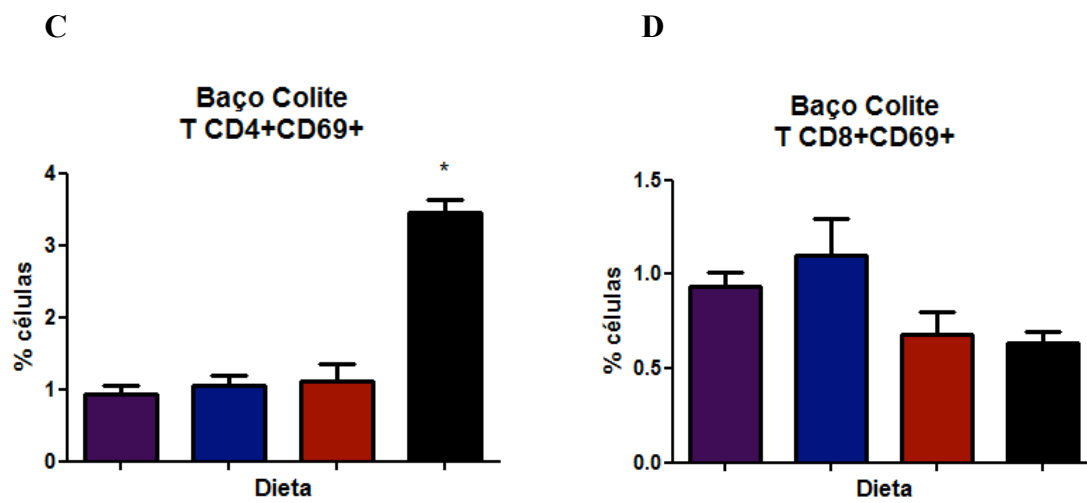
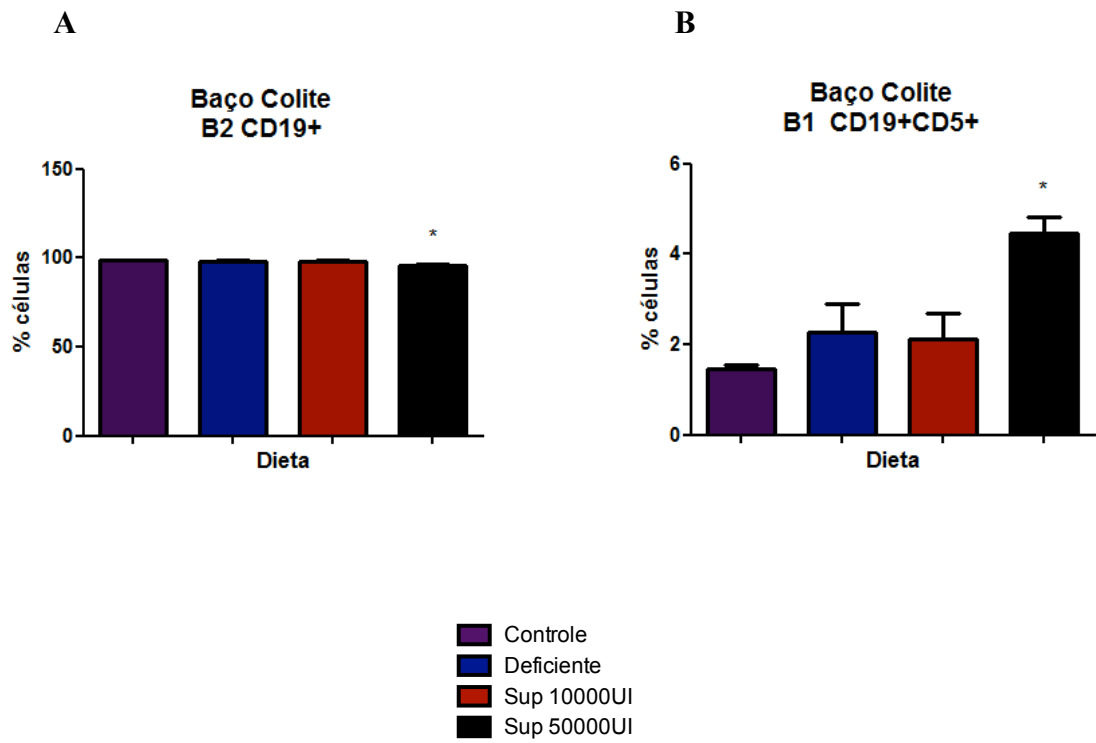
Após analisar os efeitos da vitamina A nos animais saudáveis e observar que a suplementação com tal nutriente melhorou a inflamação no cólon, analisamos alguns parâmetros imunológicos para tentar relacioná-los com os efeitos da vitamina A no desenvolvimento da doença. Nossa hipótese era que a redução da inflamação no intestino dos animais com colite tratados vitamina A se associaria a um aumento de células reguladoras (REIFEN, 2002). Foram analisados as populações de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, linfócitos B1 e B2 e células T reguladoras dos mesmos órgãos estudados na primeira parte desse estudo, baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer. No caso da lâmina própria, foram analisados somente os linfócitos T reguladores.

5.2.9.1. Perfil celular do baço

Após oito semanas de dieta e 6 dias de administração de DSS para indução da colite, a porcentagem de linfócitos B2 estava reduzida nos animais suplementados com 50000 UI de vitamina A, quando comparada com os outros três grupos (Fig. 26A). Como consequência, os linfócitos B1 estavam aumentados nesse mesmo grupo. Os outros grupos não sofreram alterações (Fig. 26B).

No caso dos linfócitos T, foi observada alteração na frequência das células CD4+ ativadas, também no grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A. Mais uma vez, os outros grupos não sofreram alterações (Fig. 26C). A frequência de linfócitos T citotóxicos CD8+ ativados, não estavam significativamente alterada em nenhum dos grupos (Fig. 26D).

As células reguladoras CD4+FoxP3+ estavam reduzidas nos animais deficientes em vitamina A, quando comparadas com o grupo controle. Comparado ao grupo controle, o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina apresentou um número aumentado de células reguladoras. O grupo suplementado com 50000 UI apresentou um número de células similar à dos animais controle (Fig. 26E). Com relação às células T CD4+LAP+, apenas o grupo deficiente apresentou redução no número dessas células quando comparado aos animais controle; os grupos suplementados não apresentaram alterações significativas nessa população (Fig. 26F).



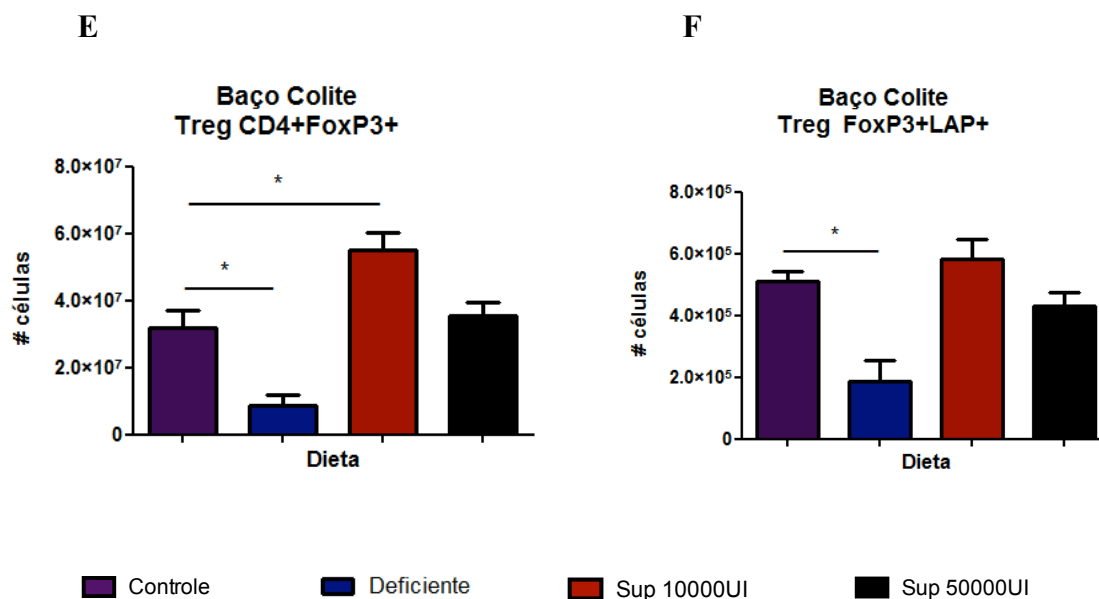


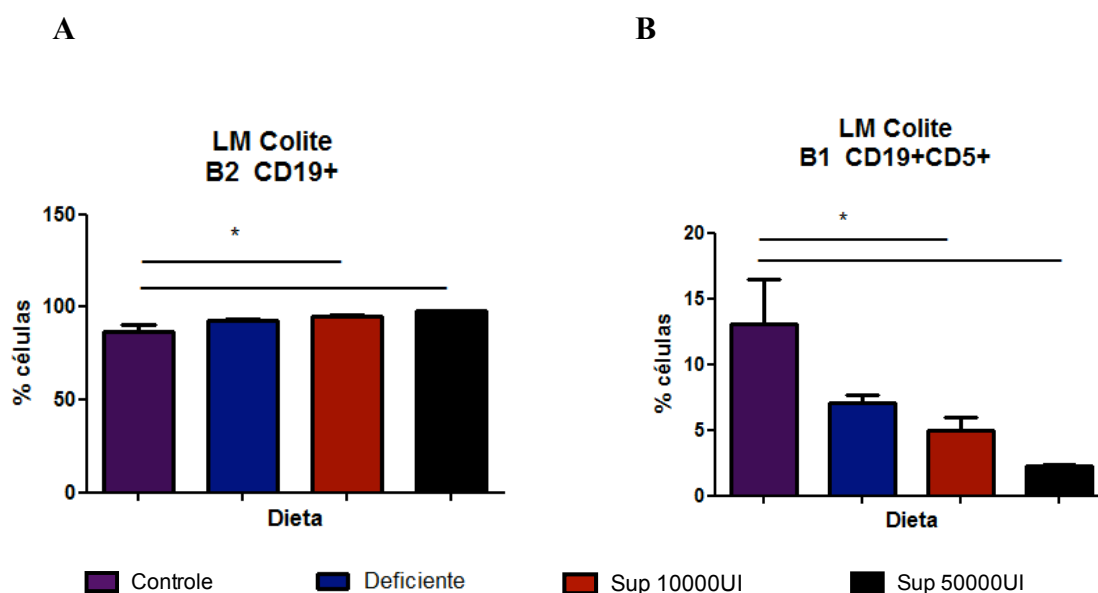
Figura 26 – Perfil das células do sistema imune no baço de animais com colite. Os animais tratados por 8 semanas com ou sem vitamina A, assim como os animais controle foram sacrificados após 6 dias de administração de 2% DSS e os baços retirados para análise por citometria de fluxo. Na Figura (A) está representada a população de linfócitos B2, marcadas com anticorpos anti-CD19. A Figura (B) representa os linfócitos B1, marcados com anticorpos anti-CD19 e anti-CD5. O gráfico em (C) representa a população de linfócitos T auxiliares ativados, marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD69. A Figura (D) mostra o resultado dos linfócitos T citotóxicos, marcados com anticorpos anti-CD8 e anti-CD69. As células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP geneticamente (E) e a outra subpopulação também foi marcada com anticorpo anti-LAP (F), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos, o grupo controle está representado com a cor roxa, o grupo deficiente com a cor azul, os animais suplementados 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.2.9.2. Perfil celular do linfonodo mesentérico

A frequência de linfócitos B dos linfonodos mesentéricos não sofreu alteração após a indução de colite. O grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A apresentou frequência mais alta de linfócitos B2 que os animais do grupo controle (Fig. 27A) e frequência reduzida de linfócitos B1 (Fig. 27B). O grupo suplementado com 10000 UI também apresentou a frequência de linfócitos B1 reduzida quando comparada àquela de animais do grupo controle (Fig. 27B).

As frequências de células T CD4+ e CD8+ ativadas, marcadas com o marcador de ativação precoce CD69, não sofreram alteração significativa em nenhum dos grupos (Fig. 27C e 27D, respectivamente).

Já os linfócitos T reguladores CD4+FoxP3+ se mostraram aumentados no grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A, mas apenas quando comparado com o grupo deficiente em vitamina A. A comparação entre os outros não mostrou alterações significativas. Como os desvios estavam altos, talvez um número maior de animais por grupo revelaria alguma diferença (Fig. 27E). Quando a população de células T CD4+LAP+ foi analisada, não observamos alterações significativas (Fig. 27F).



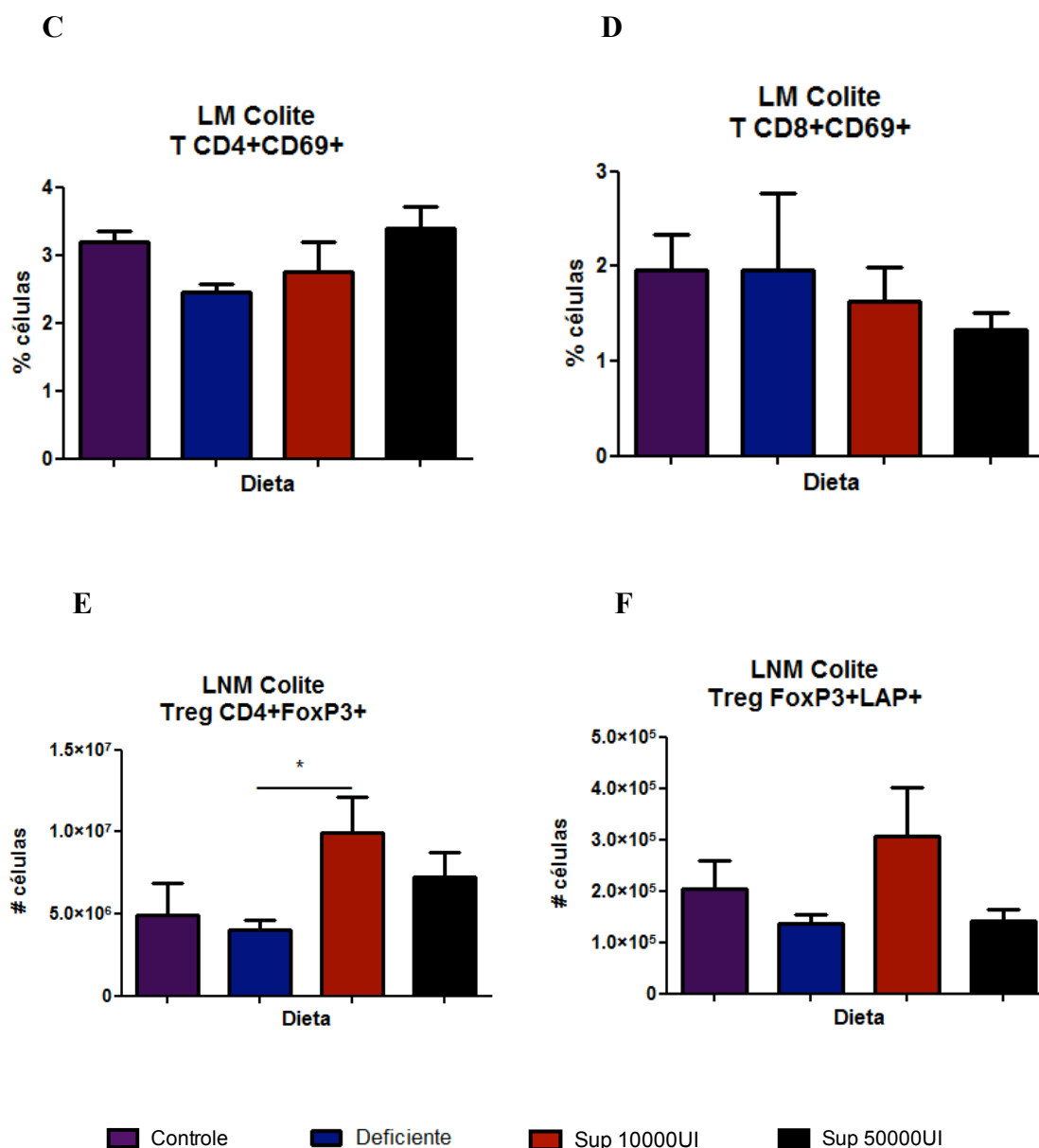


Figura 27 – Perfil das células do sistema imune dos linfonodos mesentéricos de animais com colite. Os animais tratados por 8 semanas com ou sem vitamina A, assim como os animais controle foram sacrificados após 6 dias de administração de 2% DSS e os linfonodos mesentéricos retirados. Na Figura (A) está representada a população de linfócitos B2, marcadas com anticorpos anti-CD19. A Figura (B) representa os linfócitos B1, marcados com anticorpos anti-CD19 e anti-CD5. O gráfico em (C) representa a população de linfócitos T auxiliares ativados, marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD69. A Figura (D) mostra o resultado dos linfócitos T citotóxicos, marcados com anticorpos anti-CD8 e anti-CD69. As células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP geneticamente (E) e a outra subpopulação também foi marcada com anticorpo anti-LAP (F), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos o grupo controle está representado com a cor roxa, o grupo deficiente com a cor azul, os animais suplementados 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

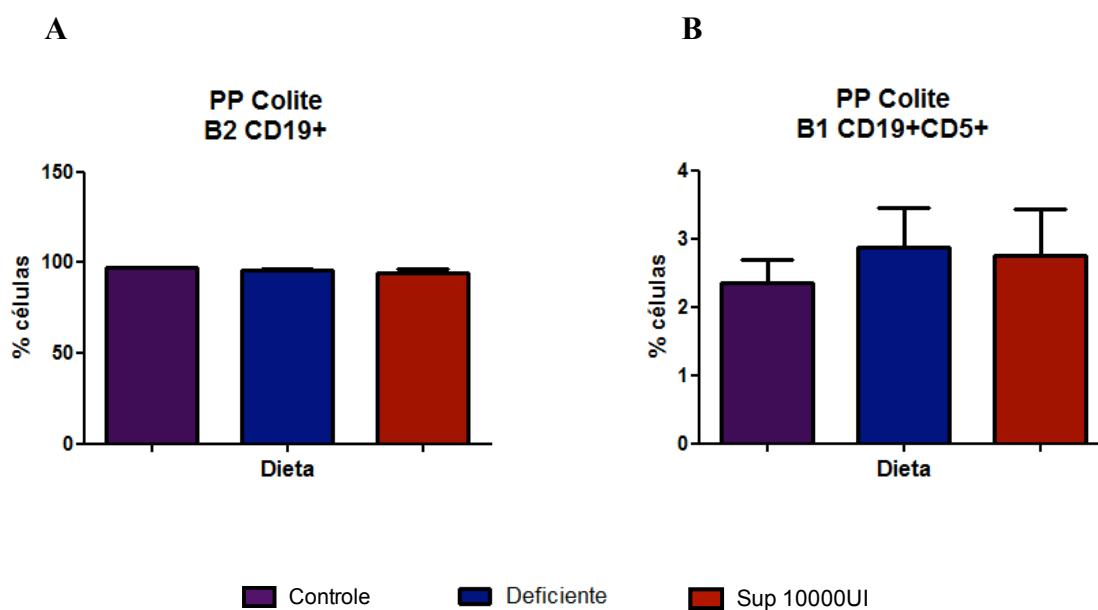
5.2.9.3. Perfil celular da placa de Peyer

Nos animais com colite, os resultados de citometria de fluxo das placas de Peyer, do grupo suplementado com 50000 UI de vitamina também foram perdidos, assim como dos animais saudáveis, devido a erros na execução da técnica. Os dados aqui apresentados para as células B e T efectoras (CD4+ e CD8+) serão referentes aos grupos controle, deficiente em vitamina A e suplementado com 10000 UI de vitamina A. As células T reguladoras foram analisadas nos animais dos quatro grupos.

As placas de Peyer dos animais com colite não apresentaram alterações em nenhuma das subpopulações dos linfócitos B, nesses três grupos analisados (Fig. 28A e 28B, para linfócitos B2 e B1, respectivamente).

As populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados (Fig. 28C e 28D, respectivamente) também não apresentaram alterações significativas. Os desvios estavam um pouco altos, o que talvez tenha prejudicado uma possível alteração significativa. Acreditamos que a repetição do experimento com maior número de animais por grupo poderá revelar ainda algumas diferenças entre os grupos.

As células Treg também não apresentaram alterações, embora o grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A estivesse com o número de células um pouco abaixo dos outros três grupos (Fig. 28E), assim como na população de células T CD4+LAP+, cujo número apresentou-se reduzido no mesmo grupo – suplementado com 10000UI (Fig. 28F).



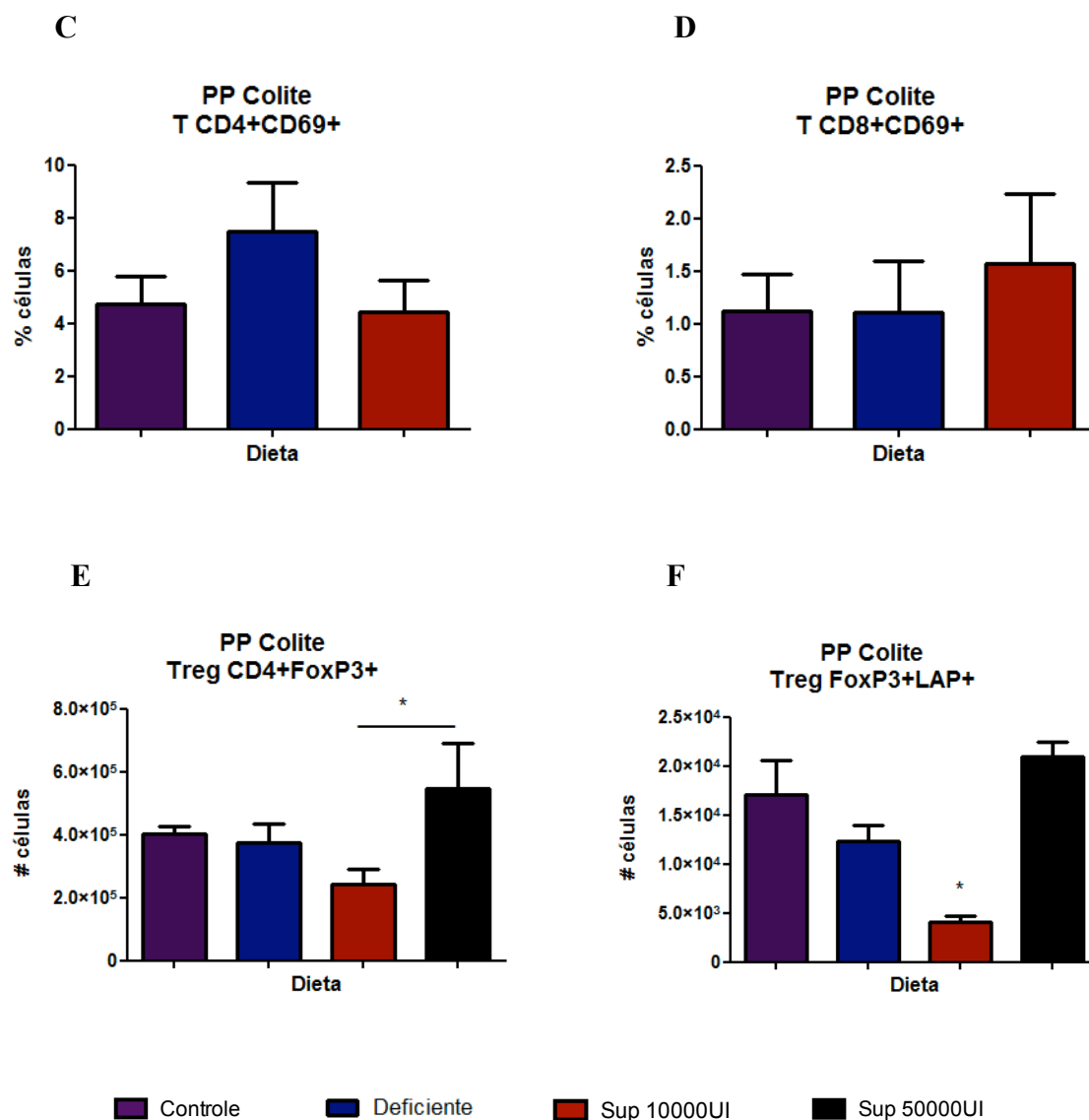


Figura 28 – Perfil das células do sistema imune das placas de Peyer de animais com colite. Os animais tratados por 8 semanas com ou sem vitamina A, assim como os animais controle foram sacrificados após 6 dias de administração de 2% DSS e as placas de Peyer retiradas. Na Figura (A) está representada a população de linfócitos B2, marcadas com anticorpos anti-CD19. A Figura (B) representa os linfócitos B1, marcados com anticorpos anti-CD19 e anti-CD5. O gráfico em (C) representa a população de linfócitos T auxiliares ativados, marcados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD69. A Figura (D) mostra o resultado dos linfócitos T citotóxicos, marcados com anticorpos anti-CD8 e anti-CD69. As células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP geneticamente (E) e a outra subpopulação também foi marcada com anticorpo anti-LAP (F), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos, o grupo controle está representado com a cor roxa, o grupo deficiente com a cor azul, os animais suplementados 10000 UI com a cor vermelha e, nos gráficos (E) e (F) o grupo suplementado 50000 UI foi representado em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.2.9.4. Células T reguladoras na lâmina própria

Para avaliar se a suplementação de vitamina A induziu uma maior migração de linfócitos T reguladores para a lâmina própria intestinal ou uma maior indução local dessas células, foram medidas as populações de células T CD4+FoxP3+ (Fig. 29A) e CD4+FoxP3+LAP+ (Fig. 29B).

No primeiro caso, os animais suplementados com 50000 UI de vitamina A apresentaram um maior número de células CD4+FoxP3+ na mucosa intestinal. Os outros três grupos não apresentaram alterações em comparação com o grupo controle.

Com relação à população de células T CD4+LAP+, nenhum dos três grupos apresentou diferenças quando comparados com o grupo controle.

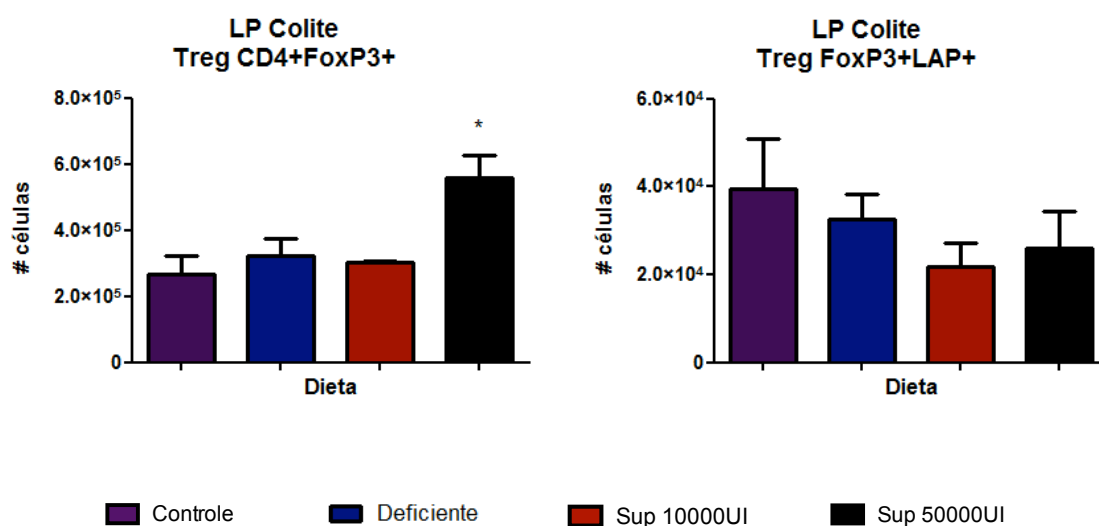


Figura 29 – Número de células T reguladoras na lâmina própria de animais com colite. Os animais tratados por 8 semanas com ou sem vitamina A, assim como os animais controle foram sacrificados após 6 dias de administração de 2% DSS e foi realizado um procedimento para separação da lâmina própria do cólon. Na Figura (A) as células T reguladoras foram marcadas com anticorpo anti-CD4 e o FoxP3 marcado com GFP, geneticamente. Em (B) outra subpopulação também foi observada, marcada com anticorpo anti-LAP (F), além do anticorpo anti-CD4 e do FoxP3-GFP. Para todos os gráficos o grupo controle está representado com a cor roxa, o grupo deficiente com a cor azul, os animais suplementados com 10000 UI com a cor vermelha e o grupo suplementado 50000 UI foi representado em preto. O teste realizado foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey.

5.2.10. Imunoglobulinas totais séricas (IgG, IgM, IgA) e imunoglobulina secretória (sIgA)

Nos animais saudáveis, em geral, não ocorreram muitas alterações na produção de anticorpos séricos mas a produção de sIgA estava levemente aumentada nos animais suplementados com 50000 UI de vitamina A. Nos animais com colite, os níveis séricos de IgG estavam aumentados nos animais deficientes em vitamina A. Também foi observada uma redução nos níveis desse anticorpo no soro dos animais suplementados com 50000 UI de vitamina A. Os animais suplementados com 10000 UI não apresentaram diferenças com relação aos animais controle (Fig. 30A).

Os níveis séricos de IgM não sofreram alterações em nenhum dos grupos testados (Fig. 30B).

Diferentemente dos animais saudáveis, a IgA foi a imunoglobulina que apresentou mais alterações. O grupo deficiente em vitamina A, curiosamente, apresentou níveis aumentados desse anticorpo, assim como o grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A. O grupo com suplementação de 10000 UI também apresentou níveis levemente aumentados, mas não significativamente diferente do grupo controle, pelo teste ANOVA. Porém, o teste t de *Student*, um teste menos rigoroso, apontou aumento significativo também nesse grupo (Fig. 30C). Os níveis de sIgA estavam aumentados também no grupo deficiente em vitamina A e no grupo suplementado com 50000 UI dessa vitamina (Fig. 30D).

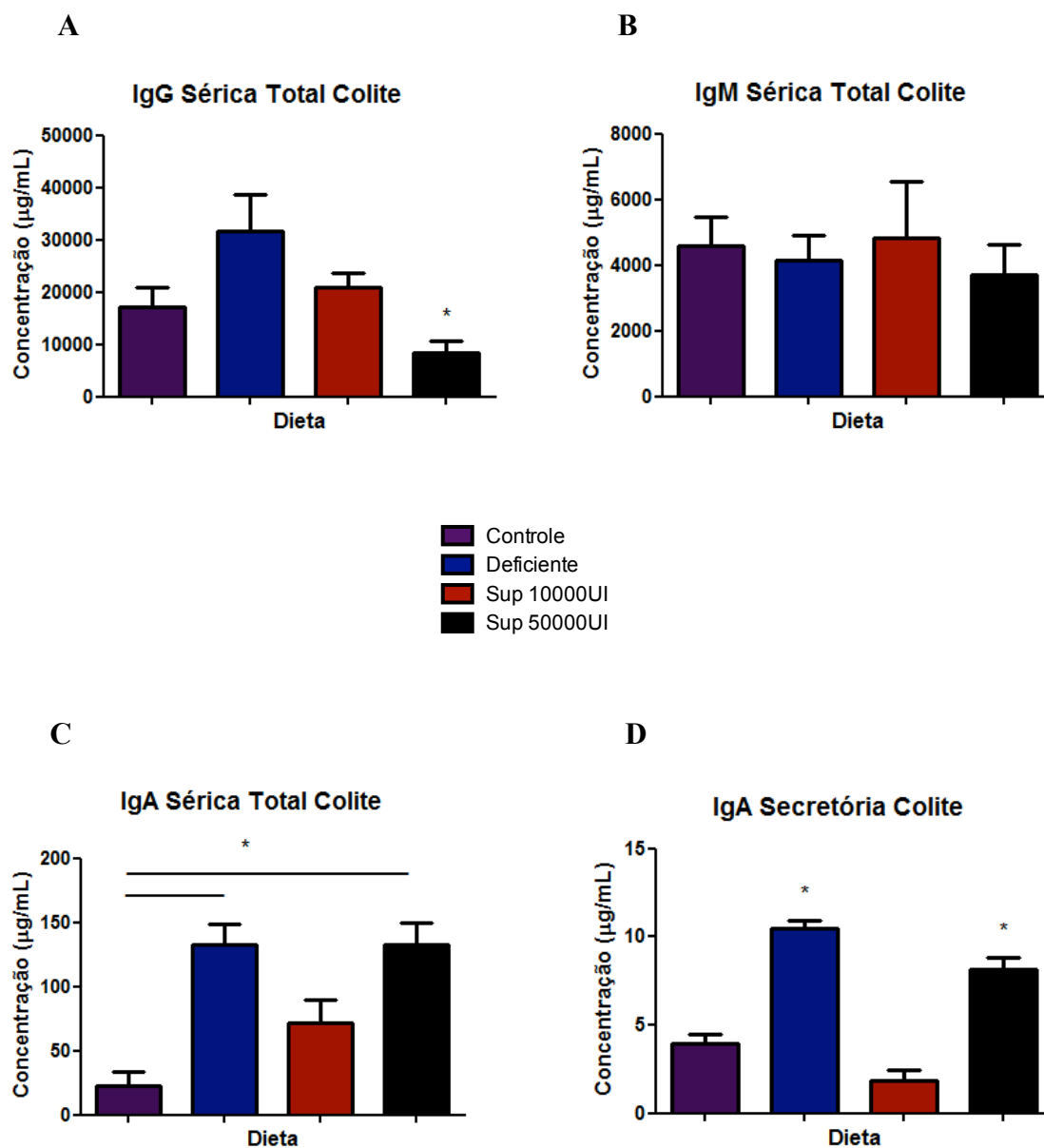


Figura 30 – Níveis de imunoglobulinas totais séricas, IgG, IgM e IgA, e de IgA secretória, em animais com colite. Os níveis de anticorpos totais IgG, IgM e IgA séricos após 8 semanas das dietas específicas e 6 dias de administração de 2% DSS foram medidos por ELISA. Também foram retiradas fezes de cada animal e medidos os níveis de IgA secretória. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 5-6 animais por grupo.

5.2.11. Análise da produção de citocinas pelas células da mucosa intestinal

Já foi relatado que o ácido retinóico leva a alterações no perfil de citocinas do organismo suplementado, mudando o perfil T_H1 para T_H2 . Então a produção de citocinas como $IFN-\gamma$ é diminuída (BLALOCK; GIFFORD, 1976) enquanto há um aumento na produção de IL-10, IL-2 e IL-4 (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008).

TGF- β

Analisamos inicialmente a produção de TGF- β , uma citocina que, em associação com o ácido retinóico, induz a diferenciação de células T $CD4+FoxP3$ (MUCIDA *et al.*, 2007).

Foram analisadas todas as regiões do intestino, mas níveis detectáveis de TGF- β só foram encontrados no íleo e no cólon. No íleo, a produção estava aumentada nos animais suplementados com 10000 UI de vitamina A e muito reduzida nos animais deficientes desse nutriente. Porém nenhuma das alterações pôde ser considerada significativa, pois o resultado foi muito heterogêneo entre os animais de cada grupo (Fig. 31A). No cólon houve o mesmo problema de heterogeneidade, mas foi observada uma redução na produção de TFG- β dos animais deficientes em vitamina A, enquanto que a produção nos animais suplementados com 50000 UI dessa vitamina estava aumentada (Fig. 31B). Quando realizado o teste t de *Student*, a comparação do grupo controle com o grupo deficiente em vitamina A se apresentou significativa. Acreditamos que, com um número maior de animais, essa diferença poderia ser revelada.

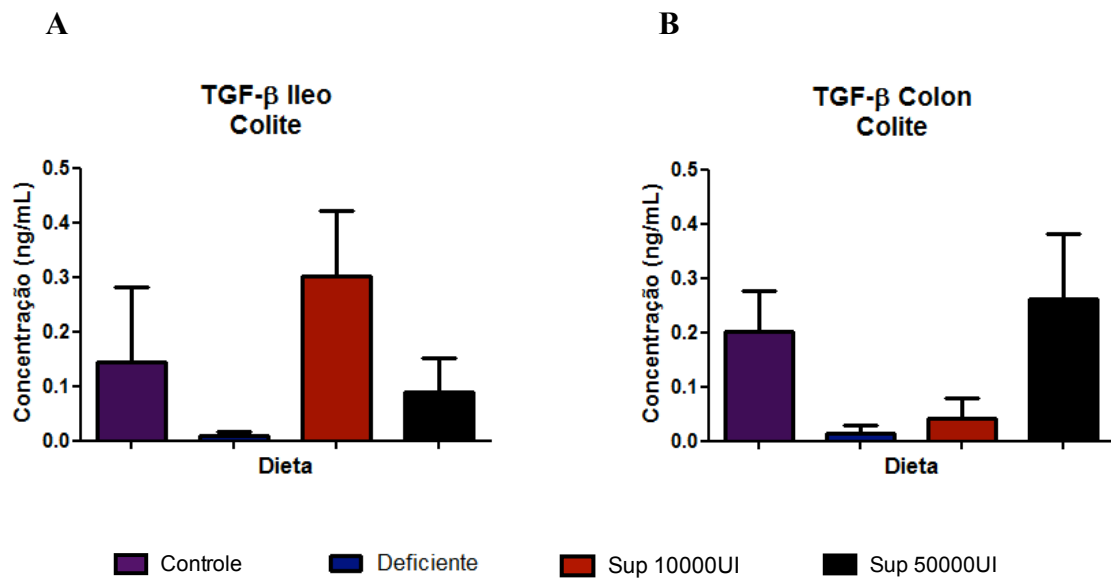
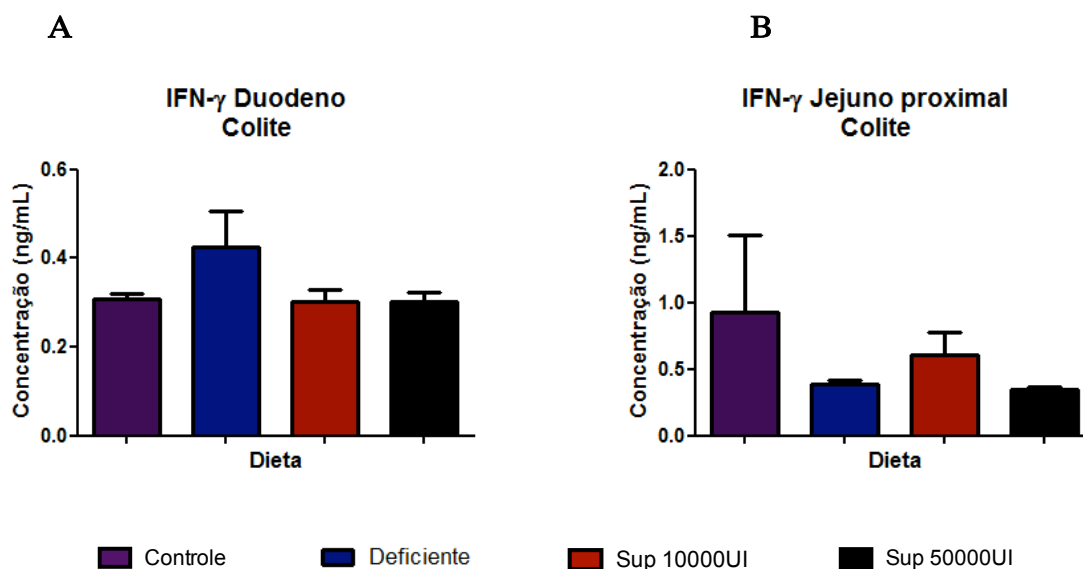


Figura 31 – Produção de TGF- β na mucosa intestinal. Após 8 semanas de dieta, o intestino delgado e cólon dos animais foram retirados e congelados. No dia da medida dos níveis da citocina, pela técnica de ELISA, os tecidos foram descongelados e preparados de acordo com o descrito em Material e Métodos. Em (A) está representada a concentração de TGF- β no íleo em ng/mL e em (B) temos a concentração dessa citocina no cólon. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 4 animais por grupo.

IFN- γ

Como o IFN- γ , é uma das principais citocinas presentes na inflamação da mucosa intestinal (ITO *et al.*, 2006), os níveis de sua produção no local inflamado também foram analisados.

No intestino delgado, a produção de IFN- γ se apresentou sem muitas alterações entre os grupos, incluindo nessa observação o duodeno (Fig.32A), o jejuno proximal (Fig. 32B) e o íleo (Fig. 32D). No jejuno distal (Fig. 32C), a produção estava aumentada nos grupos, deficiente em vitamina A e suplementado com 10000 UI dessa vitamina, porém essa alteração não foi estatisticamente significativa. O mesmo foi observado no cólon. A heterogeneidade entre os animais do mesmo grupo foi alta e não houve diferença significativa entre os grupos, apesar de alguns animais do grupo deficiente apresentarem aparentemente uma produção aumentada dessa citocina (Fig. 32E).



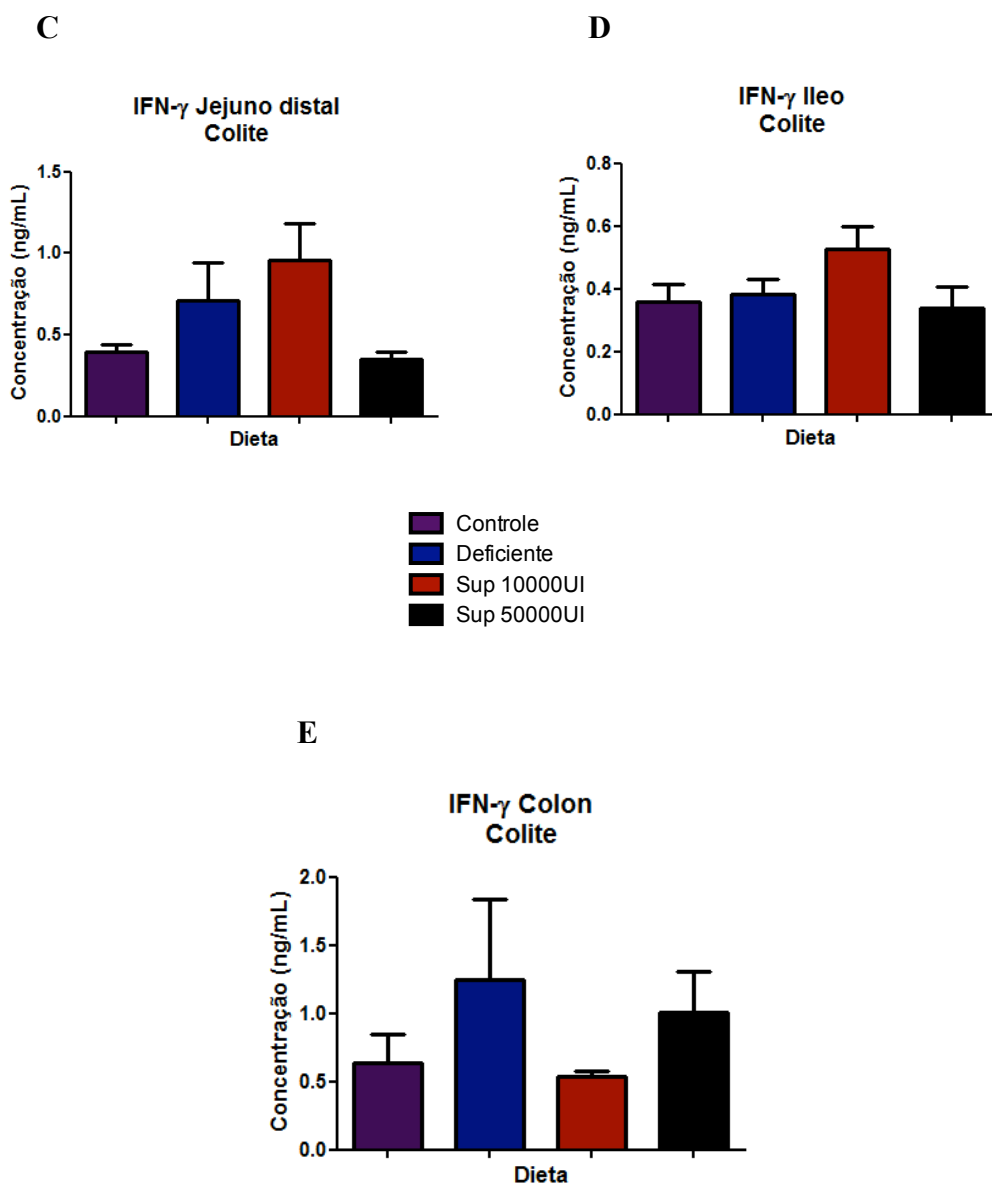
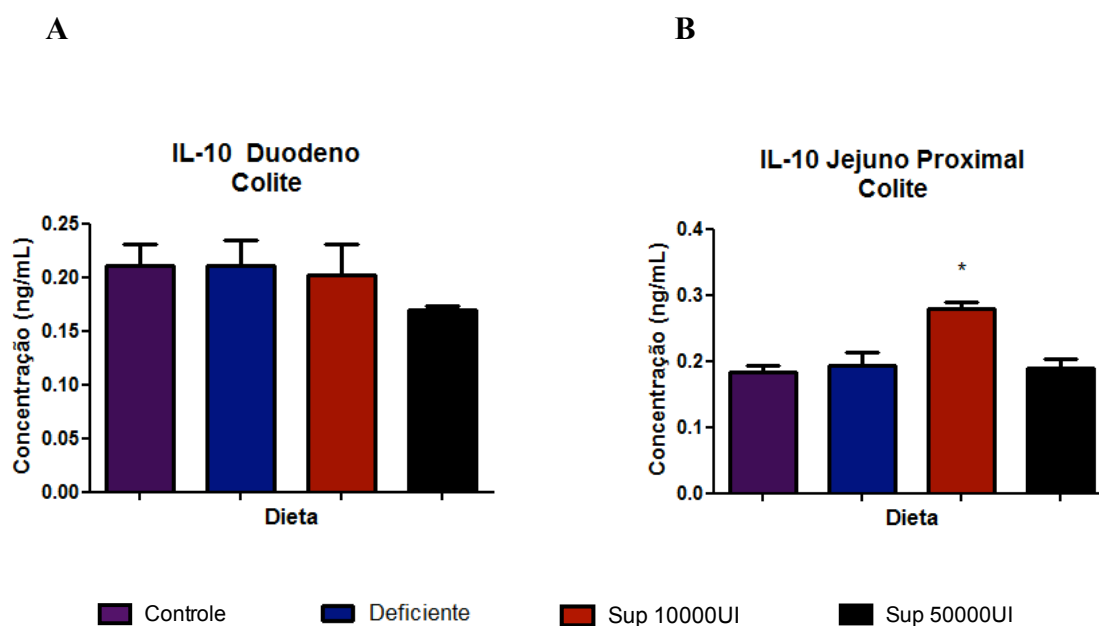


Figura 32 – Produção de IFN- γ na mucosa intestinal. Após 8 semanas de dieta, o intestino delgado e cólon dos animais foram retirados e congelados. No dia da medida da citocina, pela técnica de ELISA, os tecidos foram descongelados e preparados de acordo com o descrito em Material e Métodos. Em (A) está representada a concentração de IFN- γ no duodeno, em (B) está representada a concentração dessa citocina no jejuno distal e em (C) a concentração no jejuno proximal. A Figura (D) mostra a quantidade de IFN- γ no íleo e por fim em (E) está representada a concentração da citocina no cólon. Em todos os gráficos, a concentração do IFN- γ está representada em ng/mL. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 4 animais por grupo.

IL-10

IL-10 é uma citocina produzida por vários tipos celulares incluindo células T reguladoras. Ela exerce um papel fundamental na manutenção da homeostase da mucosa intestinal e camundongos deficientes dessa citocina desenvolvem doença inflamatória intestinal crônica, espontaneamente (MCCAFFERTY *et al.*, 2000). No duodeno não foi observada nenhuma alteração na produção de IL-10, apenas uma leve redução nos animais suplementados com 50000 UI de vitamina A (Fig. 33A). Já no jejuno proximal, houve um aumento significativo na produção dessa citocina, no grupo suplementado com 10000 UI de vitamina A. Os outros grupos permaneceram inalterados em comparação com o grupo controle (Fig. 33B). No jejuno distal, o aumento na produção de IL-10 na mucosa do grupo suplementado com 10000 UI da vitamina foi ainda mais pronunciado, e também nesse caso os outros grupos apresentaram uma produção similar à do grupo controle (Fig. 33C). No íleo, esse mesmo grupo suplementado também apresentou um leve aumento, porém, não significativo (Fig. 33D). A última porção intestinal analisada foi o cólon, que não apresentou diferença entre nenhum dos grupos, além de um leve aumento na produção da citocina pelo grupo suplementado com 50000 UI de vitamina A, mas não foi um aumento significativo (Fig. 33E).



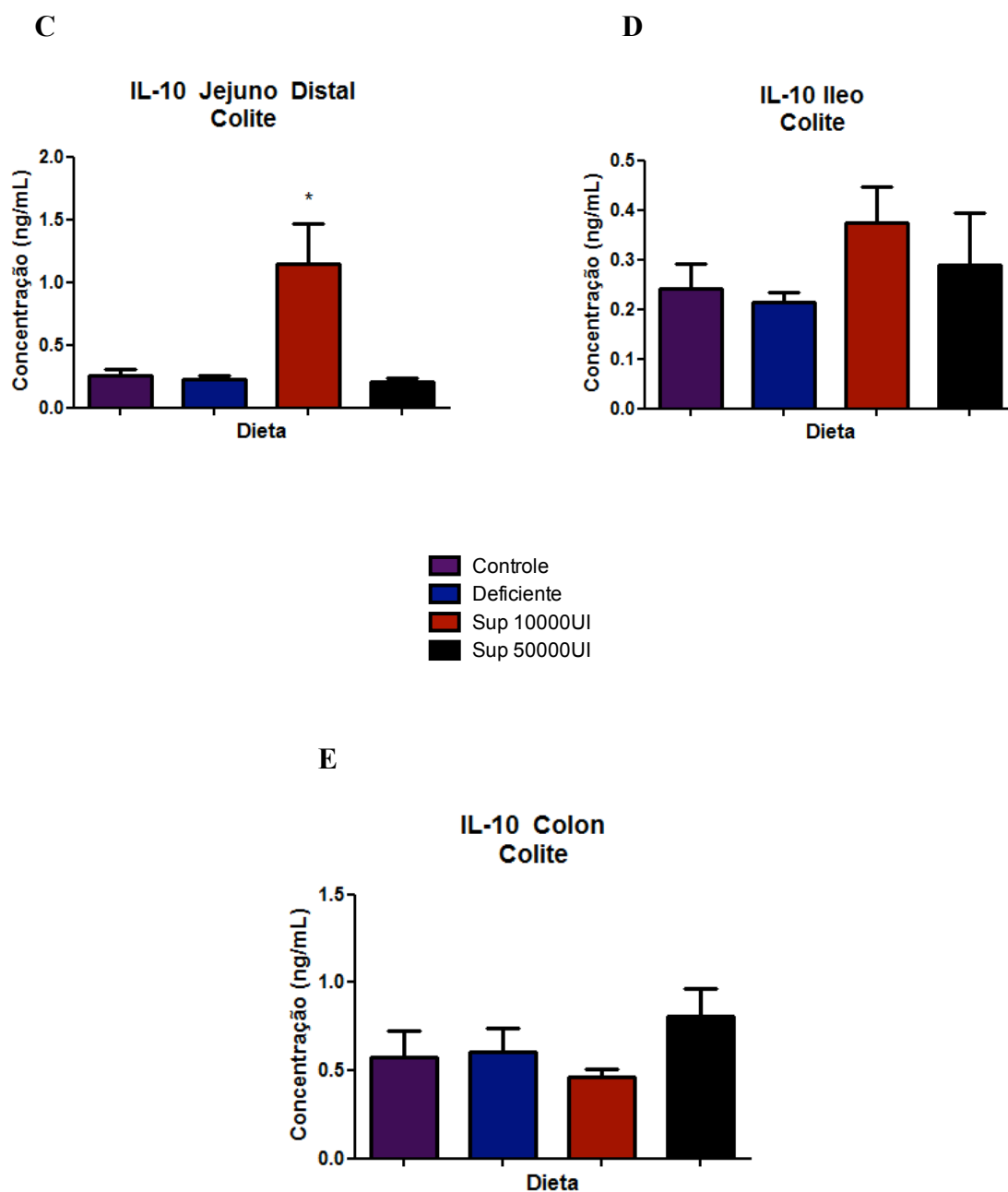


Figura 33 – Produção de IL-10 na mucosa intestinal. Após 8 semanas de dieta, o intestino delgado e cólon dos animais foram retirados e congelados. No dia da dosagem da citocina, pela técnica de ELISA, os tecidos foram descongelados e preparados de acordo com o descrito em Material e Métodos. Em (A) está representada a concentração de IL-10 no duodeno, em (B) temos a concentração dessa citocina no jejuno distal e em (C) a concentração no jejuno proximal. A Figura (D) mostra a quantidade de IL-10 no íleo e por fim em (E) está representada a concentração da citocina no cólon. Em todos os gráficos a concentração da IL-10 está representada em ng/mL. O teste estatístico realizado em todos os gráficos foi o ANOVA seguido do pós-teste Tukey. Foram utilizados 4 animais por grupo.

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

Diversos trabalhos já foram publicados acerca dos efeitos do ácido retinóico no organismo como um todo e especificamente no sistema imune. Sua ampla ação se dá por ser ele ligante de receptores nucleares, os receptores nucleares de retinóides (RNR, do inglês *Retinoid Nuclear Receptors*), que são divididos em dois subtipos, o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor X de retinóides (RXR) (BERBIS, 2010). Por esse motivo, o ácido retinóico influencia a expressão de genes em diversos tipos celulares. Um exemplo seria o gene CYP26A1, que codifica uma enzima capaz de oxidar o próprio ácido retinóico, e é estimulado pelo mesmo, um mecanismo de *feed back* negativo acionado quando esse ácido se encontra em níveis muito altos (ZHANG; ZOLFAGHARI; ROSS, 2010). O gene Hox, que controla o desenvolvimento e a diferenciação posicional das células no embrião e é induzido no desenvolvimento do neurectoderma (SZATMARI; IACOVINO; KYBA, 2010) também é outro exemplo de gene induzido pelo ácido retinóico. Ele afeta ainda a transcrição do gene da Apolipoproteína M, que tem uma importante função na biogênese e metabolismo do HDL (MOSIALOU; ZANNIS; KARDASSIS, 2010). Mas uma de suas funções mais importantes, para o nosso objetivo, é a indução da expressão do gene FoxP3, essencial para a função das células T reguladoras (HILL *et al.*, 2008); (XU *et al.*, 2010).

Alguns estudos foram realizados *in vitro* e nos mostraram os efeitos diretos do retinol nas células imunes (MUCIDA *et al.*, 2007). Outros grupos relatam os efeitos da diferenciação de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) *in vitro* pela estimulação com o ácido retinóico. Em um desses trabalhos, em seguida à estimulação, tais células foram transferidas para animais, em seguida realizadas as análises imunológicas (MENNING *et al.*, 2010). Já outros grupos realizaram todo o trabalho *in vivo*, utilizando diversos modelos de suplementação, por gavagem (REIFEN *et al.*, 2002), por injeção do ácido retinóico (BAI *et al.*, 2010) ou por suplementação na dieta (FELIPE *et al.*, 2005). No entanto, cada trabalho teve um foco diferente, de modo que é difícil realizar algum tipo de comparação de resultados das diferentes metodologias. Alguns dos efeitos encontrados foram comuns a todos os estudos relatados tais como a indução da diferenciação de células Tregs (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008) e da polarização de células T CD4+ estimuladas para um perfil predominantemente T_H2 (BAI *et al.*, 2010).

Nesse trabalho, decidimos testar os efeitos da vitamina A por meio de suplementação na dieta. Essa forma de administração, ao invés de injetar diretamente o ácido retinóico ou administrar a vitamina por gavagem, foi escolhida pelo fato da ingestão voluntária ser uma forma menos invasiva que as diversas formas de injeção (intraperitoneal, intramuscular, intravenosa) ou a própria gavagem. Estudos prévios do nosso laboratório também mostram que a ingestão voluntária de antígenos, por exemplo, na dieta (*continuous feeding*) é um protocolo melhor para a indução e manutenção da tolerância oral que a gavagem (FARIA *et al.*, 1998); (FARIA *et al.*, 2003). Outros trabalhos com vitamina A já utilizaram tal protocolo com resultados positivos (GARCIA *et al.*, 2003); (FELIPE *et al.*, 2005); (KHEIRVARI *et al.*, 2008).

Além de verificar os efeitos da suplementação de vitamina A, e da sua deficiência, em animais saudáveis, um dos nossos objetivos foi observar se a suplementação oral por ingestão voluntária de duas diferentes doses dessa vitamina seria capaz de prevenir ou amenizar a ocorrência da inflamação intestinal. Decidimos testar também se a deficiência do nutriente levaria a uma piora no quadro de colite em camundongos.

A primeira dose, de 10000 UI foi escolhida arbitrariamente, pois não há muitos trabalhos com suplementação na dieta de camundongos. Escolhemos essa dose como um teste piloto, pois não queríamos uma dose muito alta. Os experimentos iniciais já apresentaram um bom resultado e, depois, ao analisar os diversos protocolos em uso, decidimos aumentar a dose. Procuramos uma dose que fosse considerada subtóxica, pois a vitamina A não deve ser consumida sem limites, uma vez que a hipervitaminose A está associada a vários efeitos deletérios (BATES, 1995). Não encontramos na literatura a informação sobre a dose tóxica para camundongos, de forma que a calculamos proporcionalmente de acordo com a dose considerada tóxica para humanos, que é 15x a dose diária recomendada (Jacqueline Alvarez Leite, comunicação pessoal). Desse modo, como consideramos 4000UI/kg de dieta como dose diária (REEVES; NIELSEN; FAHEY, Jr., 1993), utilizamos aproximadamente 12x esse valor, resultando em 50000 UI/kg de dieta. Os trabalhos que utilizam a suplementação na dieta dos animais utilizam doses bem mais altas do que a utilizada no nosso trabalho, chegando a 100000 UI/kg de dieta (FELIPE *et al.*, 2005). No entanto, na ausência de dados sobre a toxicidade, preferimos não ultrapassar essa dose que consideramos subtóxica.

Nossos resultados nos animais saudáveis mostraram, na primeira parte desse trabalho, que a vitamina A é importante em diversos processos no organismo, tanto no

desenvolvimento do animal, quanto no sistema imune e suas respostas, e no próprio metabolismo.

Não foi inesperado o achado de que o desenvolvimento ponderal dos animais deficientes em vitamina A tenha sido inferior ao dos animais suplementados (Fig. 9), pois, apesar de esse dado não estar relatado na literatura para camundongos, é isto que acontece com humanos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Tivemos a preocupação de verificar se a suplementação de vitamina A causaria distúrbios metabólicos nos animais, por ser uma vitamina tóxica em algumas doses e por ser um composto lipossolúvel. Mas nenhum dos parâmetros metabólicos analisados apresentou alterações preocupantes, nem com a dosagem mais alta da vitamina (Fig. 10).

Na análise dos parâmetros imunológicos, percebemos que as alterações celulares nos animais saudáveis não seguiram um padrão entre as duas doses de suplementação. Em alguns tipos celulares foi observada alteração apenas no grupo com menor dose (Fig. 12F), em outros apenas no grupo suplementado com a dose mais alta (Fig. 12B). Nossa expectativa original era que a resposta seria dose dependente, mas no decorrer do trabalho, ficou claro que essa resposta é dose independente. Esse efeito pode ser devido a diferentes limiares de sensibilidade ao ácido retinóico nas diferentes células do organismo, ou do mesmo tipo celular, em diferentes compartimentos do corpo. Outra possibilidade é que os genes já ativados em cada célula podem influenciar a resposta dessas ao ácido retinóico, variando os limiares de sensibilidade dos genes alvo. Os mecanismos de regulação do ácido retinóico também podem ser diferentes em diferentes tipos celulares. Por exemplo, a proteína já citada CYP26A1, que é ativada pelo próprio ácido retinóico, pode ter uma ação diferenciada dependendo do órgão ou tipo celular analisado. O microambiente local também poderia influenciar essa indução, pela presença de diversas citocinas ou quimiocinas que combinadas ao ácido retinóico levariam a efeitos distintos. Dessa forma, diferentes respostas podem ser esperadas em diferentes tecidos ou em diferentes situações. Tal hipótese também explicaria porque células de diferentes órgãos (baço, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, lâmina própria) responderam de forma diferente à presença da vitamina A.

Os linfócitos B1 e B2, como já mencionado, são duas subpopulações distintas, independentes que diferem uma da outra em diversos aspectos, entre eles a localização, expressão de marcadores de superfície, repertório de anticorpos e propriedades de

crescimento e proliferação (FAGARASAN; WATANABE; HONJO, 2000). No nosso estudo, as duas populações responderam de formas opostas no baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer. No primeiro, houve um aumento na frequência de células B1 no grupo suplementado com 50000 UI, enquanto que nos LNM e nas PP não houve alteração. Possivelmente o microambiente diferente desses órgãos, com diferentes concentrações de citocinas, influencia a proliferação desses linfócitos B. Mas a população mais afetada foi a de linfócitos T reguladores. Apesar dos efeitos nessa população não terem seguido um padrão, pois em um órgão houve redução dessas células no grupo deficiente, enquanto em outro foi observado aumento nos grupos suplementados, nossos dados mostraram *in vivo* o que já foi relatado na literatura em estudos *in vitro*, ou seja, que a presença de ácido retinóico (associado ao TGF- β) induz a expressão de FoxP3, enquanto que a sua ausência, na presença de IL-6, auxilia na diferenciação de células T virgens em T_H17 (MUCIDA *et al.*, 2007). Esse aumento de células T CD4+CD25+Foxp3+ e de células T CD4+LAP+ no grupo suplementado (com a dose mais baixa) foi mais pronunciado nos linfonodos mesentéricos (Fig. 13E e 13F). A lâmina própria apresentou um resultado inesperado, com um aumento no número no número dessas células no grupo deficiente em vitamina A e também no grupo suplementado com 50000 UI da vitamina. O aumento das células Treg nos animais suplementados com vitamina A pode ser explicado pelo papel do ácido retinóico na diferenciação de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ no intestino. Já o achado inesperado do efeito positivo da deficiência de vitamina A no número dessas células pode se dever ao recrutamento de células Treg estimulado pela exacerbação da inflamação local. Já foi descrito que células T efetoras produtoras de IL-2 induzem o recrutamento e a proliferação de células Treg exatamente pela ação da IL-2 nos receptores CD25 altamente expressos por essas células. Esse seria um mecanismo importante de imunoregulação dos eventos inflamatórios no corpo (ALMEIDA; ZARAGOZA; FREITAS, 2006).

Como já descrito, a administração de ácido retinóico induz uma troca do perfil T_H1 para T_H2 (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008). Como a troca de isotipos depende da estimulação dos linfócitos B por citocinas secretadas pelos linfócitos T_H, seria esperado uma mudança no perfil de anticorpos também. A presença de citocinas T_H1 induz a produção de alguns isotipos de anticorpos (IgG2a, IgG3) e a presença de citocinas T_H2 induz a produção de outros isotipos (IgG1, IgE) (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008). Não existem trabalhos na literatura que estudaram os efeitos da

vitamina A no perfil de imunoglobulinas em animais saudáveis, sem estímulo antigênico específico. No nosso estudo, observamos um aumento na concentração de IgG nos animais deficientes em vitamina A (Fig. 16A) e seria interessante, futuramente, medirmos os subtipos dessa imunoglobulina e verificar se há alterações entre eles (aumento de isotipos relacionados ao perfil T_{H1} , por exemplo, pela falta de ácido retinóico). Contrariamente ao que esperávamos, a IgA secretória não apresentou alterações significativas. O ácido retinóico produzido por células dendríticas da mucosa intestinal tem funções importantes na produção de IgA no local. Ele é capaz de induzir a expressão de receptores de migração para a mucosa ($\alpha 4\beta 7$ e CCR9) em linfócitos B comprometidos com a síntese de IgA (MORA *et al.*, 2006) e também pode atuar diretamente na indução de troca de isotipo para IgA em linfócitos B das placas de Peyer de forma independente de linfócitos T (MORA; VON ANDRIAN, 2009). Assim, esperaríamos que a suplementação com vitamina A e sua deficiência tivessem efeitos opostos nas concentrações de IgA secretória nas fezes. No entanto, já está também descrito que apenas 50% da IgA produzida na mucosa e presente nas fezes se origina de linfócitos B2 ativados nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos. A outra metade da produção de IgA aparentemente ocorre por linfócitos B1 da lamina própria que fazem troca de isotipo no local independentemente do auxílio de linfócitos T (FAGARASAN *et al.*, 2001); (MORA; VON ANDRIAN, 2009). Alguns autores mostraram que os linfócitos B1 produtores de IgA na mucosa podem se originar de linfócitos B1 do peritônio que migram para esse local (MACPHERSON *et al.*, 2000). Nesse aspecto, então, a medida dos níveis totais de IgA nas fezes parece ser uma composição da IgA produzida de forma T-dependente ou T-independente por linfócitos B2 das placas de Peyer e dos linfonodos mesentéricos com a IgA produzida por linfócitos B1 da lamina própria. Quando examinamos os efeitos da suplementação de vitamina A na frequência de linfócitos B1, notamos que em alguns órgãos, como os MLNs, ocorreu uma redução na frequência dessas células. Não foram examinadas as células B1 da lâmina própria. Assim, é plausível que a ausência de efeitos encontrada nos camundongos deficientes ou suplementados com vitamina A pode, na verdade, refletir efeitos opostos não examinados aqui nas populações de linfócitos B1 produtores dessa imunoglobulina no intestino. Um estudo mais detalhado das células B produtoras de IgA no intestino mostrando o fenótipo da célula produtora (B1 versus B2) poderia trazer informações mais completas sobre os efeitos da vitamina A na produção de IgA secretória.

Por outro lado, uma alteração no balanço entre os perfis T_{H1}/T_{H2} (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008) pôde ser observado na medida de $IFN-\gamma$, uma citocina considerada T_{H1} . No nosso estudo, ocorreu um aumento na produção dessa citocina nos animais deficientes em vitamina A (Fig. 17B), indicando que não só a presença desse nutriente pode alterar o perfil imune para T_{H2} , mas, aparentemente, a falta do mesmo pode também induzir uma predominância do perfil T_{H1} , inclusive em animais saudáveis. Porém, outras citocinas devem ser medidas para testar essa hipótese.

Como o ácido retinóico é considerado um composto antiinflamatório, devido à sua ação de induzir células T reguladoras, de inibir a proliferação e diferenciação de células T_{H17} (MUCIDA *et al.*, 2007), de aumentar a troca de isotipo de células produtoras de anticorpos para IgA (WATANABE *et al.*, 2010) e de reduzir a resposta imune T_{H1} (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008), decidimos testar esse composto na colite induzida por DSS, para verificar se esse efeito antiinflamatório seria eficaz o para amenizar uma inflamação local.

Também nesse caso decidimos verificar os parâmetros metabólicos, pois se sabe que pessoas acometidas por doenças inflamatórias intestinais, têm o fígado afetado. Como esse órgão é muito importante no metabolismo como um todo, alguns parâmetros metabólicos no organismo poderiam estar alterados (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999); (LUKAS, 1997); (BIRD, 2010). Durante os experimentos, observamos que o fígado dos animais estava alterado, em todos os grupos, mas principalmente nos animais deficientes em vitamina A.

Já foi relatado que pacientes com IBD são mais propensos a desenvolver desordens extra-intestinais, como inflamação na pele, nos olhos, nas articulações, nos pulmões e no fígado, caracterizado por um intenso infiltrado inflamatório local (ADAMS; EKSTEEN, 2006).

Foi realizada, então, a análise morfológica e lipídica do fígado para examinar a possibilidade de uma ação da suplementação com vitamina A nesse órgão quando esta fosse sobreposta a um quadro de inflamação intestinal. Porém, o que observamos foi exatamente o contrário. Os animais deficientes em vitamina A apresentaram uma leve esteatose, representados pelos pontos redondos e brancos na imagem histológica. Os animais que consumiram a dieta normal também apresentaram alguns pontos de esteatose, mas os animais suplementados com vitamina A praticamente não mostraram alteração no fígado (Fig. 25). Uma hipótese provável é que, por ser a vitamina A lipossolúvel, ela poderia auxiliar na captura da gordura. Como os animais deficientes

não têm vitamina A, essa gordura poderia se acumular no fígado, levando à esteatose. Nos animais suplementados isso não aconteceria, pois, como o retinol é armazenado no fígado, ele ficaria disponível para captar a gordura evitando a esteatose. De fato, foi verificado pelo método FOLCH que a quantidade de lipídeos no fígado estava reduzida nos animais suplementados com essa vitamina (Fig. 24). Apesar de os animais suplementados com as duas doses de vitamina A terem consumido mais DSS quando comparados com o grupo deficiente nesse nutriente, eles se apresentaram metabolicamente similares aos animais saudáveis, principalmente nos parâmetros medidos no fígado. Uma hipótese alternativa à captura da gordura é que a colite sabidamente aumenta os riscos de esteatose hepática (LUKAS, 1997); (BARGIGGIA *et al.*, 2003). Possivelmente a ação tóxica do DSS afeta a eficiência funcional das células hepáticas tendo sido já descrito um acúmulo desse agente no fígado (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999). Assim, o comprometimento na função dos hepatócitos poderia levar à esteatose (Denise Carmona Cara, comunicação pessoal). Já foi relatado que a ação antioxidante da vitamina A é capaz de prevenir danos ao DNA de células hepáticas de ratos, induzido pela administração de um hepatocarcinógeno (VELANGANNI *et al.*, 2007). Tais propriedades antioxidantes da vitamina A podem ter auxiliado na redução da toxicidade do DSS às células hepáticas reduzindo os riscos de esteatose.

O menor consumo do DSS por parte dos animais deficientes em vitamina A (Fig. 21A) pode ter uma analogia ao fenômeno da aversão típico dos quadros de alergia alimentar, na qual os animais sensibilizados evitam a ingestão do alérgeno que levou ao desencadeamento da inflamação intestinal (MIROTTI *et al.*, 2010). É possível a diminuição no consumo do DSS esteja relacionada a sinais neuroquímicos, que podem ser acentuados com a severidade da doença. Na alergia alimentar, a aversão está diretamente relacionada ao aumento de IgE sérico e esse aumento à indução de expressão de fos em áreas do cérebro relacionadas à emoção (BASSO *et al.*, 2003). Seria interessante investigar se a aversão ao consumo de DSS na colite envolve um correlato neurológico análogo.

Para testar se a vitamina realmente teria, *in vivo*, um papel antiinflamatório na colite, pesamos os camundongos diariamente, durante os 6 dias de indução da doença e, no dia do sacrifício, o comprimento das vilosidades do cólon desses animais foi medida. No que diz respeito ao peso, os animais suplementados com vitamina A apresentaram um desenvolvimento ponderal similar ao dos camundongos controle, o que é um

indicativo de menor severidade na doença (Fig. 19A). Com relação ao comprimento das vilosidades do cólon, não observamos as alterações típicas dos camundongos com colite. Embora a inflamação da mucosa intestinal esteja relacionada ao encurtamento dessas vilosidades, esse é um parâmetro pouco sensível para a avaliação do comprometimento e da recuperação da mucosa intestinal como já observado por outros estudantes do nosso grupo em estudos de colite experimental (GOMES-SANTOS *et al.*, 2010).

Para ilustrar os efeitos da colite e da vitamina A no estado físico geral dos animais, os mesmos foram fotografados e filmados após os 6 dias de administração do DSS. Observamos que os animais do grupo controle (com colite) permaneciam aglomerados em um canto da gaiola, se locomovendo pouco e com dificuldade. Os animais deficientes em vitamina A também permaneciam aglomerados e não mais se locomoviam, mesmo quando a gaiola era movimentada. Já os animais suplementados com vitamina A, mesmo com a dose mais baixa, se locomoviam com desembaraço pela gaiola e alguns continuaram subindo na grade como os animais do grupo controle saudável. Um camundongo representativo de cada grupo foi filmado separadamente em uma superfície plana ilustrar essas diferenças na postura e no comportamento dos mesmos (arquivo em CD anexo).

Na análise histológica dos cólons, observamos que a suplementação com vitamina A foi capaz de melhorar a inflamação da mucosa intestinal mesmo no grupo suplementado com a dose mais baixa da vitamina. No grupo suplementado com 10000 UI, a melhora foi mais pronunciada na camada submucosa, que não apresentou o espessamento visto nos grupos controle (com colite) e deficiente. A camada muscular da mucosa também apresentou recuperação marcante, desaparecendo o espessamento dessa camada observado nos camundongos com colite e agravado no grupo deficiente em vitamina A. A única camada que não mostrou recuperação foi a camada mucosa, que é a que está em contato mais íntimo com o lúmen intestinal e com o DSS ingerido. Como a administração do DSS não cessou, o agente irritante continuou estimulando a camada mucosa. Uma perspectiva futura é avaliar o estado do cólon nos dias 1, 2 e 3 após o fim da administração do DSS e verificar se todas as camadas desse tecido apresentam sinais de recuperação nos camundongos suplementados com vitamina A e se essa recuperação ocorreria de forma mais rápida que dos grupos controle e deficiente.

Depois de observada a melhora do quadro de colite no grupo tratado com vitamina A, nosso próximo objetivo foi caracterizar o perfil imune dos animais e

verificar em quais fatores ocorreram alterações e quais poderiam ter sido os principais responsáveis por essa melhora.

O primeiro parâmetro analisado foi o perfil celular, principalmente as células T reguladoras que desempenham um papel fundamental na homeostase intestinal (UHLIG; POWRIE, 2009) e os linfócitos B1 e B2, ambos produtores de sIgA no intestino (MARUYA *et al.*, 2011). Como já mencionado, os linfócitos B1 se alojam principalmente na cavidade peritoneal, podendo migrar para a lâmina própria e sofrer troca de isotipo, geralmente, de IgM para IgA, *in situ* (SUZUKI *et al.*, 2005). Apesar de seu papel importante na produção de IgA no intestino na produção de IgA sérica, a produção de IgA sérica ocorre principalmente na medula óssea por B2 convencionais (SUZUKI *et al.*, 2010).

Nossos dados mostram um aumento significativo da frequência de linfócitos B1 no baço e, ao mesmo tempo, uma redução da frequência dessas células nos LNM nos camundongos suplementados com alta dose de vitamina A. Um estudo recente mostrou que o ácido retinóico interfere na expressão de NFATc1, fator de transcrição importante no desenvolvimento das células B1 da cavidade peritoneal (MARUYA *et al.*, 2011). Assim, o aumento na frequência de células B1 no baço pode envolver tanto um efeito direto do ácido retinóico nas células B1 do peritônio, que sabidamente migram em pequenos números para o baço, quanto indiretamente aumentando o recrutamento dessas células para o baço a partir do reservatório do peritônio ou mesmo do LNM, onde elas declinam em frequência.

No presente estudo, as populações B1 e B2 foram quantificadas apenas no baço, LNM e placas de Peyer, mas é de interesse medir tais populações no intestino, pois como mencionado, as células B1 são as principais produtoras de sIgA na lâmina própria e os níveis de sIgA estão aumentados nos animais com colite suplementados (alta dose) com vitamina A. Um dado curioso foi o aumento da sIgA também nos animais deficientes em vitamina A. O resultado esperado era o oposto, pois já foi descrito que a vitamina A é importante para a troca de isotipo para IgA no intestino. Entretanto, um estudo recente mostra que células T CD4+CD25+FoxP3+ inibem a expressão de Foxp3 e se convertem em células T foliculares (T_{FH}). Essas células T foliculares estimulam a formação de centros germinativos nas placas de Peyer, sítios indispensáveis para a produção de anticorpos, e estimulam a produção de IgA (TSUJI *et al.*, 2009). Como a deficiência de vitamina pode levar à inibição da expressão do gene FoxP3, é possível

que essas células T se tornem células T_{FH} resultando num aumento da produção de IgA pelo tecido linfóide associado à mucosa.

As Treg só apresentaram aumento na lâmina própria com a dose mais alta de suplementação, apesar de evidências sugerirem uma maior migração dessas células para o local da inflamação, em casos de colite aguda (MENNING *et al.*, 2010). Uma possível explicação para tal comportamento é que talvez a expressão da integrina $\alpha 4\beta 7$, que direciona as células para o intestino, assim como a quimiocina CCR9, necessite de uma dose mais alta de ácido retinóico para ser induzida. Não realizamos nesse trabalho, o estudo dos marcadores de migração celular, mas essa é uma perspectiva para um futuro próximo. Um estudo recente mostrou que células Treg CD4+CD25+Foxp3+ tratadas *in vitro* com ácido retinóico migram para a lâmina própria (MENNING *et al.*, 2010).

Foi observado aumento nos números das Treg no baço e nos linfonodos mesentéricos ora no grupo suplementado com 10000 UI ora no grupo suplementado com dose mais alta da vitamina. A população de células Treg CD4+LAP+ não seguiu o mesmo padrão que a população CD4+FoxP3+. Vale ressaltar que essas células afetadas pelo ácido retinóico provavelmente não são Treg naturais, mas sim as induzidas na periferia. Isto é especialmente verdadeiro para as que expressam LAP, que são todas Treg induzidas (CHEN *et al.*, 2008).

Outros componentes imuno-reguladores importantes da mucosa intestinal muito afetados pela administração de retinol são as citocinas. Nesse aspecto, a medida de TGF- β , é particularmente crítica, pois essa citocina tem ações antagônicas na mucosa dependendo do milieu. Em associação com a interleucina-6, TGF- β induz a diferenciação de células com perfil TH17, enquanto que a sua associação com o ácido retinóico induz a diferenciação de Tregs CD4+CD25+Foxp3+. Os níveis de IFN- γ no intestino também foram medidos, uma vez que essa citocina cumpre um papel pró-inflamatório crítico na inflamação intestinal induzida por DSS (ITO *et al.*, 2006). A IL-6 ainda não foi medida, mas sua dosagem é primordial para auxiliar o entendimento dos processos que levam à melhora da colite nos animais suplementados com retinol.

Um problema que tivemos nessa dosagem de citocinas intestinais por ELISA foi a alta heterogeneidade entre os animais do mesmo grupo. A concentração de citocinas produzidas por diferentes animais do mesmo grupo variou muito, levando a desvios-padrão altos. Uma explicação para esse fenômeno pode ser os diversos tipos celulares presentes no intestino, muitas deles capazes de produzir as mesmas citocinas, em

quantidades diferentes. O método que utilizamos avalia a produção total da citocina no tecido e não sugere quais as células responsáveis pela sua produção. É de interesse nosso utilizar outros métodos de detecção das citocinas, mais sensíveis e que dêem mais informações.

Apesar do alto desvio, a produção de TGF- β mostrou coerência com o resultado que obtivemos das células T reguladoras da lâmina própria do cólon, que estavam aumentadas nos animais suplementados com 50000 UI de vitamina A. Foi exatamente nesse grupo que detectamos a maior concentração de TGF- β no cólon. Nossos dados sugerem que essa citocina, associada à vitamina A administrada, resultou no mesmo efeito observado *in vitro* por Mucida e colaboradores de estimular a conversão de células T em Tregs (MUCIDA *et al.*, 2007).

Como os camundongos deficientes em vitamina A foram mais afetados pela colite, era esperado que a produção de IFN- γ no cólon desses animais estivesse aumentada. Isso foi sugerido pelo resultado de ELISA, mas não pudemos tirar conclusões devido à heterogeneidade no grupo. Já a IL-10 praticamente não apresentou alterações no cólon; porém no jejuno, tanto proximal quanto distal, a produção estava aumentada. Como o intestino delgado não é afetado pela colite, não foi realizada análise das células da lâmina própria dessa região por citometria de fluxo, mas pode ser de interesse descobrir se a vitamina A induziu migração de células para essa porção do intestino.

Os resultados mostram, então, que os animais deficientes em vitamina A são mais vulneráveis à inflamação intestinal e que a suplementação dessa vitamina na dieta teve o efeito de reduzir os efeitos inflamatórios do DSS. Vários fatores parecem se relacionar a esses efeitos da vitamina A do mesmo modo que o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal não se deve a um só fator. Um parâmetro importante afetado pela suplementação com vitamina A foi o número de células T reguladoras em quase todos os órgãos analisados, apesar de não haver uma relação entre dose e aumento do número de Tregs. Outro fator que pode ter contribuído para os resultados obtidos com a suplementação pode ser a microbiota intestinal. Já foi descrito pelo nosso grupo que a dieta tem grande influência no desenvolvimento do sistema imune (MENEZES *et al.*, 2003), mas outros estudos têm demonstrado que componentes da dieta também afetam composição da microbiota intestinal (MASLOWSKI; MACKAY, 2011), e a maior parte dos microrganismos está concentrada no cólon. Dessa forma, a falta de um

nutriente essencial, pode ter alterado a microbiota dos animais favorecendo a proliferação de uma espécie com capacidade de estimular eventos pró-inflamatórios. A falta de sinalização do ácido retinóico leva à expressão de genes diferenciados que também poderiam contribuir para a inflamação em um local carente de células T reguladoras.

A administração da vitamina A *in vivo* leva a diferentes conseqüências no organismo, pela extrema complexidade do sistema imune e de suas interações com os outros sistemas do organismo. Futuros estudos com foco nesse nutriente, se mostram necessários para elucidar em detalhe seus mecanismos de ação e também promissores para propor novas alternativas terapêuticas para processos inflamatórios como as doenças inflamatórias crônicas do intestino.

7. CONCLUSÃO

6. Conclusão

1. Nos animais saudáveis

- O consumo de vitamina A se mostrou importante para o bom desenvolvimento ponderal, pois a deficiência da mesma resultou em menor peso corporal dos animais
- A suplementação com as doses testadas de vitamina A não levou a sinais de toxicidade, pois não causou distúrbios metabólicos nos animais
- Animais suplementados com vitamina A apresentaram aumento de células T reguladoras em alguns órgãos linfóides

2. Nos animais com inflamação intestinal

- Fígado de animais com colite se apresentou alterado em animais controle e deficientes em vitamina A, mas a suplementação com a mesma resultou em um retorno aos níveis normais de lipídeo hepático
- Suplementação com vitamina A foi importante para um melhor desenvolvimento e manutenção ponderal, e melhor desempenho físico dos animais com colite
- Análise histológica do cólon mostrou melhora da inflamação nesse órgão nos animais suplementados
- Suplementação com Vitamina A se associou a um aumento do número de células T reguladoras no baço, linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, e a deficiência da vitamina levou a uma redução dessas células no baço
- A ingestão de vitamina A não se mostrou essencial na produção de IgA e sIgA, pois os animais deficientes, aparentemente, utilizaram mecanismos compensatórios para manter essa produção na ausência da vitamina
- A Vitamina A se mostrou eficiente na redução da inflamação intestinal, sendo que esse efeito se associou ao aumento de células T com fenótipo regulador

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografia

ADAMS, D. H.; EKSTEEN, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 6, n. 3, p. 244-251, 2006

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin.Chem.*, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974

ALMEIDA, A. R.; ZARAGOZA, B.; FREITAS, A. A. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J.Immunol.*, v. 177, n. 1, p. 192-200, 2006

AMARAL, J. F.; FOSCHETTI, D. A.; ASSIS, F. A.; MENEZES, J. S.; VAZ, N. M.; FARIA, A. M. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 39, n. 12, p. 1581-1586, 2006

ARAKI, A.; KANAI, T.; ISHIKURA, T.; MAKITA, S.; URAUSHIHARA, K.; IYAMA, R.; TOTSUKA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; WATANABE, M. MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J.Gastroenterol.*, v. 40, n. 1, p. 16-23, 2005

AXELSSON, L. G.; LANDSTROM, E.; BYLUND-FELLENUS, A. C. Experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice: beneficial effects of sulphasalazine and olsalazine. *Aliment.Pharmacol.Ther.*, v. 12, n. 9, p. 925-934, 1998

BAI, A.; LU, N.; ZENG, H.; LI, Z.; ZHOU, X.; CHEN, J.; LIU, P.; PENG, Z.; GUO, Y. All-trans retinoic acid ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by shifting Th1 to Th2 profile. *J.Interferon Cytokine Res.*, v. 30, n. 6, p. 399-406, 2010

BARGIGLIA, S.; MACONI, G.; ELLI, M.; MOLTENI, P.; ARDIZZONE, S.; PARENTE, F.; TODARO, I.; GRECO, S.; MANZIONNA, G.; BIANCHI, Porro G. Sonographic prevalence of liver steatosis and biliary tract stones in patients with inflammatory bowel disease: study of 511 subjects at a single center. *J.Clin.Gastroenterol.*, v. 36, n. 5, p. 417-420, 2003

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO, Neto J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. *J.Neuroimmunol.*, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003

BATES, C. J. Vitamin A. *Lancet*, v. 345, n. 8941, p. 31-35, 1995

BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, v. 369, n. 9573, p. 1627-1640, 2007

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, v. 369, n. 9573, p. 1641-1657, 2007

BAUMGARTNER-NIELSEN, J.; VESTERGAARD, C.; THESTRUP-PEDERSEN, K.; DELEURAN, M.; DELEURAN, B. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR) and its ligand (GITRL) in atopic dermatitis. *Acta Derm.Venereol.*, v. 86, n. 5, p. 393-398, 2006

BENSON, M. J.; PINO-LAGOS, K.; ROSEMBLATT, M.; NOELLE, R. J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J.Exp.Med.*, v. 204, n. 8, p. 1765-1774, 2007

BERBIS, P. [Retinoids: mechanisms of action]. *Ann.Dermatol.Venereol.*, v. 137 Suppl 3, n. S97-103, 2010

BIESALSKI, H. K.; NOHR, D. New aspects in vitamin a metabolism: the role of retinyl esters as systemic and local sources for retinol in mucous epithelia. *J.Nutr.*, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3453S-3457S, 2004

BIRD, L. Macrophages yo-yo during weight loss. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 10, n. 11, p. 750-2010

BLALOCK, J. E.; GIFFORD, G. Suppression of interferon production by vitamin A. *J.Gen.Virol.*, v. 32, n. 1, p. 143-147, 1976

BODEN, E. K.; SNAPPER, S. B. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr.Opin.Gastroenterol.*, v. 24, n. 6, p. 733-741, 2008

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand.J.Immunol.*, v. 70, n. 6, p. 505-515, 2009

BRAUS, N. A.; ELLIOTT, D. E. Advances in the pathogenesis and treatment of IBD. *Clin.Immunol.*, v. 132, n. 1, p. 1-9, 2009

CHEN, M. L.; YAN, B. S.; BANDO, Y.; KUCHROO, V. K.; WEINER, H. L. Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.*, v. 180, n. 11, p. 7327-7337, 2008

CHO, J. Y.; CHI, S. G.; CHUN, H. S. Oral administration of docosahexaenoic acid attenuates colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Mol.Nutr.Food Res.*, v. 2010

COLGAN, J.; ROTHMAN, P. All in the family: IL-27 suppression of T(H)-17 cells. *Nat.Immunol.*, v. 7, n. 9, p. 899-901, 2006

COOMBES, J. L.; SIDDIQUI, K. R.; ARANCIBIA-CARCAMO, C. V.; HALL, J.; SUN, C. M.; BELKAID, Y.; POWRIE, F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J.Exp.Med.*, v. 204, n. 8, p. 1757-1764, 2007

CORR, S. C.; GAHAN, C. C.; HILL, C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, v. 52, n. 1, p. 2-12, 2008

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; KUTCHUKHIDZE, N.; SHEN, S.; DING, Y.; YEE, H.; LAFAILLE, J. J. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity.*, v. 29, n. 1, p. 114-126, 2008

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.*, v. 30, n. 5, p. 626-635, 2009

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun.Rev.*, v. 3, n. 5, p. 394-400, 2004

DURIANCIK, D. M.; LACKEY, D. E.; HOAG, K. A. Vitamin A as a regulator of antigen presenting cells. *J.Nutr.*, v. 140, n. 8, p. 1395-1399, 2010

ELEDRISI, M. S.; MCKINNEY, K.; SHANTI, M. S. Vitamina A Toxicity. *Contributor Information and Disclosures*, v. 2009

FAGARASAN, S.; KINOSHITA, K.; MURAMATSU, M.; IKUTA, K.; HONJO, T. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature*, v. 413, n. 6856, p. 639-643, 2001

FAGARASAN, S.; WATANABE, N.; HONJO, T. Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. *Immunol.Rev.*, v. 176, n. 205-215, 2000

FARIA, A. M.; FICKER, S. M.; SPEZIALI, E.; MENEZES, J. S.; STRANSKY, B.; VERDOLIN, B. A.; LAHMANN, W. M.; RODRIGUES, V. S.; VAZ, N. M. Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 31, n. 1, p. 35-48, 1998

FARIA, A. M.; MARON, R.; FICKER, S. M.; SLAVIN, A. J.; SPAHN, T.; WEINER, H. L. Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Autoimmun.*, v. 20, n. 2, p. 135-145, 2003

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv.Immunol.*, v. 73, n. 153-264, 1999

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. *Immunol.Rev.*, v. 206, n. 232-259, 2005

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin.Dev.Immunol.*, v. 13, n. 2-4, p. 143-157, 2006

FAZIO, S.; BABAEV, V. R.; MURRAY, A. B.; HASTY, A. H.; CARTER, K. J.; GLEAVES, L. A.; ATKINSON, J. B.; LINTON, M. F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 94, n. 9, p. 4647-4652, 1997

FELIPE, F.; MERCADER, J.; RIBOT, J.; PALOU, A.; BONET, M. L. Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1740, n. 2, p. 258-265, 2005

FINA, D.; SARRA, M.; FANTINI, M. C.; RIZZO, A.; CARUSO, R.; CAPRIOLI, F.; STOLFI, C.; CARDOLINI, I.; DOTTORI, M.; BOIRIVANT, M.; PALLONE, F.; MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology*, v. 134, n. 4, p. 1038-1048, 2008

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.*, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vitamin A. v. 7, p. 2001

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin.Chem.*, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982

GARCIA, A. L.; RUHL, R.; HERZ, U.; KOEBNICK, C.; SCHWEIGERT, F. J.; WORM, M. Retinoid- and carotenoid-enriched diets influence the ontogenesis of the immune system in mice. *Immunology*, v. 110, n. 2, p. 180-187, 2003

GARRETT, W. S.; LORD, G. M.; PUNIT, S.; LUGO-VILLARINO, G.; MAZMANIAN, S. K.; ITO, S.; GLICKMAN, J. N.; GLIMCHER, L. H. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell*, v. 131, n. 1, p. 33-45, 2007

GOMES-SANTOS, A. C.; HORTA, B. C.; CASTRO JR.A.B.; MOREIRA, T. G.; HUDSON, L.; REZENDE, R. M.; MCCAFFERTY, D. M.; CARA, D. C.; MIYOSHI, A; FARIA, A. M. C. Oral administration of HSP-65-producing *Lactococcus lactis* modulates experimental colitis. *XXXV Congress of the Brazilian Society of Immunology*, v. 2010

GOODWIN, T. W. Carotenoids. *Annu.Rev.Biochem.*, v. 24, n. 497-522, 1955

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

HENDERSON, P.; VAN LIMBERGEN, J. E.; SCHWARZE, J.; WILSON, D. C. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.*, v. 17, n. 1, p. 382-395, 2011

HILL, J. A.; HALL, J. A.; SUN, C. M.; CAI, Q.; GHYSELINCK, N.; CHAMBON, P.; BELKAID, Y.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4⁺CD44^{hi} Cells. *Immunity.*, v. 29, n. 5, p. 758-770, 2008

HIRST, B. H. Dietary regulation of intestinal nutrient carriers. *Proc.Nutr.Soc.*, v. 52, n. 2, p. 315-324, 1993

ISHIHARA, S.; AZIZ, M. M.; YUKI, T.; KAZUMORI, H.; KINOSHITA, Y. Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. *J.Gastroenterol.*, v. 44, n. 11, p. 1097-1108, 2009

ITO, R.; SHIN-YA, M.; KISHIDA, T.; URANO, A.; TAKADA, R.; SAKAGAMI, J.; IMANISHI, J.; KITA, M.; UEDA, Y.; IWAKURA, Y.; KATAOKA, K.; OKANOUE, T.; MAZDA, O. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin.Exp.Immunol.*, v. 146, n. 2, p. 330-338, 2006

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 27, n. 313-338, 2009

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat.Res.*, v. 622, n. 1-2, p. 58-69, 2007

KHEIRVARI, S.; UEZU, K.; YAMAMOTO, S.; NAKAYA, Y. High-dose dietary supplementation of vitamin A induces brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor production in mice with simultaneous deficiency of vitamin A and zinc. *Nutr.Neurosci.*, v. 11, n. 5, p. 228-234, 2008

KIM, C. H. Roles of retinoic acid in induction of immunity and immune tolerance. *Endocr.Metab Immune.Disord.Drug Targets.*, v. 8, n. 4, p. 289-294, 2008

KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M.; SAGARA, E. A model for dextran sodium sulfate (DSS)-induced mouse colitis: bacterial degradation of DSS does not occur after incubation with mouse cecal contents. *Exp.Anim*, v. 51, n. 2, p. 203-206, 2002

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J.Vet.Med.Sci.*, v. 61, n. 1, p. 67-70, 1999

KOGA, T.; KWAN, P.; ZUBIK, L.; AMEHO, C.; SMITH, D.; MEYDANI, M. Vitamin E supplementation suppresses macrophage accumulation and endothelial cell expression of adhesion molecules in the aorta of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, v. 176, n. 2, p. 265-272, 2004

KRAUSS, S.; BUTTGEREIT, F.; BRAND, M. D. Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1412, n. 2, p. 129-138, 1999

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol.Res.*, v. 61, n. 3, p. 219-225, 2010

LEV, R.; SPICER, S. S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J.Histochem.Cytochem.*, v. 12, n. 309-1964

LUKAS, M. [Hepatobiliary complications of idiopathic intestinal inflammations]. *Cas.Lek.Cesk.*, v. 136, n. 4, p. 106-110, 1997

MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G.; PENDER, S. L. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand.J.Immunol.*, v. 51, n. 1, p. 2-9, 2000

MACPHERSON, A. J.; GATTO, D.; SAINSBURY, E.; HARRIMAN, G. R.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, v. 288, n. 5474, p. 2222-2226, 2000

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 4, n. 6, p. 478-485, 2004

MARUYA, M.; SUZUKI, K.; FUJIMOTO, H.; MIYAJIMA, M.; KANAGAWA, O.; WAKAYAMA, T.; FAGARASAN, S. Vitamin A-dependent transcriptional activation of the nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) is critical for the development and survival of B1 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 108, n. 2, p. 722-727, 2011

MASLOWSKI, K. M.; MACKAY, C. R. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat.Immunol.*, v. 12, n. 1, p. 5-9, 2011

MAZMANIAN, S. K. Gut immune balance is as easy as S-F-B. *Immunity*, v. 31, n. 4, p. 536-538, 2009

MCCAFFERTY, D. M. Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut*, v. 46, n. 3, p. 436-439, 2000

MCCAFFERTY, D. M.; SIHOTA, E.; MUSCARA, M.; WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A.; KUBES, P. Spontaneously developing chronic colitis in IL-

10/iNOS double-deficient mice. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, v. 279, n. 1, p. G90-G99, 2000

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, v. 288, n. 6, p. G1328-G1338, 2005

MENEZES, J. S.; MUCIDA, D. S.; CARA, D. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; RUSSO, M.; VAZ, N. M.; DE FARIA, A. M. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int.Immunol.*, v. 15, n. 3, p. 447-455, 2003

MENNING, A.; LODDENKEMPER, C.; WESTENDORF, A. M.; SZILAGYI, B.; BUER, J.; SIEWERT, C.; HAMANN, A.; HUEHN, J. Retinoic acid-induced gut tropism improves the protective capacity of Treg in acute but not in chronic gut inflammation. *Eur.J.Immunol.*, v. 40, n. 9, p. 2539-2548, 2010

MIROTTI, L.; MUCIDA, D.; SA-ROCHA, L. C.; COSTA-PINTO, F. A.; RUSSO, M. Food aversion: a critical balance between allergen-specific IgE levels and taste preference. *Brain Behav.Immun.*, v. 24, n. 3, p. 370-375, 2010

MORA, J. R.; IWATA, M.; EKSTEEN, B.; SONG, S. Y.; JUNT, T.; SENMAN, B.; OTIPOBY, K. L.; YOKOTA, A.; TAKEUCHI, H.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAJEWSKY, K.; ADAMS, D. H.; VON ANDRIAN, U. H. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*, v. 314, n. 5802, p. 1157-1160, 2006

MORA, J. R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat.Rev.Immunol.*, v. 8, n. 9, p. 685-698, 2008

MORA, J. R.; VON ANDRIAN, U. H. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Semin.Immunol.*, v. 21, n. 1, p. 28-35, 2009

MOSIALOU, I.; ZANNIS, V. I.; KARDASSIS, D. Regulation of human apolipoprotein m gene expression by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. *J.Biol.Chem.*, v. 285, n. 40, p. 30719-30730, 2010

MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, v. 317, n. 5835, p. 256-260, 2007

MURCH, S. H.; WALKER-SMITH, J. A. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin.Gastroenterol.*, v. 12, n. 4, p. 719-738, 1998

NEUMAN, M. G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl.Res.*, v. 149, n. 4, p. 173-186, 2007

NEURATH, M. F. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat.Med.*, v. 13, n. 1, p. 26-28, 2007

NI, J.; CHEN, S. F.; HOLLANDER, D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut*, v. 39, n. 2, p. 234-241, 1996

NISHIHARA, M.; OGURA, H.; UEDA, N.; TSURUOKA, M.; KITABAYASHI, C.; TSUJI, F.; AONO, H.; ISHIHARA, K.; HUSEBY, E.; BETZ, U. A.; MURAKAMI, M.; HIRANO, T. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int.Immunol.*, v. 19, n. 6, p. 695-702, 2007

OKAYASU, I.; HATAKEYAMA, S.; YAMADA, M.; OHKUSA, T.; INAGAKI, Y.; NAKAYA, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990

OLSON, C. R.; MELLO, C. V. Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol.Nutr.Food Res.*, v. 54, n. 4, p. 489-495, 2010

OSANAI, M.; NISHIKIORI, N.; MURATA, M.; CHIBA, H.; KOJIMA, T.; SAWADA, N. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis. *Mol.Pharmacol.*, v. 71, n. 1, p. 250-258, 2007

PEARSON, M.; TEAHON, K.; LEVI, A. J.; BJARNASON, I. Food intolerance and Crohn's disease. *Gut*, v. 34, n. 6, p. 783-787, 1993

RAJENDRAN, N.; KUMAR, D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World J.Gastroenterol.*, v. 16, n. 12, p. 1442-1448, 2010

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J.Nutr.*, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993

REIFEN, R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent. *Proc.Nutr.Soc.*, v. 61, n. 3, p. 397-400, 2002

REIFEN, R.; NUR, T.; GHEBERMESKEL, K.; ZAIGER, G.; URIZKY, R.; PINES, M. Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor-kappaB and collagen formation. *J.Nutr.*, v. 132, n. 9, p. 2743-2747, 2002

REIFEN, R.; ZAIGER, G.; UNI, Z. Effect of vitamin A on small intestinal brush border enzymes in a rat. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.*, v. 68, n. 5, p. 281-286, 1998

RUSH, M. G.; SHENAI, J. P.; PARKER, R. A.; CHYTIL, F. Intramuscular versus enteral vitamin A supplementation in very low birth weight neonates. *J.Pediatr.*, v. 125, n. 3, p. 458-462, 1994

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat.Immunol.*, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005

SAKAGUCHI, S.; POWRIE, F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, v. 317, n. 5838, p. 627-629, 2007

SMITH, J.; STEINEMANN, T. L. Vitamin A deficiency and the eye. *Int.Ophthalmol.Clin.*, v. 40, n. 4, p. 83-91, 2000

SOMMER, A. Xerophthalmia and vitamin A status. *Prog.Retin.Eye Res.*, v. 17, n. 1, p. 9-31, 1998

STEIDLER, L.; HANS, W.; SCHOTTE, L.; NEIRYNCK, S.; OBERMEIER, F.; FALK, W.; FIERS, W.; REMAUT, E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, v. 289, n. 5483, p. 1352-1355, 2000

STROBEL, S.; MOWAT, A. M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol.Today*, v. 19, n. 4, p. 173-181, 1998

STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J.Clin.Invest*, v. 117, n. 3, p. 514-521, 2007

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 20, n. 495-549, 2002

SUN, C. M.; HALL, J. A.; BLANK, R. B.; BOULADOUX, N.; OUKKA, M.; MORA, J. R.; BELKAID, Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J.Exp.Med.*, v. 204, n. 8, p. 1775-1785, 2007

SUZUKI, K.; FAGARASAN, S. How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol.*, v. 29, n. 11, p. 523-531, 2008

SUZUKI, K.; MARUYA, M.; KAWAMOTO, S.; FAGARASAN, S. Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. *Immunol.Rev.*, v. 237, n. 1, p. 180-190, 2010

SUZUKI, K.; MEEK, B.; DOI, Y.; HONJO, T.; FAGARASAN, S. Two distinctive pathways for recruitment of naive and primed IgM⁺ B cells to the gut lamina propria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 102, n. 7, p. 2482-2486, 2005

SZATMARI, I.; IACOVINO, M.; KYBA, M. The retinoid signaling pathway inhibits hematopoiesis and uncouples from the Hox genes during hematopoietic development. *Stem Cells*, v. 28, n. 9, p. 1518-1529, 2010

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; STEPANKOVA, R.; HUDCOVIC, T.; TUCKOVA, L.; CUKROWSKA, B.; LODINOVA-ZADNIKOVA, R.; KOZAKOVA, H.; ROSSMANN, P.; BARTOVA, J.; SOKOL, D.; FUNDA, D. P.; BOROVSKA, D.; REHAKOVA, Z.; SINKORA, J.; HOFMAN, J.; DRASTICH, P.; KOKESOVA, A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol.Lett.*, v. 93, n. 2-3, p. 97-108, 2004

TOKUYAMA, H.; TOKUYAMA, Y. Retinoic acid induces the expression of germ-line C alpha transcript mainly by a TGF-beta-independent mechanism. *Cell Immunol.*, v. 176, n. 1, p. 14-21, 1997

TORNBERG, U. C.; HOLMBERG, D. B-1a, B-1b and B-2 B cells display unique VHDJH repertoires formed at different stages of ontogeny and under different selection pressures. *EMBO J.*, v. 14, n. 8, p. 1680-1689, 1995

TSUJI, M.; KOMATSU, N.; KAWAMOTO, S.; SUZUKI, K.; KANAGAWA, O.; HONJO, T.; HORI, S.; FAGARASAN, S. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3⁺ T cells in gut Peyer's patches. *Science*, v. 323, n. 5920, p. 1488-1492, 2009

TSUJI, M.; SUZUKI, K.; KITAMURA, H.; MARUYA, M.; KINOSHITA, K.; IVANOV, I. I.; ITOH, K.; LITTMAN, D. R.; FAGARASAN, S. Requirement for

lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity.*, v. 29, n. 2, p. 261-271, 2008

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

UHLIG, H. H.; POWRIE, F. Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur.J.Immunol.*, v. 39, n. 8, p. 2021-2026, 2009

VELANGANNI, A. A.; DHARANEEDHARAN, S.; GERALDINE, P.; BALASUNDRAM, C. Dietary supplementation of vitamin A, C and E prevents p-dimethylaminoazobenzene induced hepatic DNA damage in rats. *Indian J.Biochem.Biophys.*, v. 44, n. 3, p. 157-163, 2007

VON BOEHMER, H. Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J.Exp.Med.*, v. 204, n. 8, p. 1737-1739, 2007

WAKABAYASHI, A.; KUMAGAI, Y.; WATARI, E.; SHIMIZU, M.; UTSUYAMA, M.; HIROKAWA, K.; TAKAHASHI, H. Importance of gastrointestinal ingestion and macromolecular antigens in the vein for oral tolerance induction. *Immunology*, v. 119, n. 2, p. 167-177, 2006

WATANABE, K.; SUGAI, M.; NAMBU, Y.; OSATO, M.; HAYASHI, T.; KAWAGUCHI, M.; KOMORI, T.; ITO, Y.; SHIMIZU, A. Requirement for Runx proteins in IgA class switching acting downstream of TGF-beta 1 and retinoic acid signaling. *J.Immunol.*, v. 184, n. 6, p. 2785-2792, 2010

WHITTEM, C. G.; WILLIAMS, A. D.; WILLIAMS, C. S. Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J.Vis.Exp.*, v. 35, p. 2010

WIEDERMANN, U.; CHEN, X. J.; ENERBACK, L.; HANSON, L. A.; KAHU, H.; DAHLGREN, U. I. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scand.J.Immunol.*, v. 44, n. 6, p. 578-584, 1996

WIRTZ, S.; NEUFERT, C.; WEIGMANN, B.; NEURATH, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat.Protoc.*, v. 2, n. 3, p. 541-546, 2007

WOOF, J. M.; KERR, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J.Pathol.*, v. 208, n. 2, p. 270-282, 2006

WOOF, J. M.; MESTECKY, J. Mucosal immunoglobulins. *Immunol.Rev.*, v. 206, n. 64-82, 2005

XU, L.; KITANI, A.; STUELTEN, C.; MCGRADY, G.; FUSS, I.; STROBER, W. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I. *Immunity.*, v. 33, n. 3, p. 313-325, 2010

ZHANG, Y.; ZOLFAGHARI, R.; ROSS, A. C. Multiple retinoic acid response elements cooperate to enhance the inducibility of CYP26A1 gene expression in liver. *Gene*, v. 464, n. 1-2, p. 32-43, 2010