



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Sarah Leão Fiorini de Aguiar

**EFEITOS IMUNOLÓGICOS DE DIETA RICA EM SAL NA COLITE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

BELO HORIZONTE

MARÇO DE 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**EFEITOS IMUNOLÓGICOS DE DIETA RICA EM SAL NA COLITE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

*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.*

Mestranda: Sarah Leão Fiorini de Aguiar

Orientadora: Prof.^a Ana Maria Caetano de Faria

BELO HORIZONTE

MARÇO DE 2014

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: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Digo: o real não está na saída nem na chegada, ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.”

João Guimarães Rosa

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade da vida!

Agradeço aos meus pais Lincoln e Meire pelo amor incondicional e por terem feito suas as minhas aspirações! Pelo exemplo de vida, caráter e retidão! Vocês foram meus primeiros e melhores professores!

Ao Paulo, meu grande e eterno companheiro, pelo carinho, presença, compreensão e incentivo! Pelos fins de semana no ICB me acompanhando! E por fazer meus dias mais felizes!

À professora Ana Maria pelo carinho com que abriu as portas do LIB para mim e principalmente pelo incentivo na ciência e exemplo de pesquisadora!

Aos amigos do LIB que foram fundamentais para a realização de todo esse trabalho: desde discussões científicas, ajuda nos experimentos até as confraternizações e brincadeiras gostosas que fizeram mais agradáveis os momentos de trabalho... Adna, Luísa, Mauro, Dani, Mari, Samara, Dani USP, Thaís, Guilherme, Gabi, Laila, Ana Cris, Luiz, Nathália, Robs e Dantas, muito obrigada!

Às queridas amigas da Nutrição! Vocês sempre foram e serão essenciais.

Aos amigos de Bases pelas conversas pelo corredor e torcida sempre.

Aos amigos do CMBH por estarem sempre comigo!

À Juliana Lauar pelos primeiros ensinamentos na vida científica.

À Ildinha e Hermes por cuidarem tão bem do nosso biotério. À Dona Carminha por manter nosso laboratório sempre em boas condições de trabalho.

Aos camundongos por permitirem que meus experimentos se tornassem realidade!

SUMÁRIO

Sumário	6
Lista de Abreviaturas.....	I
Lista de Figuras.....	IV
Figura 1. Representação dos elementos formadores do GALT.....	IV
Figura 2. Representação esquemática do complexo juncional de células epiteliais do intestino.	IV
Figura 3. O epitélio e as <i>tight junctions</i> como integrantes da homeostase da mucosa intestinal.....	IV
Figura 4. Desequilíbrio das citocinas entre células T efetoras e células T reguladoras.	IV
Figura 5. Respostas Th17 e os efeitos de altas concentrações de sal.	IV
Figura 6. Esquema representativo da estratégia utilizada para determinação das células reguladoras, macrófagos e neutrófilos.	IV
Figura 7. Avaliação do peso dos animais durante o primeiro protocolo experimental.....	IV
Figura 8. Consumo de dextrana sulfato de sódio (DSS) e consumo de dieta nos grupos experimentais.....	IV
Figura 9. Avaliação do quadro clínico e alterações histológicas na colite ulcerativa murina. .	IV
Figura 10. Avaliação do peso dos animais durante o segundo protocolo experimental.	IV
Figura 11. Consumo de dextrana sulfato de sódio (DSS) e consumo de dieta nos grupos experimentais.....	IV
Figura 12. Avaliação do quadro clínico e alterações histológicas na colite ulcerativa murina. V	
Figura 13. Concentração de IFN- γ , IL-10 e IL-17 no baço, linfonodos (mesentéricos e cecal) e no cólon e IL-23 no cólon.	V
Figura 14. Concentração de sIgA no lavado do intestino delgado.....	V
Figura 15. Peso do baço.	V
Figura 16. Percentual de células reguladoras no baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal.....	V
Figura 17. Expressão de CCR2, CD86, Ly6C e Ly6G em células do baço, linfonodo cecal e linfonodos mesentéricos.....	V
Figura 18. Quantificação da enzima NAG e da enzima MPO no cólon.	V

Figura 19. Concentração de ureia e de creatinina no soro.	V
Figura 20. Concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de hemácias, plaquetas, leucócitos e linfócitos.....	V
Figura 21. Concentração de IFN- γ , IL-10, IL-17 e IL-23 no cólon.....	V
Lista de Tabelas	VI
1 Resumo e Abstract	1
1. Resumo e Abstract	2
1.1 Resumo.....	2
1.2 Abstract	3
2 Introdução	4
2. INTRODUÇÃO	5
2.1 A mucosa intestinal	5
2.2 Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)	11
2.3 Modelos animais nas Doenças Inflamatórias Intestinais	16
2.4 Respostas celulares do tipo Th17	21
2.5 O Cloreto de Sódio	22
2.6 A indução de resposta Th 17 por meio do Cloreto de Sódio.....	24
3 Objetivos.....	28
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 Materiais e Métodos	30
4. Materiais e Métodos	31
4.1 Animais experimentais	31
4.2 Desenho Experimental	31
4.3 Indução da colite	39
4.4 Dieta	39
4.5 Avaliação do peso corpóreo dos animais.....	42

4.6	Avaliação do consumo de dieta	42
4.7	Avaliação do Índice Clínico da doença	42
4.8	Avaliação histológica	43
4.9	Comprimento do cólon	45
4.10	Coleta de sangue e soro	45
4.11	Coleta do muco intestinal	45
4.12	Análise Histológica	46
4.13	Dosagem de Ureia	46
4.14	Dosagem de Creatinina	46
4.15	Hemograma.....	47
4.17	Preparo das amostras para a medida da atividade das enzimas MPO e NAG Dosagem de NAG	47
4.18	Quantificação indireta da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no cólon	48
4.19	Quantificação indireta da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG).....	49
4.20	Dosagem de citocinas nos extratos de tecido de baço, linfonodos mesentéricos, linfonodo cecal e cólon	49
4.21	Citometria de fluxo.....	51
4.22	Análises estatísticas.....	56
4.23	Soluções utilizadas	56
5	Resultados	62
5.	Resultados	63
5.1	Resultados Parte I.....	63
	5.1.1 A dieta rica em sal provocou o agravamento da colite	63
5.2	Resultados Parte II.....	69
	5.2.1 A dieta rica em sal causa o agravamento da colite	69
	5.2.2 A dieta rica em sal modificou o perfil de citocinas na colite	74
	5.2.3 A dieta rica em sal levou a menor produção de sIgA	77
	5.2.4 Dieta rica em sal aumenta o peso do baço nos animais com colite	78
	5.2.5 Dieta rica em sal modifica o fenótipo de células em animais com colite	78

5.3 Resultados Parte III.....	84
5.3.1 A dieta rica em sal não alterou a N- acetilglicosamidase (NAG) no cólon dos animais com colite	84
5.3.2 A dieta rica em sal modificou a produção de mieloperoxidase (MPO) no cólon dos animais com colite	84
5.4 Resultados Parte IV	86
5.4.1 A dieta rica em NaCl modificou exames bioquímicos dos animais sem colite	86
5.4.2 As dietas ricas em sal modificaram a concentração de hemácias, de hemoglobina, do hematócrito e das plaquetas dos animais com colite	88
5.4.3 Os leucócitos e linfócitos totais não foram alterados com as dietas ricas em sal	88
5.4.4 As dietas ricas em sal levaram a alterações no perfil de citocinas	90
5.5 Resumo dos resultados	92
6 Discussão	93
6. Discussão	94
6.1 Discussão: Hipótese de mecanismo de ação do sal no agravamento da colite	107
7 Conclusão	108
7. Conclusão	109
8 Perspectivas.....	110
8. Perspectivas	111
9 Referências Bibliográficas.....	112
9. Referências Bibliográficas	113
Anexo 1. Protocolo de submissão à Comissão de Ética no uso de animais	128

Lista de Abreviaturas

AIN	Instituto Americano de Nutrição
APC	Células apresentadoras de antígenos
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSS	Dextrana sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
FAE	Epitélio associado ao folículo
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FoxO	<i>Forkhead box O</i>
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
HE	Hematoxilina e Eosina
HSD	<i>High Salt Diet</i> (dieta rica em sal)
IEL	Linfócitos intraepiteliais
IFN	Interferon
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
LAP	Peptídeo associado à latência

LP	Lâmina própria
LPL	Linfócitos da lâmina própria
MAPK	Proteína quinase de mitógeno ativado
MCP-1	Proteína Quimioatraente para Monócitos 1
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MLCK	Miosina de cadeia leve quinase
MNC	Células mononucleares
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NAG	N-acetilglicosaminidase
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NKT	Célula T Matadora Natural – T Natural Killer
PBS	Salina tamponada com fosfato
PP	Placa de Peyer
PPR	Receptor de reconhecimento de padrão
RA	Ácido retinóico
ROR	RAR-related orphan receptor
RPMI	Meio para cultura de células desenvolvido pelo “Institute Roswell Park Memorial”
SCID	Imunodeficiência severa combinada

SED	Domo subeptelial
SGK1	Proteína quinase regulada por glicocorticoide
sIgA	Imunoglobulina A secretória
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TH	Célula T auxiliar
TLR	Receptores do tipo Toll
TNBS	2, 4, 6 ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
UC	Colite ulcerativa
WHO	<i>World and Health Organization</i>
ZO	Zonula occludens
WNK	Proteína quinase deficiente em lisina

Lista de Figuras

Figura 1. Representação dos elementos formadores do GALT.

Figura 2. Representação esquemática do complexo juncional de células epiteliais do intestino.

Figura 3. O epitélio e as *tight junctions* como integrantes da homeostase da mucosa intestinal.

Figura 4. Desequilíbrio das citocinas entre células T efectoras e células T reguladoras.

Figura 5. Respostas Th17 e os efeitos de altas concentrações de sal.

Figura 6. Esquema representativo da estratégia utilizada para determinação das células reguladoras, macrófagos e neutrófilos.

Figura 7. Avaliação do peso dos animais durante o primeiro protocolo experimental.

Figura 8. Consumo de dextrana sulfato de sódio (DSS) e consumo de dieta nos grupos experimentais.

Figura 9. Avaliação do quadro clínico e alterações histológicas na colite ulcerativa murina.

Figura 10. Avaliação do peso dos animais durante o segundo protocolo experimental.

Figura 11. Consumo de dextrana sulfato de sódio (DSS) e consumo de dieta nos grupos experimentais.

Figura 12. Avaliação do quadro clínico e alterações histológicas na colite ulcerativa murina.

Figura 13. Concentração de IFN- γ , IL-10 e IL-17 no baço, linfonodos (mesentéricos e cecal) e no cólon e IL-23 no cólon.

Figura 14. Concentração de sIgA no lavado do intestino delgado.

Figura 15. Peso do baço.

Figura 16. Percentual de células reguladoras no baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal.

Figura 17. Expressão de CCR2, CD86, Ly6C e Ly6G em células do baço, linfonodo cecal e linfonodos mesentéricos.

Figura 18. Quantificação da enzima NAG e da enzima MPO no cólon.

Figura 19. Concentração de ureia e de creatinina no soro.

Figura 20. Concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de hemácias, plaquetas, leucócitos e linfócitos.

Figura 21. Concentração de IFN- γ , IL-10, IL-17 e IL-23 no cólon.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Componentes da dieta AIN-93G

Tabela 2. Composição mineral da dieta padrão AIN-93G e da dieta rica em sal

Tabela 3. Escore (índice) clínico da doença

Tabela 4. Índice histológico

1 RESUMO E ABSTRACT

1. Resumo e Abstract

1.1 Resumo

A mucosa intestinal é a maior superfície de contato com o ambiente externo. O trato gastrointestinal está em constante interação com a microbiota e antígenos da dieta. Em condições normais, essa interação leva a mecanismos imunorreguladores que resultam em tolerância a esses antígenos. Qualquer falha nesses mecanismos pode resultar em respostas inflamatórias que incluem as doenças inflamatórias intestinais (DII) tais como a Doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC). A mucosa intestinal contém populações de células T reguladoras (Tregs), células Th1, Th2 e Th17 sendo que a inflamação (colite) resulta da redução da atividade das Tregs e/ou da exacerbação de células T efectoras. Existe um aumento de citocinas relacionada às células Th17 na CD e principalmente na UC. A dieta tem sido apontada como um fator de risco para as DIIs e as doenças autoimunes. Um componente específico da dieta muito consumido na alimentação ocidental é o NaCl, o sal de cozinha. Alguns estudos mostraram que um pequeno aumento na concentração de sal pode levar ao aumento na geração de células Th17 patogênicas pela ativação da quinase SGK1. Assim, espera-se que a dieta rica em sal possa levar ao agravamento da colite induzida por DSS. Nesse estudo, a dieta rica em sal (NaCl) levou ao agravamento da colite induzida pela administração oral de solução contendo 1% de dextrana sulfato de sódio (DSS) em camundongos C57BL/6. Houve aumento do índice clínico da doença, encurtamento do cólon, aumento da produção de mieloperoxidase (MPO) assim como alteração no perfil de citocinas e frequência de várias populações de células imunes. Além disto, observamos que administração da dieta rica em NaCl por si mesma foi capaz de induzir uma colite discreta acompanhada de aumento na produção de IL-23 no cólon. O mesmo resultado de agravamento da colite induzida por DSS foi obtido com dieta rica em KCl, sal que também promove a geração de células Th17 pela sinalização via SGK1. Nossos dados sugerem, então, que dietas rica em sal foram capazes de agravar a colite induzida por DSS e esse efeito pode estar relacionado à ativação da SGK1.

1.2 Abstract

Intestinal mucosa is the major surface of contact with the external environment. The gastrointestinal tract is in constant interaction with the microbiota and the antigens from diet. Under normal conditions, this interaction would induce oral tolerance, however, any failure in intestinal homeostasis result in inflammatory reactions. These manifestations include especially inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). IBD results from a dysregulation of the balance among Treg cells and inflammatory Th1, Th2 and Th17 cells with reduction of regulatory activity of Tregs and/or overproduction of effector T cells. Recent studies have demonstrated an increased expression of Th17-related cytokines increased in both UC and CD. The diet has been long seen as a potential risk factor for the increased incidence of autoimmune diseases and IBD. A specific factor, which has been changing in the Western diet over time, is NaCl intake. Studies have demonstrated an increase in Th-17 cells in inflammatory diseases in the presence of small amounts of salt by the activation of SGK1 kinase. Thus, it is expected that the presence of salt in the diet of mice with colitis, would lead to an aggravation of inflammation. Our aim in this study was to test this possibility and to analyze the cellular mechanisms involved in the putative exacerbation of colitis induced by oral administration of 1% dextran sodium sulfate (DSS) in C57BL/6 mice. The high-salt diet led to worsening of colitis with increased clinical index, shortening of the colon, increased myeloperoxidase (MPO) production as well as altered cytokine profile and frequency of immune cells. Interestingly, administration of high salt diet alone was able to increase disease severity and IL-23 production in the colon. The same enhancing effect on DSS-induced colitis was observed with a diet rich in KCl, a salt that also induces SGK1. Thus, our results suggest that high-salt diets were capable of worsen colitis and this effect may be related to activation of SGK1.

2 INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

2.1 A mucosa intestinal

O epitélio intestinal é a superfície de maior área do corpo humano em contato direto com o ambiente externo e encontra-se em constante contato com uma gama de microrganismos, macromoléculas e xenobióticos. A superfície intestinal tem aproximadamente 300 m², devido aos milhões de microvilos no intestino delgado. Essa área é revestida por uma camada simples de enterócitos com 30 µm de espessura, cada célula interconectada a sua vizinha por meio de desmossomos e proteínas que promovem sua aderência, além das *tight junctions* (MACDONALD, 2003).

Devido a essa exposição constante, é necessária uma fina regulação das funções do sistema imune e do tecido linfoide presente na mucosa intestinal para desenvolver uma resposta inflamatória rápida e controlada contra patógenos, mas também manter a homeostase intestinal em condições fisiológicas. As complexas interações entre os diferentes tipos celulares efetores do sistema imune inato e adaptativo, regulam o perfil inflamatório da mucosa intestinal. Citocinas pró- e anti-inflamatórias aparecem como elementos chave na modulação e manutenção da comunicação entre os vários tipos celulares e o balanço entre esses tipos celulares é crítico para a homeostase intestinal. Diversas evidências demonstram a importância da desregulação das citocinas na ocorrência das doenças inflamatórias intestinais (DII's) (KASER; ZEISSIG; BLUMBERG, 2010).

O intestino possui mecanismos de defesa que limitam o acesso de substâncias prejudiciais ao organismo. A barreira intestinal é formada por vários elementos que incluem enzimas digestivas pancreáticas, o epitélio intestinal e a microbiota. Porém, o mecanismo de proteção mais efetivo é o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), que é o maior tecido linfoide do organismo e

desempenha um importante papel na manutenção da homeostase intestinal (MOWAT, 2003).

Estruturalmente, o GALT é dividido em dois compartimentos: a) GALT organizado: folículos linfoides isolados, folículos linfoides associados ou Placas de Peyer e linfonodos mesentéricos; b) GALT difuso: populações de linfócitos intercalados entre as células epiteliais (linfócitos intraepiteliais, IELs) ou na lâmina própria intestinal (linfócitos da lâmina própria, LPLs) (MOWAT, 2003). A figura 1 esquematiza esses dois compartimentos do GALT.

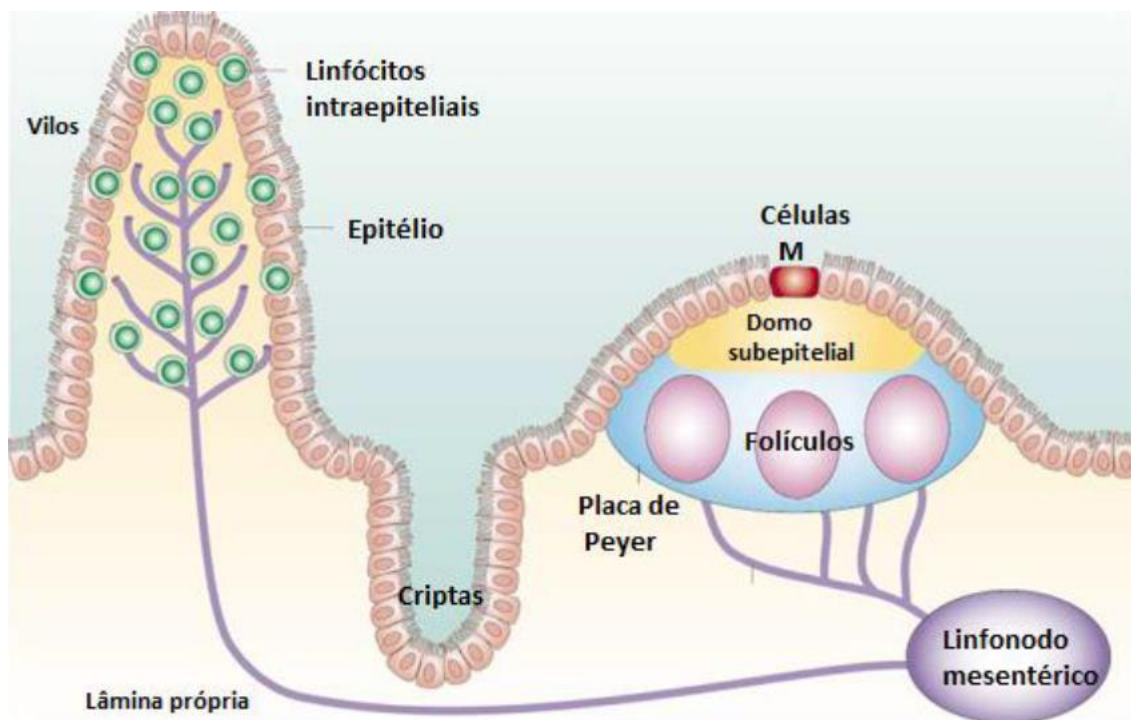


Figura 1. Representação dos elementos formadores do GALT. O tecido linfóide organizado, formado pelas placas de Peyer e pelos linfonodos mesentéricos, é envolvido na indução de imunidade e de tolerância, enquanto que os locais efetores (tecido linfóide difuso), formado pelos linfócitos intraepiteliais e células da lâmina própria, são dispersos por toda a extensão da mucosa. Tanto as placas de Peyer quanto os vilos da lâmina própria são drenados por vasos linfáticos aferentes que chegam até os linfonodos mesentéricos. Imediatamente abaixo do epitélio, está localizado o domo subepitelial (SED) das placas de Peyer. Adaptado de Mowat, 2003.

As Placas de Peyer constituem áreas macroscópicas de agregação linfoide localizadas na submucosa ao longo do intestino delgado. O tecido linfoide é separado do lúmen intestinal por uma monocamada de células (follicle-associated epithelium, FAE) e por uma área mais difusa localizada imediatamente abaixo do epitélio conhecida como domo subepitelial (*SED-subepithelial dome*). A FAE, que se diferencia do epitélio por ter níveis menores de enzimas digestivas e a borda em escova menos pronunciada, é formada por uma coluna de células epiteliais, células M, IELs e células secretoras de muco (células caliciformes). As células M são enterócitos que não possuem glicocálix, são pregueadas ao invés de apresentarem microvilosidades como as outras células epiteliais, sendo especializadas na captura de antígenos do lúmen. As áreas interfoliculares abrangem os linfócitos T, principalmente do tipo T helper (Th), células dendríticas maduras e macrófagos. As placas de Peyer contêm numerosos folículos compostos células B expressando IgM, que são precursoras de células B produtoras de IgA. A ativação dos linfócitos B e o processo de troca de isotipos que torna essas células capazes de produzir IgA ocorre nos centros germinativos desses folículos. Os linfonodos mesentéricos são os maiores linfonodos do corpo. Devido às suas características anatômicas específicas, provavelmente são o cruzamento entre as vias de recirculação periférica e da mucosa (MOWAT, 2003).

Nem toda a IgA secretória (sIgA) presente no muco intestinal é produzida pelos linfócitos B2 das placas de Peyer. Pelo menos 50% da produção dessas imunoglobulinas ocorre por linfócitos B1 presentes na lamina própria que se tornam IgA+ em um processo independente de linfócitos T CD4+ (SUTHERLAND and FAGARASAN, 2012).

Com relação aos componentes extracelulares da mucosa, a maior extensão de sua superfície é coberta por um gel hidratado formado por mucinas. Essas mucinas são secretadas por células epiteliais especializadas,

como as células caliciformes do intestino. É criado, então, um obstáculo que previne o contato direto de grandes partículas, principalmente bactérias, com a camada de células epiteliais (JOHANSSON et al., 2008).

Na falta de transportadores específicos, a camada epitelial é impermeável à maioria dos solutos hidrofílicos. Assim, defeitos diretos nas células epiteliais, como aqueles provocados por irritantes da mucosa ou agentes citotóxicos (incluindo fármacos usados em quimioterapia), resultam em uma expressiva perda da barreira da mucosa. Em contrapartida, em uma camada epitelial intacta, a via paracelular é mantida selada. Essa função é mediada pelo complexo juncional apical, formado pelas *tight junctions* e pelas zônulas de adesão (figura 2). Ambas são mantidas por um anel de actina e miosina (TURNER, 2009).

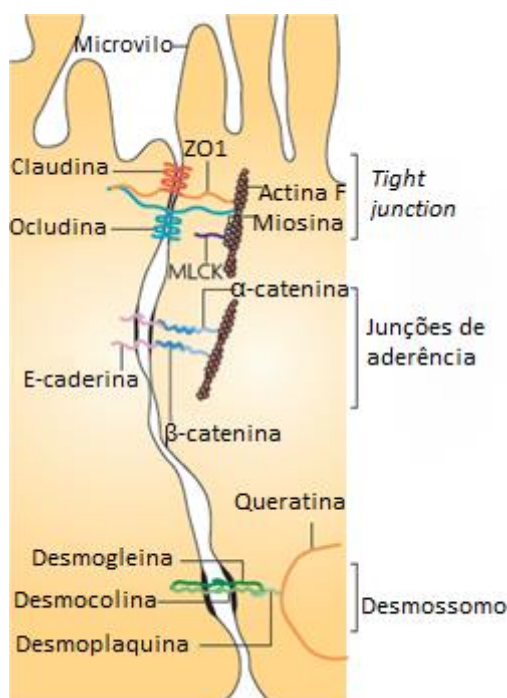


Figura 2. Representação esquemática do complexo juncional de células epiteliais do intestino. Logo abaixo da base do microvilos, a membrana plasmática das células adjacentes parece se fundir com as *tight junctions*, onde claudinas, ZO1, ocludinas e F-actinas interagem. A E-caderina, α-catenina, β-catenina, δ1-catenina e F-actina interagem para formar as junções de aderência. A quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) fica associada ao anel de actomiosina. Os desmossomos são localizados abaixo do complexo juncional apical, sendo formados por desmogleínas, desmocolinas, desmoplaquinas e filamentos de queratina. Adaptado de Turner *et al.*, 2009.

As junções de aderência, juntamente com os desmossomos (junções adesivas que conectam células epiteliais adjacentes), promovem a forte ligação adesiva que mantém a proximidade celular e são os locais de comunicação intercelular. A perda de aderência resulta na ruptura do contato célula-célula e célula-matriz, na ineficiência da polarização e diferenciação celular, além de apoptose prematura (STROCCHI et al., 1996).

As junções de aderência são mantidas por caderinas, uma família de proteínas transmembranas que formam interações fortes e homotípicas com moléculas em células adjacentes. São requeridas para a montagem das *tight junctions*, selando o espaço paracelular. As *tight junctions* são complexos multi-proteínas compostos por proteínas transmembranas, proteínas de membrana e moléculas regulatórias, incluindo quinases. A família das claudinas são as mais importantes proteínas transmembranas, que definem diversos aspectos da permeabilidade. A ocludina, outra proteína transmembranas das *tight junctions*, interage diretamente com as claudinas e actinas. Proteínas de membrana periféricas, como as *zonula ocludens* 1 e 2 (ZO1 e ZO2), são cruciais para a montagem e manutenção das *tight junctions*, principalmente devido ao fato de essas proteínas possuírem múltiplos domínios para interação com outras proteínas, incluindo as claudinas, ocludinas e actinas (TURNER, 2009).

As barreiras das *tight junctions* integram a relação entre o material luminal e a função imune da mucosa (figura 3). Na maioria dos indivíduos, é uma relação saudável, na qual a regulação aumenta na permeabilidade ou em defeitos transitórios das células epiteliais, desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IFN- γ , bem como atividades imunorreguladoras. Essas atividades imunorreguladoras incluem células dendríticas CD103+ capazes de produzir TGF- β e ácido retinóico, sendo ambos essenciais para a diferenciação de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ (COOMBES et al., 2007; MUCIDA et al., 2007). O equilíbrio entre respostas pró-inflamatórias e reguladoras pode falhar se houver respostas exageradas das citocinas pró-inflamatórias, o que pode ser decorrente de uma mutação genética, produção insuficiente de IL-10 (FISHER et al., 2008) ou uma tolerância inadequada a antígenos ou produtos microbianos (SARTOR, 2008). Com isso, a ativação de

células imunes da mucosa pode prosseguir sem controle e a liberação de citocinas como TNF e IL-13 pode levar a uma perda da barreira que, por sua vez, permite a entrada de material do lúmen e mantém o ciclo pró-inflamatório. Esse modelo demonstra os papéis da susceptibilidade do hospedeiro e dos defeitos na função da camada epitelial na patogênese das doenças inflamatórias intestinais e explica o papel crucial da barreira epitelial no modelamento das respostas imunes na mucosa (TURNER, 2009).

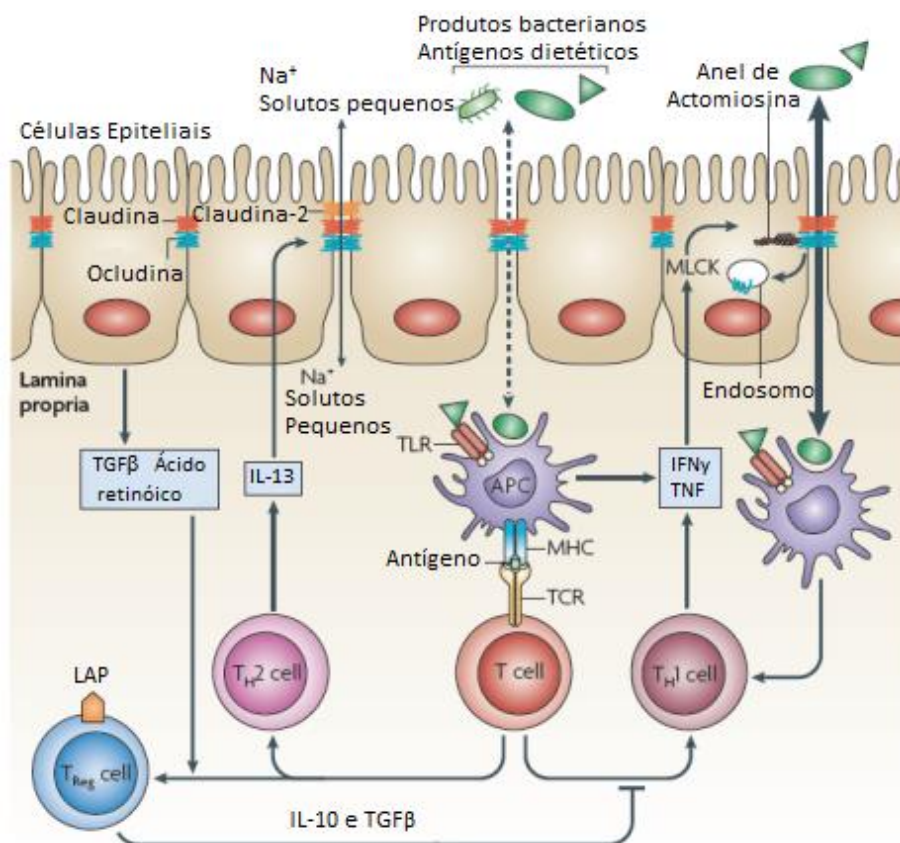


Figura 3. O epitélio e as *tight junctions* como integrantes da homeostase da mucosa intestinal. Pequenos defeitos na camada epitelial permitem que produtos microbianos e antígenos da dieta atravessem o epitélio e cheguem à lâmina própria. Se o material estranho for capturado por células apresentadoras de antígenos (APCs), pode direcionar para a diferenciação de células TH1 ou TH2 e o desenvolvimento de doença. Nesse caso, as APCs e células TH1 podem liberar TNF e IFN- γ que sinalizam para células epiteliais a necessidade de aumentarem o fluxo através das *tight junctions*, permitindo maior entrada de produtos bacterianos e antígenos dietéticos e assim levando ao ciclo inflamatório. A IL-13 liberada por células TH2 pode aumentar o fluxo através dos poros seletivos de cátion, contribuindo para o estabelecimento da inflamação. Por outro lado, a homeostase pode prevalecer se as APCs promoverem a diferenciação em células T reguladoras (Treg), induzidas por TGF- β e ácido retinóico. As células Treg CD4+ que apresentam TGF- β /LAP em sua superfície podem secretar IL-10 e TGF- β e prevenir a inflamação da mucosa. Adaptado de Turner *et al.*, 2009.

Nesse contexto, o tecido linfoide associado à mucosa se apresenta como interface entre o organismo e seu meio ambiente. Em condições fisiológicas, as duas principais atividades imunológicas que ocorrem nesse tecido são anti-inflamatórias: a) exclusão mediada pela sIgA que limita o contato com o epitélio e impede a entrada de microrganismos e outros antígenos com potencial patogênico e b) mecanismos de imunorregulação que inibem a reatividade inflamatória contra antígenos inócuos do lúmen (BRANDTZAEG et al., 2009).

A segunda estratégia, conhecida como tolerância oral (FARIA and WEINER, 2005; WEINER et al, 2011), depende do desenvolvimento de células T reguladoras que podem ser diferenciadas na lâmina própria via células dendríticas CD103+ ou nos linfonodos mesentéricos. As células T CD4+CD25+Foxp3+ induzidas no intestino, assim como as células T CD4+ expressando TGF- β na superfície na sua forma de precursor (associado ao *latent associated peptide* ou LAP) têm sido demonstradas como populações de células reguladoras fundamentais para a tolerância oral (CUROTTO DE LAFAILLE et al, 2008; REZENDE et al, 2013). Essa tolerância induzida pela alimentação e por antígenos inócuos provavelmente envolve mecanismos de supressão adicionais e um tônus de regulação negativa semelhante ao que o sistema imune normalmente faz com a microbiota existente (ARTIS, 2008; HELGELAND; BRANDTZAEG, 2000). A tolerância oral explica o fato de que a hipersensibilidade persistente aos alimentos seja relativamente rara, apesar de que, por motivos ainda não esclarecidos, esteja em ascensão nas sociedades orientais (SICHERER; SAMPSON, 2009).

2.2 Doenças Inflamatórias Intestinais (DII)

As Doenças Inflamatórias Intestinais compreendem duas formas principais: Doença de Crohn (CD) e Colite Ulcerativa (UC). A Doença de Crohn foi

primeiramente relatada pelo cirurgião germânico Wilhelm Fabry em 1623 (Wilhelm Fabry (1560-1624)--the Other Fabricius, 1964) e foi posteriormente descrita e nomeada pelo médico norte americano Burril B Crohn (CROHN, 1984). Já a colite ulcerativa foi descrita pela primeira vez pelo médico britânico Sir Samuel Wilks em 1859 (WILKS, 1859).

Essas doenças, que acometem pessoas de diferentes classes socioeconômicas, idade, sexo e nacionalidade, são relativamente frequentes, afetando aproximadamente 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos (LOFTUS et al., 2007), 2,2 milhões na Europa (NEUMAN, 2007) e cerca de 150 mil pessoas (0,5%) da população canadense (RUSSEL, 2000). Os EUA, Inglaterra, Itália, Escandinávia e norte da Europa são consideradas regiões de alta incidência; sul da Europa, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia, países de incidência intermediária, e finalmente Ásia e América do Sul, de baixa incidência (QUILICI et al., 2007). Nos locais de maiores taxas de incidência e prevalência de CD e UC, norte da Europa, Reino Unido e América do Norte, os índices estão começando a serem estabilizados. Já em áreas de menor incidência como sul da Europa, Ásia e a maior parte dos países em desenvolvimento, as taxas continuam a subir (LOFTUS JR, 2004).

Atualmente, a patogênese dessas doenças ainda não é completamente compreendida, porém sabe-se que a inflamação crônica pode ser resultante de uma resposta imune desregulada e aberrante à microbiota em um contexto de predisposição genética (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

Nas doenças inflamatórias intestinais, o equilíbrio entre células efetoras e células reguladoras do sistema imune é rompido em diversos níveis. Os antígenos do lúmen ganham acesso ao tecido subjacente à mucosa por meio de uma barreira permeável. Células do sistema imune inato e adaptativo expressam perfil e número diferentes de receptores de reconhecimento de padrões de patógenos (PPRs). Antígenos microbianos desencadeiam e

mantêm uma resposta inflamatória por meio de diferentes vias: células dendríticas mielóides falsamente reconhecem bactérias da microbiota como patógenos, começam um programa de maturação, com aumento de expressão de PPR, moléculas de histocompatibilidade e de moléculas co-estimulatórias e parada da migração. Isso leva a uma mudança no seu *status* funcional de tolerogênico para ativado inflamatório, além de promover a diferenciação de células T *naive* para células T efetoras (Th1, Th2, Th17). As células epiteliais do intestino, em um ambiente inflamado, também podem expressar moléculas co-estimulatórias, o que lhes permite funcionar como células apresentadoras de antígenos e contribuir para a resposta de células T efetoras. Dados obtidos em modelos experimentais mostram que ativação de células T e B desencadeadas por APCs também ocorrem nos centros germinativos dos linfonodos mesentéricos, onde o antígeno carregado pelas células dendríticas encontra células T e B *naive*. Além disso, células T, células T *natural killer*, granulócitos e macrófagos expressam seus próprios receptores de reconhecimento de PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) no estado inflamatório e podem se tornar ativados por essa via alternativa. Assim, no intestino inflamado, células T efetoras (Th1, Th2 e Th17) prevalecem com relação às células reguladoras (Treg e Th3) (BAUMGART; CARDING, 2007).

Na doença de Crohn, células T *naive* se diferenciam preferencialmente em células Th1 (IFN γ +, IL-12+). Na colite ulcerativa, essas células se diferenciam em células Th1 e Th2 (IL-4+, IL-5+). As células T *natural killer* são provavelmente a maior fonte de IL-13 na UC. As citocinas pró-inflamatórias secretadas pelas células T efetoras ativadas estimulam os macrófagos a secretarem grandes quantidades de TNF- α , IL-1 e IL-6. Como resultado do processo inflamatório local, numerosos leucócitos entram a partir dos vasos da mucosa e liberam quimiocinas que por sua vez atraem mais células inflamatórias o que amplifica e perpetua o ciclo vicioso. Os danos teciduais

resultam da liberação de numerosos mediadores inflamatórios (BAUMGART; CARDING, 2007).

A Doença de Crohn é associada à produção excessiva de IL-12/IL-23 e IFN- γ /IL-17. Ela afeta o intestino delgado e o cólon com ulcerações descontínuas e inflamação em qualquer extensão do trato gastrointestinal com frequentes granulomas. Os pacientes relatam sintomas gastrointestinais como dor abdominal, diarreia e sangramento retal, assim como sintomas sistêmicos (perda de peso, febre e fadiga). Pacientes com CD também podem desenvolver obstrução do intestino e fístulas entre segmentos do intestino ou entre o intestino e a pele ou outros órgãos. A colite ulcerativa caracteriza-se pela produção excessiva de IL-13. Essa doença afeta o cólon apresentando uma inflamação contínua da mucosa (FUSS et al., 2004). Os sintomas são semelhantes aos da CD, com exceção do aparecimento de fístula. A inflamação na doença de Crohn é transmural e descontínua. Em contraste, a colite ulcerativa afeta mais superficialmente as camadas mucosa e submucosa da parede intestinal (CHO, 2008). Ambas as patologias são crônicas e apresentam recidivas durante o curso (MCLEOD, 2003). O tratamento baseia-se em fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores clássicos (FEAGAN, 2003). As terapias emergentes estão se concentrando na neutralização das principais citocinas efetoras que têm sido identificadas nos últimos anos. Por exemplo, o uso de um anticorpo anti-IL-12p40 tem o objetivo de neutralizar os efeitos da IL-12 e da IL-23 na CD (FUSS et al., 2006; YEN et al., 2006). Baumgart e colaboradores propuseram possíveis alternativas terapêuticas que podem ser desenvolvidas no futuro: indução ou restabelecimento da tolerância imunológica por meio da recomposição da microbiota intestinal, introdução de engenharia de microbiota para induzir respostas imunológicas reguladoras, bloqueio de receptores de reconhecimento de padrão e de proteínas sinalizadoras, geração de células T reguladoras *in vivo* ou *in vitro* com células

dendríticas tolerogênicas ou até mesmo transferência de genes (BAUMGART; CARDING, 2007).

O esclarecimento da etiologia das doenças inflamatórias intestinais, assim como o desenvolvimento de tratamentos terapêuticos eficazes, é de extrema importância, tendo em vista que as DIIs geram repercussões importantes na qualidade de vida dos doentes. Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado incidência crescente das DIIs nas últimas décadas, particularmente em relação à doença de Crohn (LOFTUS JR, 2004).

Como descrito acima, as citocinas são os sinais chave no sistema imune intestinal e são conhecidas por participarem da ruptura da chamada inflamação controlada do intestino (inflamação fisiológica) (JUMP; LEVINE, 2004). Elas são pequenos peptídeos produzidos principalmente por células do sistema imune que facilitam a comunicação entre as células, estimulam a proliferação de células efetoras antígeno-específicas e medeiam a inflamação sistêmica e local autócrina, parácrina e as vias endócrinas (NEUMAN, 2007).

A associação de APCs, Th1, Th2, Th17, células T reguladoras e as citocinas produzidas apresentam um papel complexo nas DIIs (figura 4). Apesar de muitas respostas comuns serem mediadas por citocinas em DIIs, como a regulação de produção de mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e a inibição da apoptose, a forma como as citocinas determinam a natureza da resposta imune pode ser diferente entre a CD e a UC (INCE; ELLIOTT, 2007; MONTELEONE et al., 2006)(Ince, 2007).

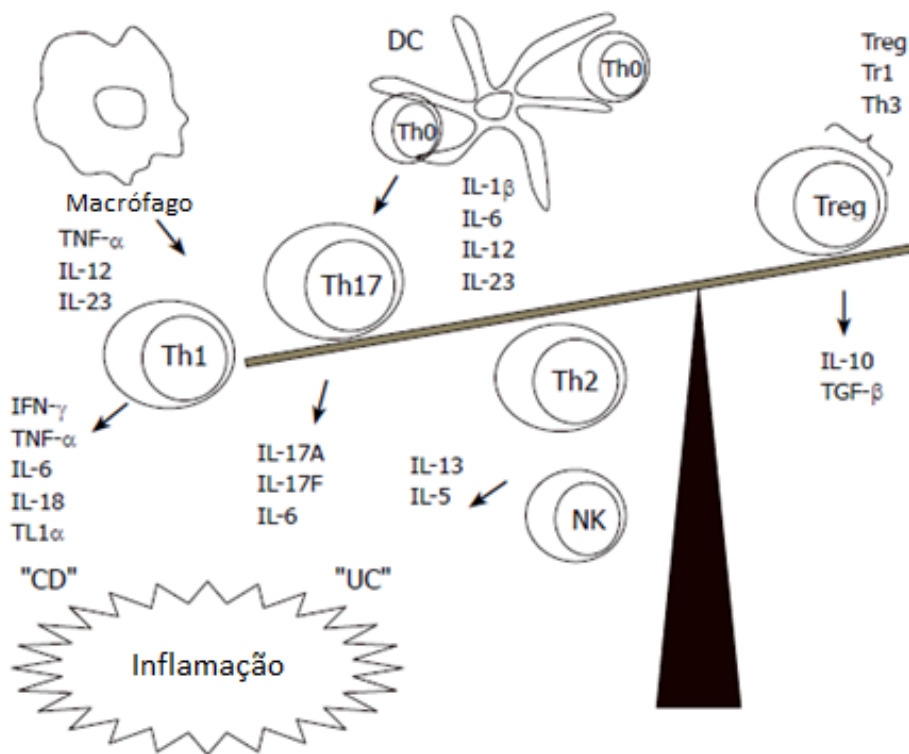


Figura 4. Desequilíbrio das citocinas entre células T efetoras e células T reguladoras nas doenças inflamatórias intestinais. A Doença de Crohn é associada com resposta mediada por células Th1, caracterizada pelo aumento da produção de IFN- γ and TNF- α . A IL-12 e IL-23 orientam a diferenciação de Th1 em associação com IL-15, IL-18 e IL-21 que induzem a estabilização da diferenciação em Th1. Por outro lado, na UC, a resposta imune local é menos polarizada, mas é caracterizada por células NKT produtoras de IL-13/IL-4 e pela produção de citocinas Th2. Adaptado de Monteleone, 2006.

2.3 Modelos animais nas Doenças Inflamatórias Intestinais

A semelhança dos mecanismos imunológicos básicos entre os mamíferos e a conservação das principais vias de sinalização celular/intercelular são fortes justificativas da escolha de modelos murinos para o estudo de inflamação intestinal. Um bom modelo animal deve permitir uma visão simplificada da complexa patologia da doença em humanos, prover um sistema tratável e reprodutível para identificar as vias inflamatórias. Os modelos murinos têm redesenhado e refinado o entendimento da interação da

microbiota no intestino e têm sido usados com sucesso para definir vias imune-mediadas da inflamação intestinal nas últimas duas décadas (POWRIE, FIONA et al., 1994)

Atualmente, há mais de 50 modelos murinos para estudo da inflamação intestinal. Tradicionalmente, os modelos murinos de colite têm sido divididos em três tipos principais: a) aqueles que são induzidos por manipulação genética, b) aqueles que dependem da transferência de populações de células CD4+CD45RB^{high} para hospedeiros imunodeficientes e c) modelos de colite induzida por agentes químicos (STROBER; FUSS; MANNON, 2007).

Diversas modificações genéticas em animais podem levar ao desenvolvimento espontâneo de inflamação intestinal, como nos camundongos deficientes para IL-10, TGF- β , IL-2 e TCR- α (STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002). Camundongos deficientes para IL-10 desenvolvem colite espontânea, com resposta Th1 que é inibida pelo tratamento com anti-IL-12. A resposta inicial nos camundongos do fundo genético 129 Sv/Ev tem um componente misto Th1 e Th17, sendo que a citocina IL-17 prevalece no início da doença. Assim como em outros modelos, o camundongo deficiente para IL-10 não desenvolve colite sob condições *germ-free* (DIELEMAN et al., 2000; ELSON et al., 2001; KULLBERG et al., 1998, GOMES-SANTOS et al, 2012).

O modelo de transferência de células foi descrito por Fiona Powrie, no qual a transferência de células CD4+CD45RB^{high} levariam ao desenvolvimento da colite (POWRIE, F. et al., 1993). Powrie e colaboradores mostraram que as células T CD4+ apresentam papel importante na indução e regulação da inflamação intestinal. A transferência de células T CD4+CD45RB^{high} de doadores normais para camundongos imunodeficientes (SCID, *severe combined immunodeficiency*) leva ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória severa no cólon (POWRIE, F. et al., 1993). A doença pode ser prevenida por meio da co-transferência de células T CD4+CD45RB^{low}, sendo

que a IL-10 é um mediador essencial produzido por essa população de células T reguladoras (ASSEMAN et al., 1999).

Na classe de modelos animais de colite induzida por agentes químicos, estão aquelas causadas pela exposição a ácido acético, éster de forbol, carrageína, polímeros de polissacarídeos glicano, sulfato de sódio dextrano (DSS), ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), entre outros (STROBER et al., 2002). Uma característica comum a esses modelos parece ser a capacidade de romper a barreira de células epiteliais e posteriormente promover o aumento da exposição celular à microbiota, como no caso do modelo de colite induzida por DSS no qual é mostrada uma alteração da barreira da mucosa antes mesmo do estabelecimento da colite (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 1999). Uma segunda característica da colite em modelos induzidos por agentes químicos é o fato da colite, nesses casos, ser relativamente independente de respostas mediadas por linfócitos. Assim, na colite induzida por DSS, na falta de linfócitos B, linfócitos T ou células NK, ainda será possível o desenvolvimento da colite em resposta ao DSS. Porém, na presença de um sistema imune intacto, contendo esses elementos celulares, o DSS leva à ativação de linfócitos e à indução de respostas Th1 ou Th2 (AXELSSON et al., 1996). O modelo de colite induzido pelo TNBS foi desenvolvido em 1995 por Neurath e colaboradores, que mostraram que o hapteno administrado de forma intra-retal juntamente com o álcool resultaria em uma inflamação severa, transmural e granulomatosa no cólon distal. A inflamação é mediada por resposta Th1 (NEURATH et al., 1995).

O modelo de colite induzido por DSS é considerado um bom modelo devido às suas similaridades com a colite ulcerativa em humanos no que se refere à etiologia, patologia, patogênese e resposta terapêutica. Além disso, a indução da colite por DSS é fácil e barata, podendo ser desenvolvida uma colite crônica ou aguda conforme o interesse (SOLOMON et al., 2010). O dextrano é um polímero de glicose complexo sintetizado por certas bactérias,

mais comumente *Leuconostoc* spp e *Streptococcus* spp, a partir de sucralose (BAILEY; BOURNE, 1961). É constituído de cadeias lineares e ramificadas, com um peso molecular altamente variável, indo de 5000 a mais de 1,4 milhões de Daltons (Da). O DSS é um derivado polianiônico do dextrano, produzido pela esterificação com ácido clorossulfônico. O conteúdo de enxofre é aproximadamente 17% o que corresponde a aproximadamente dois grupos sulfatos por resíduo glicosil da molécula de dextrano. À temperatura ambiente é um pó branco e altamente solúvel em água (100 mg/mL) (SOLOMON et al., 2010). Em 1969, foi relatado que ratos, camundongos e coelhos alimentados com água contendo extrato de algumas algas marinhas desenvolveram mudanças inflamatórias no cólon (MARCUS; WATT, 1969; WATT; MARCUS, 1969). Foi descoberto que esses extratos continham carragena, um polissacarídeo sulfatado de alto peso molecular, o que levou ao desenvolvimento do modelo de colite aguda induzida por carragena degradada em 1971 (MARCUS; WATT, 1971). Em 1985, outro polissacarídeo sulfatado, o DSS, foi reportado como indutor de colite aguda em hamsters (OHKUSA, 1985). Posteriormente, o modelo foi adaptado para camundongos (OKAYASU et al., 1990) e um modelo crônico desenvolvido para hamsters (YAMADA; OHKUSA; OKAYASU, 1992).

Atualmente, o modelo de colite induzida por DSS é um dos mais utilizados em camundongos, ratos e hamsters. Foi demonstrado que o peso molecular do DSS utilizado na indução da colite é um importante fator para a intensidade da doença. Axelsson e colaboradores sugerem que um alto conteúdo de sulfato por molécula de DSS é importante para a indução de colite (AXELSSON et al., 1996). Kitajima e colaboradores mostraram que camundongos que receberam DSS com peso molecular de 40kDa desenvolveram colite mais severa se comparado àqueles que receberam DSS 5kDa ou 500kDa (KITAJIMA; TAKUMA; MORIMOTO, 2000).

Esse modelo foi descrito primeiramente por Okayasu e colaboradores em 1990, no qual camundongos recebendo DSS oralmente desenvolviam colite aguda ou crônica semelhante à colite ulcerativa. Durante a fase aguda, o camundongo desenvolvia inflamação na mucosa colônica com ulcerações, perda de peso e diarreia sanguinolenta. A administração de três a cinco ciclos

de DSS induziu inflamação crônica, caracterizada por uma infiltração severa de células mononucleares (MNC) e mudanças regenerativas no epitélio (OKAYASU et al., 1990). Em geral, a colite aguda é induzida por meio da administração de altas concentrações de DSS (3-10%) durante curtos períodos de tempo (4-14 dias) (SOLOMON et al., 2010). A colite crônica pode ser induzida pela administração de baixas concentrações de DSS (1%) durante longos períodos de tempo (100-180 dias) (CHIBA, 1993) ou por meio da administração de três a cinco ciclos de doses relativamente altas de DSS (4-5%) durante 6-7 dias com intervalos de 6-14 dias com substituição do DSS por água (COOPER, H. S. et al., 2000; GAUDIO et al., 1999; OKAYASU et al., 1990).

As manifestações da colite por DSS incluem diarreia, sangue oculto nas fezes, perda de peso, perda de apetite, perda de movimentos, piloereção, anemia e eventualmente morte. O aparecimento e severidade desses sintomas dependem da espécie animal, da concentração de DSS e da duração da administração. No modelo agudo, o sangue oculto e a diarreia são normalmente os primeiros a aparecer, podendo ocorrer a partir do dia 2 (KULLMANN et al., 2001) inflamação é completamente estabelecida entre 7 e 10 dias, porém, ocorrendo a suspensão da administração de DSS, o animal pode recuperar-se. (MÄHLER et al., 1998).

Os mecanismos pelos quais o DSS induz a colite ainda não são claros. Porém, há propostas nas quais a colite seria resultado dos efeitos tóxicos no epitélio e o conseqüente aumento da exposição a antígenos do lúmen causados pela destruição do conteúdo de mucinas ou função alterada de macrófagos, devido à ingestão de DSS (KITAJIMA et al., 1999; NI; CHEN; HOLLANDER, 1996; OKAYASU et al., 1990). Foi demonstrado que a inflamação resultante inclui células polimorfonucleares, macrófagos e células B e T. Porém, Dieleman e colaboradores mostraram que camundongos com imunodeficiência severa, que não possuíam células B ou T, foram capazes de desenvolver a colite induzida por DSS com mesmas características clínicas e histológicas, sugerindo que o sistema imune adaptativo não é essencial para a colite aguda induzida por DSS (DIELEMAN et al., 1994).

Além de todas as vantagens apresentadas pelo modelo de colite induzida pelo DSS, há estudos que validaram o modelo por meio da utilização de diferentes agentes terapêuticos para doenças inflamatórias intestinais em humanos que mostraram que a colite induzida por DSS pode ser usada como um modelo relevante para tradução dos dados de camundongos para a colite ulcerativa em humanos (MELGAR et al., 2008).

2.4 Respostas celulares do tipo Th17

As células T CD4⁺ apresentam um papel importante em vários processos imunes, expandindo-se e diferenciando-se em diferentes tipos celulares nomeados Th1, Th2, Treg e Th17, todos caracterizados pela produção de determinados grupos de citocinas (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007; MUCIDA et al., 2007). A identificação da família Th17 de células T efetoras foi um grande avanço recente (KOLLS; LINDÉN, 2004; YAO et al., 1995). A família de citocinas IL-17 é um grupo de citocinas que inclui IL-17A, B, C, D, IL-17E (IL-25) e IL-17F (KOLLS; LINDÉN, 2004). Está sendo cada vez mais reconhecido que além, das células T, outras células como NK e neutrófilos podem ser importantes fontes de IL-17. Além da IL-17A, a mais importante citocina produzida pelas células Th17, essas células também produzem IL-17F, IL-21 e IL-22 (KORN et al., 2007; LIANG et al., 2006; NURIEVA et al., 2007).

Atualmente acredita-se que as células Th17 desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra certos patógenos, mas que, por outro lado, uma resposta Th17 exagerada pode levar a doenças inflamatórias graves e doenças autoimunes (COOPER, A. M., 2007; KOLLS; LINDÉN, 2004).

O receptor A de IL-17 (IL-17RA) é expresso em uma variedade de tipos celulares e é essencialmente envolvido na sinalização de IL-17A e IL-17F (KORN et al., 2007).

A IL-17A estimula uma vasta gama de células estromais a expressar vários mediadores inflamatórios (FOSSIEZ, FRANCOIS et al., 1996), como quimiocinas CXC, quimiocinas CC, como por exemplo, a MCP-1 (TAKAYA et

al., 2002; VAN KOOTEN et al., 1998), e citocinas hematopoiéticas, como as G-CSF (FOSSIEZ, FRANCOIS et al., 1996). A IL-17A também aumenta a indução de MCP-1 mediada por TNF- α em miofibroblastos intestinais (HATA et al., 2002). Importante lembrar também que várias citocinas pró-inflamatórias são induzidas por IL-17A. Tem sido demonstrado que a IL-17A cumpre papéis cruciais em vários processos inflamatórios, que incluem infiltração das vias aéreas, asma brônquica, artrite reumatoide, esclerose múltipla, esclerose sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase e gastrite associada à *Helicobacter pylori* (KORN et al., 2007).

Tanto na Doença de Crohn quanto na colite ulcerativa, a expressão de IL-17 encontra-se aumentada (FUJINO et al., 2003). Entretanto, ainda continua controverso o papel da IL-17 nas DIIs. Enquanto alguns estudos mostram um aumento dessa citocina nos quadros inflamatórios (FUJINO et al., 2003; NIELSEN et al., 2003; ZHANG et al., 2006), em outros, a IL-17 parece proteger da doença inflamatória (KIM et al., 2011; OGAWA et al., 2004). Talvez esse último seja o caso de doenças inflamatórias onde IFN- γ tem um papel patogênico importante, pois a IL-17 inibe a ação dessa citocina (GOMES-SANTOS et al, 2012).

2.5 O Cloreto de Sódio

O sódio é o principal cátion no fluido extracelular do organismo, além de ser um elemento essencial para a manutenção do volume plasmático, equilíbrio ácido-base, transmissão de impulsos nervosos e para a função celular normal. Em indivíduos saudáveis, cerca de 100% do sódio ingerido é absorvido durante a digestão, e a excreção urinária é o primeiro mecanismo para a manutenção do equilíbrio de sódio (HOLBROOK et al., 1984). Mesmo em climas quentes e úmidos, as perdas pelas fezes e suor são mínimas. A aclimação ao calor

ocorre rapidamente, assim, com poucos dias de exposição a condições de calor e umidade, os indivíduos perdem apenas pequenas quantidades de sódio pelo suor (FUKUMOTO et al., 1988; SAWKA; MONTAIN, 2000). Sob condições de extremo calor e intensa atividade física, que resultam em alta produção de suor, a perda de sódio se torna muito aumentada e relevante. No entanto, a maioria dos indivíduos consegue recuperar o sódio perdido por meio da alimentação sem necessidade de dietas especiais, suplementação ou produtos formulados especificamente para esse fim (FUKUMOTO et al., 1988; SAWKA; MONTAIN, 2000).

O sódio e o cloreto são os componentes químicos do sal de cozinha, entretanto, o sódio também pode ser encontrado em outras formas, e os principais contribuintes para o consumo de sódio na dieta dependem do contexto cultural e dos hábitos alimentares da população (BROWN et al., 2009). O sódio é encontrado naturalmente em vários alimentos, como leite, carne e mariscos. E normalmente é encontrado em grandes quantidades nos alimentos processados: pães, biscoitos, carnes processadas e lanches (CONTROL; PREVENTION, 2011; MHURCHU et al., 2011; NI et al., 1996; WEBSTER; DUNFORD; NEAL, 2010). Largas quantidades de sódio também são encontradas em condimentos e temperos prontos, como molho de soja, de peixe, entre outros. Assim, uma dieta rica em alimentos processados e pobre em frutas e vegetais frescos contém altos níveis de sódio (CONTROL; PREVENTION, 2011; WEBSTER et al., 2010). Apesar do nível mínimo de ingestão de sódio para o bom funcionamento do corpo não ser definido, é estimado que seja por volta de 200-500 mg/dia (HE; MACGREGOR, 2004; HOLBROOK et al., 1984). Dados de todo o mundo sugerem que o consumo médio de sódio da população esteja bem acima do mínimo necessário para as funções fisiológicas e em muitos países está acima do recomendado pela *Joint World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United*

Nations de 2002 (WHO/FAO) (WHO; CONSULTATION, 2003) de 2 gramas de sódio por dia (o que equivale a 5 gramas de sal de cozinha por dia) (BROWN et al., 2009).

O consumo aumentado de sódio é associado ao aumento da pressão arterial, enquanto o baixo consumo desse elemento parece levar a uma diminuição da pressão sanguínea em adultos (CUTLER; FOLLMANN; ALLENDER, 1997; HE; MACGREGOR, 2004; HE; MACGREGOR, 2003). Além da hipertensão, a ingestão aumentada de sódio também tem sido associada à ocorrência de doenças cardiovasculares (ORGANIZATION, 2007; STRAZZULLO et al., 2009), apesar das evidências serem menos claras do que aquelas para hipertensão.

Com base em estudos de revisão e meta-análise, considerando o risco para hipertensão e doenças cardiovasculares, a Organização Mundial de Saúde definiu como < 2 gramas/dia a ingestão de sódio adequada (WHO, 2012).

2.6 A indução de resposta Th 17 por meio do Cloreto de Sódio

Mudanças fundamentais nos fatores externos têm sido indicadas como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes. Nas últimas décadas, a dieta tem sido amplamente apontada como um potencial fator de risco responsável pelo aumento da incidência de doenças autoimunes, principalmente nos países em desenvolvimento (ASCHERIO; MUNGER, 2007). Um componente da dieta, cujo consumo tem aumentado nos últimos anos pelo crescimento dos alimentos industrializados, é o sal de cozinha (NaCl) (APPEL et al., 2011; MCGUIRE, 2010). O teor de sal em alimentos processados pode ser até 100 vezes mais alto quando comparado com alimentos feitos em casa (APPEL et al., 2011; BROWN et al., 2009). Foi demonstrado que o excesso de ingestão de NaCl pode afetar o sistema imune inato. Macrófagos residentes no

interstício da pele modulam a composição eletrolítica local em resposta à hipertonicidade extracelular mediada por NaCl e sua atividade reguladora promove um mecanismo de tamponamento da hipertensão sensível ao sal (MACHNIK et al., 2009). Além disso, o bloqueio do sistema renina-angiotensina pode modular respostas imunes e afetar a encefalomielite autoimune experimental (EAE) (PLATTEN et al., 2009; STEGBAUER et al., 2009).

Foi demonstrado que o aumento da concentração de NaCl promove a geração de respostas do tipo Th 17 altamente patogênicas (GHORESCHI et al., 2010). Kleinewietfeld e colaboradores obtiveram um aumento na produção de IL-17A por meio de adição de 40 mM de NaCl em culturas de células mononucleares periféricas do sangue - PBMCs (concentração encontrada no interstício de animais alimentados com dieta rica sal) na presença de citocinas indutoras de Th17 (TGF- β 1, IL-1b, IL-6, IL-21, IL-23). Esses autores também mostraram a indução de TNF- α na mesma cultura de células e o aumento da concentração de NaCl ainda levou à morte celular. Kleinewietfeld e colaboradores mostraram que a adição de 40 mM de gluconato de sódio também leva à indução de resposta Th17, enquanto que o MgCl₂ teve apenas um ligeiro efeito. A adição de 80 mM de ureia, um osmólito capaz de atravessar as membranas celulares, não teve nenhum efeito. Assim, o cátion Na aparece como crítico para a indução de IL-17A. Nesse estudo, além da indução de IL-17A, altas concentrações de NaCl também regularam positivamente a expressão de CCL20, IL-17F, RORC, IL23R, CSF2 e CCR6, além da indução de IL-2, IL-9 e TNF- α . Todos esses fatores indicam o papel do aumento das concentrações de NaCl como potente indutor de respostas Th17 altamente patogênicas (KLEINewIETFELD et al., 2013).

Já foi demonstrado que o aumento das concentrações de NaCl associado à hipertonicidade elevada pode induzir a ativação do sistema imune (JUNGER et al., 1994; SHAPIRO; DINARELLO, 1995). Foi mostrado ainda que

o estresse hipertônico em mamíferos é sentido por meio da via p38/MAPK (SHAPIRO; DINARELLO, 1995). Os estudos conduzidos por Hafler e colaboradores indicaram que altas concentrações de NaCl induziram a expressão de NFAT5 e seu alvo SGK1 e IL-17A de maneira dependente da via p38/MAPK. O NFAT5 é um fator de transcrição osmossensível que possui, como alvos, genes que codificam proteínas que funcionam aumentando a concentração intracelular de osmólitos compatíveis e, assim, compensando a tonicidade extracelular (KO et al., 1997). A SGK1 (serum glucocorticoid kinase 1) é responsável pela regulação da expressão de IL-23R pelas células T (WU et al., 2013).

Altas concentrações de sal (40 mM) durante a polarização de Th17 induzida por citocinas aumentou a fosforilação da via p38/MAPK e induziu a expressão do fator de transcrição NFAT5 (Fator Nuclear de Linfócitos T Ativados 5) e seu alvo SGK1 (KLEINWIETFIELD et al., 2013). Camundongos alimentados com uma dieta rica em sal (NaCl 4%), ou HSD, rapidamente desenvolveram uma forma mais severa de encefalomielite experimental autoimune (EAE) do que aqueles que se alimentaram da dieta normal. Os animais submetidos à HSD tiveram frequências mais altas de células Th17 no sistema nervoso central, assim como nos órgãos linfoides (KLEINWIETFIELD et al., 2013).

Wu e colaboradores identificaram o SGK1 como tendo um papel central na sinalização do IL-23R, responsável pela estabilização do fenótipo de células Th17. Eles mostraram que a quinase SGK1 é capaz de mediar seus efeitos nas células Th17 em parte devido à fosforilação do fator de transcrição Foxo1 por meio da anulação dos efeitos supressivos do Foxo1 na expressão de IL-23R mediado por ROR γ t, o que leva ao aumento da expressão de IL-23R e a subsequente estabilização das células Th17 (WU et al., 2013).

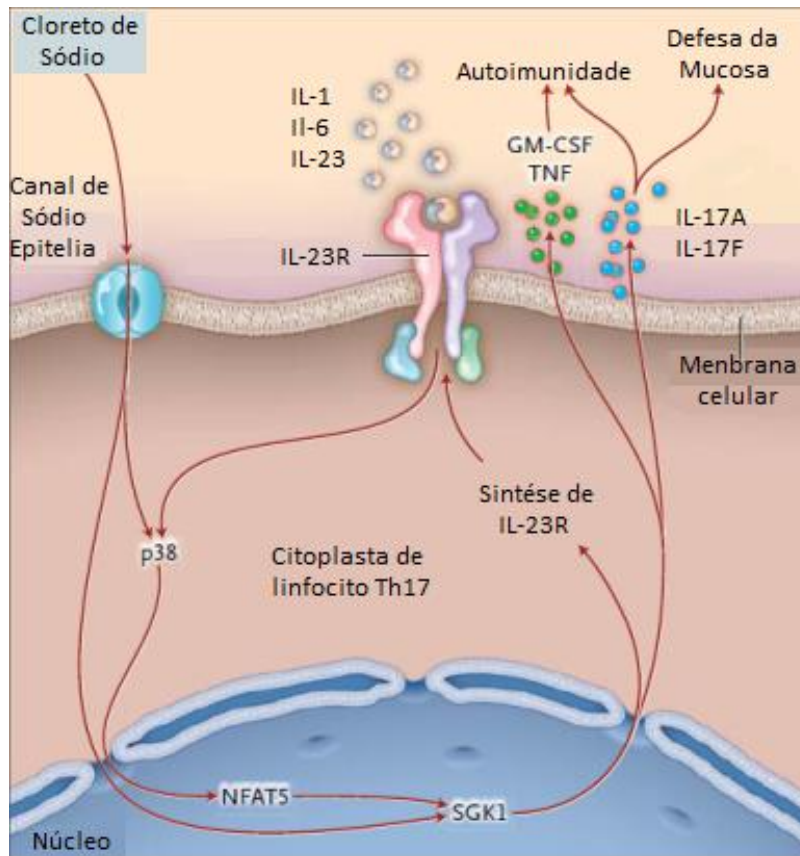


Figura 5. Respostas Th17 e os efeitos de altas concentrações de sal. Células T *naive* são diferenciadas em Th1, Th2 ou Th17 dependendo do perfil de citocinas produzidas. Dois estudos recentes ligam a hipertonicidade causada por altas concentrações de sal com respostas Th17. A hipertonicidade salina tem um efeito duplo na diferenciação de Th17: a) direciona a indução da quinase SGK1, que estabiliza o mRNA de IL-23R, fortalecendo o fenótipo Th17 e b) ativa a via MAPK/p38 e NFAT5, que induz a expressão de SGK1. Por meio da produção aumentada de citocinas como IL-17A e IL-17F, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e TNF, as células Th17 estimuladas podem modular a defesa do hospedeiro e exacerbar as doenças autoimunes. *Adaptado de Jos e Mihai, 2013.*

3 OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da dieta rica em sal (NaCl) na colite experimental em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliação dos efeitos da dieta no índice clínico da doença (perda de peso, diarreia e sangramento)
- ✓ Análise clínica (macroscópica) e histológica (microscópica) do cólon
- ✓ Análise do comprimento do cólon dos animais
- ✓ Análise fenotípica das populações de células isoladas do baço, linfonodos mesentéricos e cecal
- ✓ Perfil de citocinas nos extratos do cólon, baço, linfonodos mesentéricos e cecal
- ✓ Produção de IgA secretória
- ✓ Avaliação do peso do baço dos animais
- ✓ Avaliação da produção de mieloperoxidase (MPO) e de N-acetilglicosaminidase (NAG) no cólon em diferentes tempos após o início da indução da colite por DSS
- ✓ Comparação dos efeitos da dieta rica em NaCl com os efeitos da dieta rica em KCl.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais experimentais

Camundongos C57BL/6 fêmeas, com aproximadamente 18 gramas, foram utilizados em todos os experimentos de colite induzida por DSS (dextrana sulfato de sódio). Esses foram obtidos no Centro de Bioterismo (CeBio) da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos em gaiolas coletivas durante o experimento no biotério do laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética Animal da UFMG (protocolo de submissão 50/2014) (Anexo 1).

4.2 Desenho Experimental

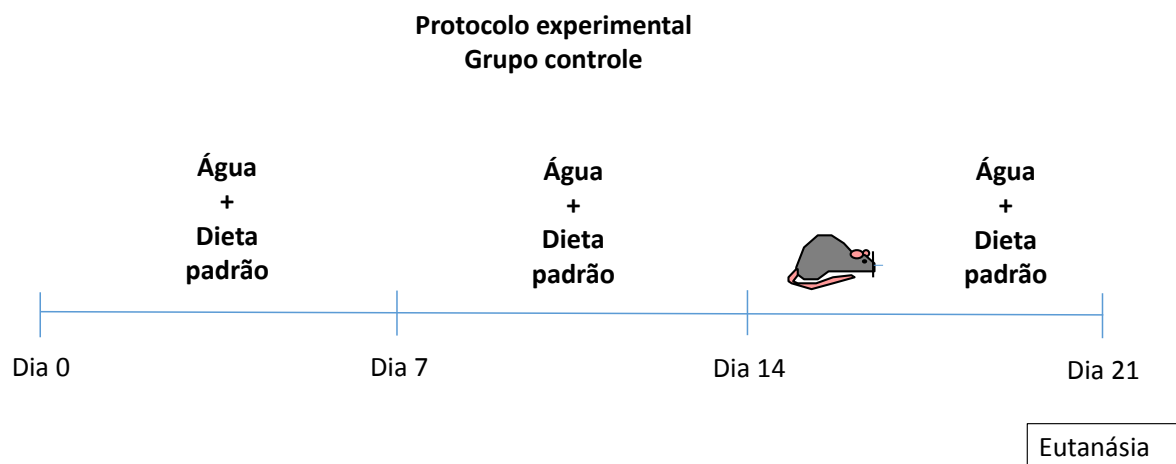
Os experimentos foram conduzidos seguindo quatro protocolos diferentes de acordo com a fase do projeto e o interesse investigativo.

O primeiro foi realizado com o objetivo de se estabelecer uma visão preliminar dos efeitos do consumo da dieta rica em sal no período anterior à indução da colite. Posteriormente, foi desenvolvido o segundo protocolo, que seria mais próximo à realidade, no qual seriam avaliados os efeitos dessa mesma dieta rica em sal ofertada antes e durante o período de indução da colite. No terceiro momento, o desenho experimental teve como objetivo fazer uma cinética dos efeitos da dieta rica em sal no que diz respeito ao acúmulo de neutrófilos e macrófagos durante a indução da colite. Finalmente, o quarto protocolo visou comparar os efeitos da dieta rica em NaCl com os efeitos de uma dieta rica em outro sal, para o qual foi utilizado o KCl.

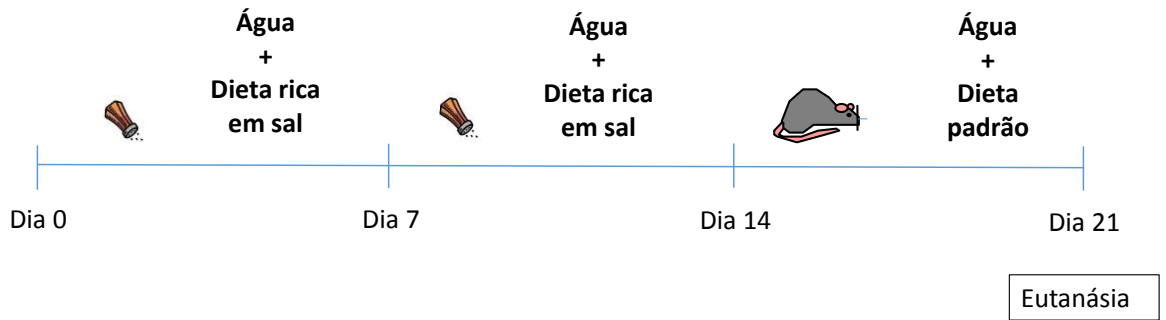
Assim sendo, os desenhos experimentais serão apresentados em uma divisão de quatro partes.

Parte I

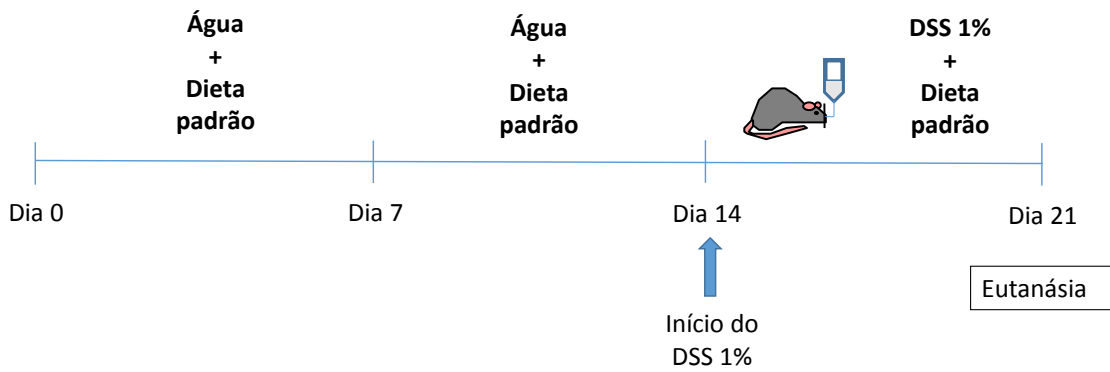
Camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade de 6 semanas e peso corpóreo de aproximadamente 18 gramas foram separados de maneira homogênea em quatro grupos de acordo com as dietas experimentais controle ou dieta rica em sal e submissão ao DSS ou água: grupo controle recebeu água e dieta padrão; grupo HSD recebeu água e dieta rica em sal; grupo DSS recebeu dieta padrão e DSS na mamadeira; grupo HSD + DSS recebeu dieta rica em sal e DSS na mamadeira. O experimento teve duração de três semanas, das quais nas duas primeiras, o grupo DSS recebeu água na mamadeira que foi substituída por DSS 1% na última semana; o grupo HSD recebeu dieta rica em sal nas duas primeiras semanas, sendo esta substituída pela dieta padrão na ultima semana; o grupo HSD + DSS recebeu dieta rica em sal e água nas duas primeiras semanas, com substituição desta pela dieta padrão e DSS na última semana; o grupo controle recebeu dieta padrão e água durante as três semanas do experimento.



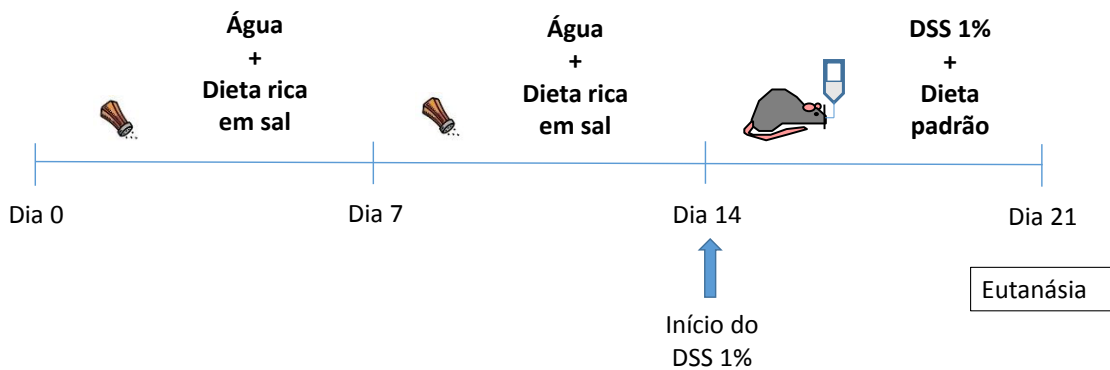
**Protocolo experimental
Grupo HSD**



**Protocolo experimental
Grupo DSS**



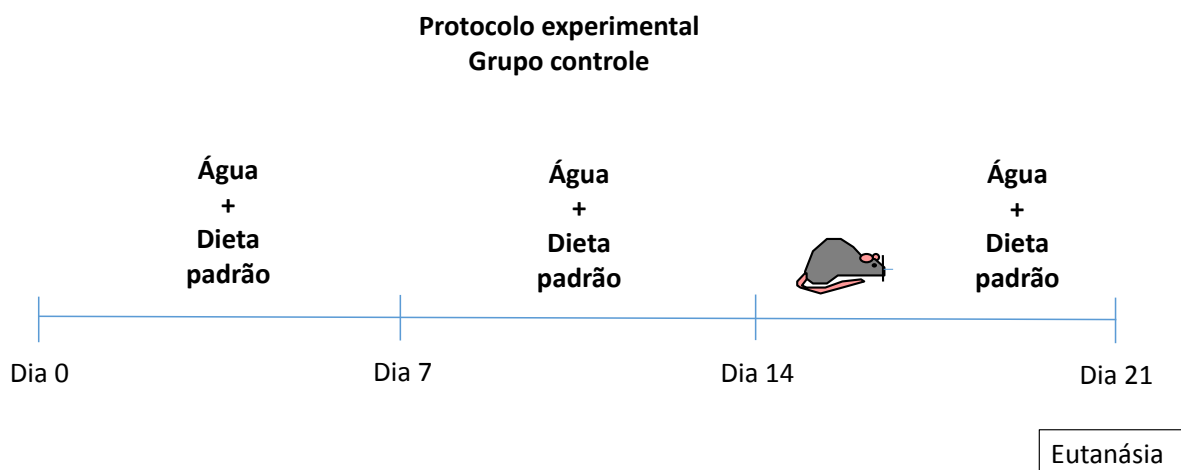
**Protocolo experimental
Grupo HSD + DSS**



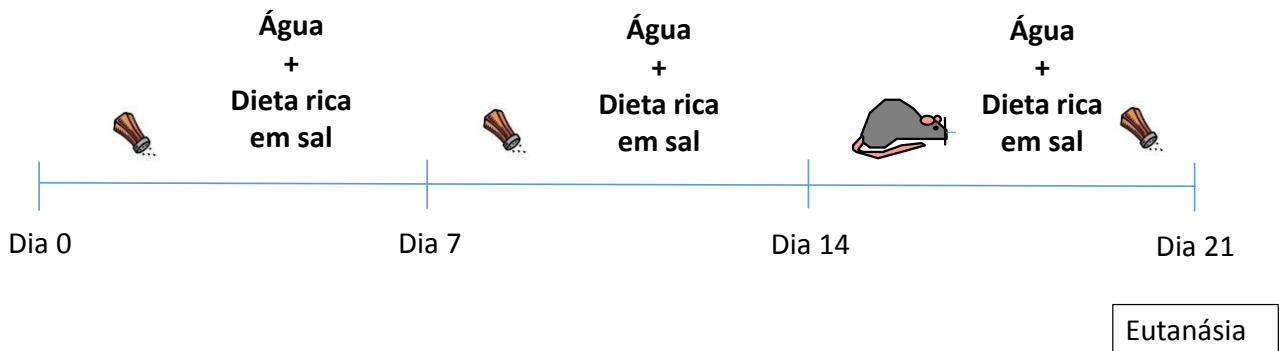
Parte II

Conforme o desenho experimental da parte I, nessa segunda parte, foram usados camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade de 6 semanas e peso corpóreo de aproximadamente 18 gramas. Os grupos foram separados da mesma maneira realizada na primeira parte, ou seja, quatro grupos de acordo com as dietas experimentais controle ou dieta rica em sal e submissão ao DSS ou água: controle, HSD, DSS e HSD + DSS. O experimento também teve duração de três semanas. Contudo, enquanto na primeira parte a dieta rica em sal (nos grupos submetidos a ela) foi substituída depois de duas semanas, na segunda parte a dieta rica em sal foi ofertada durante todo o tempo para os grupos HSD e HSD + DSS.

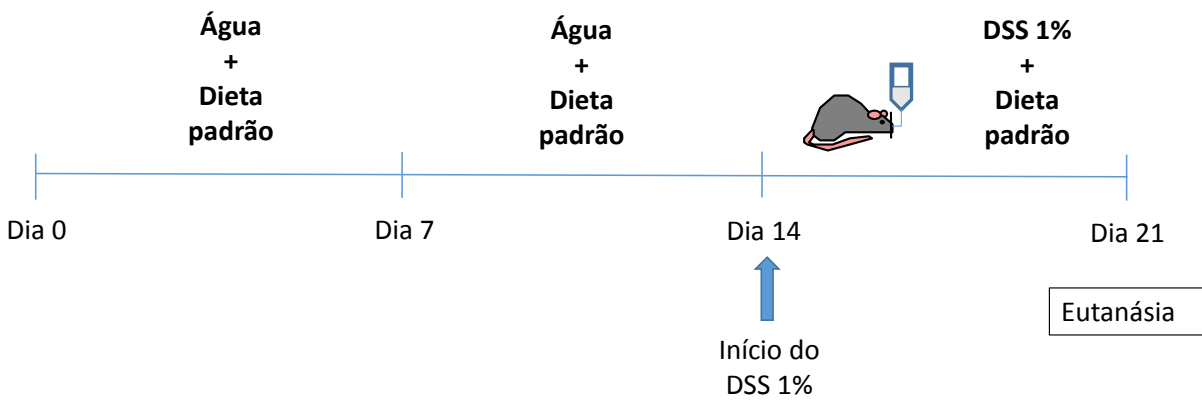
A indução da colite também foi feita na última semana com DSS a 1% nos grupos DSS e HSD + DSS.



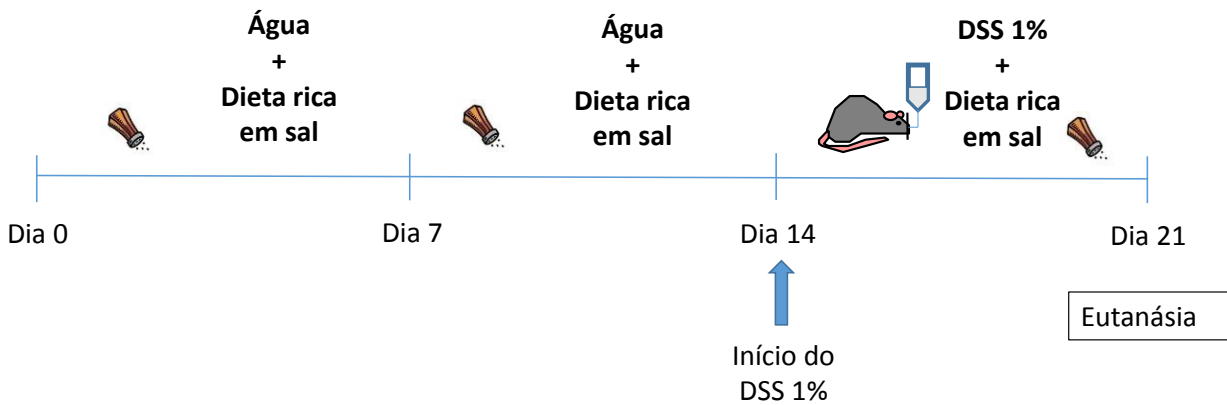
**Protocolo experimental II
Grupo HSD**



**Protocolo experimental
Grupo DSS**



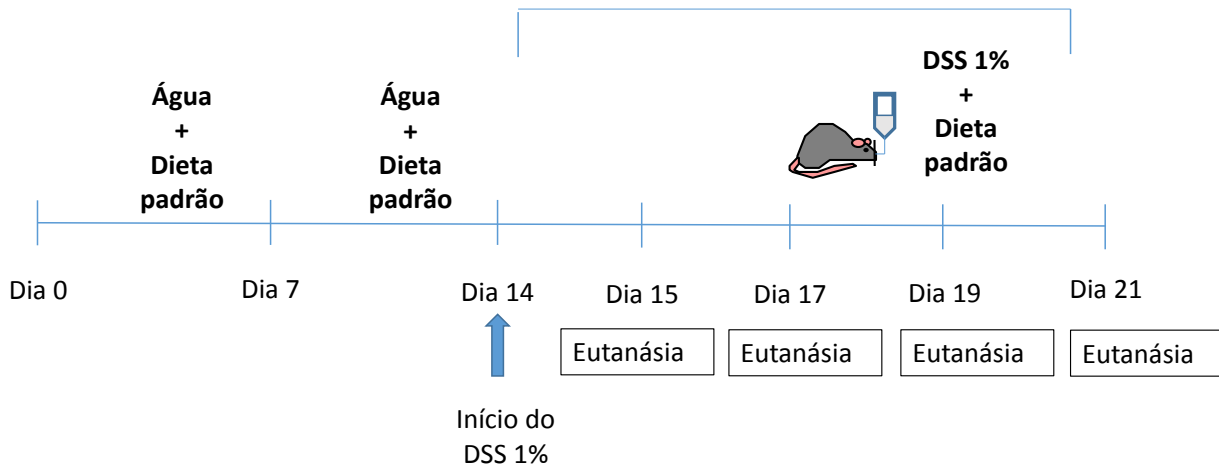
**Protocolo experimental II
Grupo HSD + DSS**



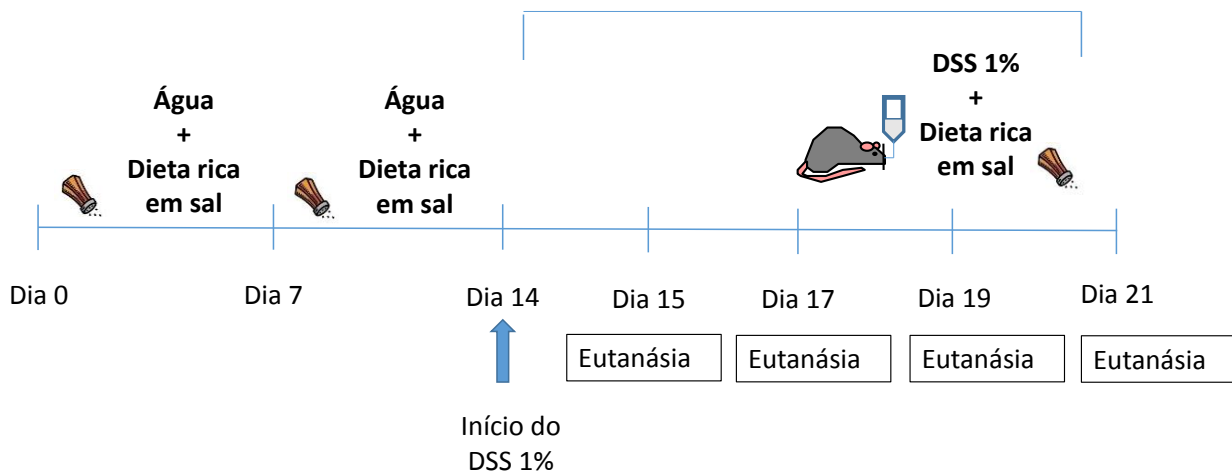
Parte III

Um terceiro desenho experimental foi realizado para compreensão dos acontecimentos desde o início da administração do DSS até serem completados os 7 dias de tratamento com o agente químico. Para tal, em conformidade com os dois outros desenhos experimentais, foram usados camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade de 6 semanas e peso corpóreo de aproximadamente 18 gramas. Os grupos foram separados de maneira aleatória e considerando os pesos iniciais em oito grupos: dieta padrão e DSS 1 dia; dieta rica em sal e DSS 1 dia; dieta padrão e DSS 3 dias; dieta rica em sal e DSS 3 dias; dieta padrão e DSS 5 dias; dieta rica em sal e DSS 5 dias; dieta padrão e DSS 7 dias; dieta rica em sal e DSS 7 dias. Nesse desenho, as duas primeiras semanas foram idênticas às duas semanas iniciais do segundo protocolo. Porém, após o início da terceira semana, os grupos sofreram a eutanásia em outros tempos além dos sete dias após o início da administração do DSS. Assim sendo, após um dia do início da terceira semana, dois grupos foram sacrificados: o grupo dieta padrão e DSS e o grupo dieta rica em sal e DSS; no terceiro dia da administração do DSS, outros dois grupos foram sacrificados: um que recebeu dieta padrão e DSS e outro que recebeu dieta rica em sal e DSS; no quinto dia da terceira semana, como nos outros casos, dois grupos sofreram a eutanásia: um grupo que recebeu dieta padrão e DSS e um grupo que foi submetido à dieta rica em sal e DSS; finalmente após sete dias da terceira semana, os dois últimos grupos foram sacrificados: um que recebeu dieta padrão e DSS e outro que recebeu dieta rica em sal e DSS.

**Protocolo experimental III
Grupo DSS**



**Protocolo experimental III
Grupo HSD + DSS**



Nesse experimento, os animais tiveram seus cólons extraídos para a quantificação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosamidase (NAG), produzidas respectivamente por neutrófilos e macrófagos.

Parte IV

No quarto desenho experimental, foram novamente utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade de 6 semanas e peso corpóreo de aproximadamente 18 gramas. Os animais, que também foram separados aleatoriamente e considerando os pesos iniciais, foram divididos em seis grupos de acordo com as dietas experimentais controle, dieta rica em sal (NaCl 4%) ou dieta rica em KCl 4% e submissão ao DSS ou água. Esse experimento, assim como os outros, teve duração total de três semanas. O grupo controle recebeu dieta padrão e água durante as três semanas; o grupo HSD recebeu dieta rica em sal (NaCl) e água durante todo o experimento; o grupo DSS recebeu dieta padrão durante as três semanas e DSS substituindo a água na última semana; o grupo HSD + DSS recebeu dieta rica em sal (NaCl) durante todo o decorrer do experimento e DSS na última semana; o grupo KCl recebeu dieta rica em KCl e água durante as três semanas; e o grupo KCl + DSS recebeu dieta rica em KCl durante todo o experimento e teve a água substituída por DSS na última semana.

O experimento com esses seis grupos foi realizado com a finalidade de comparação dos efeitos da dieta rica em NaCl e dos efeitos da dieta rica em outro sal (KCl) na colite. Para tal, foram mensuradas as citocinas IL-10, IL-17A, IL-23 e IFN- γ , além da realização dos exames bioquímicos e hemograma: creatinina, ureia, plaquetas, hemácias, hematócrito, leucócitos e linfócitos.

A eutanásia nos desenhos experimentais I, II e IV foi realizada após três semanas de experimento. No desenho experimental III, a eutanásia foi realizada de acordo com o grupo em diferentes tempos: 1, 3, 5 ou 7 dias após o início da indução da colite. No momento da eutanásia, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 0,1ml de uma solução contendo 1,7mg do anestésico cloridrato de quetamina misturado a 0,33mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) diluídos

em tampão fisiológico. O sangue foi retirado para dosagens bioquímicas (creatinina e ureia) do soro. O baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal foram retirados para dosagem de citocinas e para citometria de fluxo. O cólon foi retirado para histologia, dosagem de citocinas do extrato, dosagem das enzimas MPO e NAG, além da sua análise clínica. A porção do cólon destinada à análise histológica foi acondicionada em recipiente com formol tamponado. Os órgãos destinados à dosagem de citocinas foram armazenados em tubos a -20°C. O lavado do conteúdo do intestino delgado foi utilizado para dosagem da IgA secretória.

4.3 Indução da colite

A indução da colite foi realizada por meio da administração de dextrana sulfato de sódio (DSS) a 1%, ofertado na mamadeira, como única fonte líquida durante sete dias, conforme adaptação do protocolo desenvolvido por Okayasu e colaboradores em 1990. A solução de DSS era renovada e mensurada diariamente durante o período de indução da colite.

O DSS usado para a indução de colite foi da marca MP Biobedicals, lote M5975, com peso molecular de 36 kDa.

4.4 Dieta

A dieta padrão utilizada no experimento e ofertada aos grupos controle e DSS foi baseada na dieta AIN-93G, estabelecida pelo Instituto Americano de Nutrição (American Institute of Nutrition- AIN) para estudos nutricionais em roedores (REEVES et al., 1993).

A dieta rica em sal foi feita a partir da dieta AIN-93G com o acréscimo de 4% de NaCl. Ambas as dietas foram preparadas no laboratório de

Imunobiologia a partir dos componentes referidos na tabela 1, após a mistura dos ingredientes, aproximadamente 200 mL de água por quilo de dieta foram adicionados para facilitar a manufatura dos *pellets*.

A composição de micro e macronutrientes das dietas padrão e rica em sal são idênticas, com exceção da composição de sódio que é acrescentado na dieta rica em sal, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 1. Componentes da dieta AIN-93G

Componentes da dieta AIN-93G	Quantidade em mg/kg de dieta
Amido de milho	397,486
Caseína	200
Amido dextrinizado	132
Açúcar	100
Óleo de soja	70
Celulose	50
Mix mineral	35
Mix vitamínico	10
Cistina	3
Bitartarato de colina	2,5
Bht	0,014
TOTAL	1000

Adaptado de (REEVES et al., 1993)

Tabela 2. Composição mineral da dieta padrão AIN-93G e da dieta rica em sal

DIETA	Dieta padrão	Dieta rica em sal
Mineral	Quantidade em g/kg de dieta	
Cálcio	5000	5000
Fósforo	1561	1561
Potássio	3600	3600
Enxofre	300	300
Sódio	1019	17.739
Cloreto	1571	28.179
Magnésio	507	507
Ferro	35	35
Zinco	30	30
Manganês	10	10
Cobre	6	6
Iodo	0,2	0,2
Molibidênio	0,15	0,15
Selênio	0,15	0,15

Adaptado de (REEVES; NIELSEN; FAHEY JR, 1993)

4.5 Avaliação do peso corpóreo dos animais

Durante o período experimental, os animais foram pesados no dia inicial e a cada semana até o dia do início da indução da colite com DSS, após esse momento, os camundongos foram pesados diariamente sempre no mesmo horário.

O peso foi utilizado para a curva de crescimento, tendo sido feita a média de cada grupo em cada dia avaliado, além de ter sido calculado o percentual de variação de peso (utilizado para obtenção do escore clínico da doença). O percentual de variação de peso foi obtido a partir do peso inicial no experimento e o peso do dia da eutanásia, a partir da fórmula abaixo:

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

4.6 Avaliação do consumo de dieta

O consumo de dieta foi mensurado por meio da verificação do peso da sobra de dieta na gaiola e do peso de dieta ofertado anteriormente. Assim, a partir da quantidade de dieta consumida pelos animais da gaiola, foi feita a média de consumo considerando o número de camundongos na gaiola.

4.7 Avaliação do Índice Clínico da doença

O escore clínico da colite foi obtido por meio de valores atribuídos aos seguintes parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento. Essa avaliação foi realizada no momento da eutanásia dos animais, após a retirada e abertura do cólon. A diarreia foi classificada como ausente,

moderada ou severa, conforme a consistência das fezes. O sangramento foi classificado como ausente, oculto (se presente nas fezes) ou aparente (se visível no ânus/calda do animal). A pontuação foi realizada conforme a tabela 3.

Tabela 3. Índice Clínico da doença

Pontuação	% perda de peso	Diarreia	Sangramento
0	Ausente	Ausente	Ausente
1	1-5		
2	6-10	Moderada	Oculto
3	11-15		
4	>15	Severa	Aparente

Adaptado de (KANG et al., 2006)

4.8 Avaliação histológica

Para a obtenção do índice histológico da doença, os seguintes parâmetros foram avaliados: destruição da arquitetura da mucosa, infiltração celular, espessamento do músculo, presença ou ausência de abscessos das criptas e presença ou ausência de depleção de células caliciformes. A pontuação foi estabelecida conforme os valores apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Índice Histológico

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

Adaptado de (MCCAFFERTY et al., 2000)

4.9 Comprimento do cólon

A medição do comprimento do cólon foi feita com o auxílio de uma régua comum de 20 cm e os resultados obtidos foram utilizados para calcular a média do grupo.

4.10 Coleta de sangue e soro

Após anestesia, os animais tiveram o sangue retirado por meio do plexo subaxilar e colocados em tubos de 1 mL para posterior centrifugação. Para a separação do soro, o sangue foi mantido a 37°C em estufa durante 15 minutos e depois transferido para geladeira a 4°C, onde permaneceu durante outros 15 minutos. Após esse procedimento, o sangue foi centrifugado a 600 *g* por mais 15 minutos. Após a centrifugação, o soro foi separado com pipeta e congelado a -20°C para posteriores análises.

4.11 Coleta do muco intestinal

O conteúdo do intestino delgado foi coletado no momento da retirada do mesmo para dosagem de IgA secretória. Foi feita uma perfusão de 10 mL de salina tamponada (PBS) 1x gelada com auxílio de uma seringa e agulha por uma das extremidades do intestino e o lavado era coletado em tubo de 15 mL pela outra extremidade.

Após a coleta do muco intestinal, o conteúdo foi centrifugado a 1200 RPM a 4°C durante 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e utilizado imediatamente para a dosagem de sIgA.

4.12 Análise Histológica

As porções mais distais do cólon foram fixadas em formalina e processados para análise histológica. Os cortes corados com hematoxilina e eosina foram ranqueados às cegas e posteriormente analisados com base no sistema de pontuação descrito por McCafferty e colaboradores em 2000, no qual, a somatória dos parâmetros avaliados (apresentados na Tabela 4) pode chegar a um índice com valor máximo de 11.

Para obtenção das imagens, os cortes foram selecionados a partir da observação em microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e as imagens capturadas com o auxílio de um computador.

4.13 Dosagem de Ureia

A determinação da ureia foi realizada por meio do método enzimático colorimétrico (Urease, Berthelot). Foi utilizado o kit Ureia Color (Versão Jun/12) da Katal. As amostras foram homogeneizadas com o reagente de cor de uso e colocadas em banho-maria por 5 minutos a 37°C. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 600 nm.

CÁLCULOS

$$\text{Ureia (mg/dL)} = (\text{Abs.doTeste} \div \text{Abs.do Padrão}) \times 70$$

$$\text{Fator de calibração} = 70 \div \text{Absorbância do Padrão}$$

$$\text{Ureia (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

4.14 Dosagem de Creatinina

A determinação da creatinina no soro foi realizada por meio do método colorimétrico (Jaffé). Foi utilizado o kit Creatinina (Versão Jun/12) da Katal. As

amostras foram homogeneizadas com o tampão e o ácido pícrico e mantidas em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 510 nm para obtenção do primeiro valor de absorbância. O segundo valor foi obtido com a adição de 0,1 mL de acidificante, foram aguardados 5 minutos e feita uma nova leitura a 510 nm. Os dois valores foram utilizados para o cálculo da creatinina.

CÁLCULOS

$$\text{Creatinina} = [(A1 - A2) \div \text{Absorbância do Padrão}] \times 3$$

$$\text{Fator de calibração} = 3 \div \text{absorbância do Padrão}$$

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = (A1 - A2) \times \text{Fator}$$

4.15 Hemograma

O hemograma foi realizado no equipamento Coutler T890, que utiliza a tecnologia de Análise de Impedância desenvolvida por Wallace Coutler e baseia-se na quantificação dos pulsos gerados pelas células ao passar por um orifício por onde flui uma corrente contínua. Pelo fato das células sanguíneas não conduzirem bem a eletricidade, ao passar por esta pequena abertura ocorre um aumento mensurável da impedância elétrica. Desse modo são contadas e medidas as células, uma vez que o pulso é proporcional ao tamanho da célula analisada (DE L FREITAS; FERNÁNDEZ, 2011; FAILACE, 2003; PICARD et al., 1991).

4.17 Preparo das amostras para a medida da atividade das enzimas MPO e NAG Dosagem de NAG

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas na solução Buffer 1 gelada (NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,02M e Na₂EDTA 0,015M), numa proporção de

1,9 mL/100mg de tecido e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em solução de NaCl 0,2% e NaCl 1,6% acrescida de 5% de glicose, ambas geladas, numa proporção de 1,5mL/100mg de tecido. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso em Buffer 2 (Na₃PO₄ e HETAB 0,5% p/v) solução esta armazenada à temperatura ambiente, numa proporção de 1,9 mL/100mg. As amostras foram homogeneizadas e metade do volume foi retirado para a dosagem da atividade da enzima NAG. A outra metade do homogenato foi utilizada para a determinação da atividade da MPO. A partir desta etapa, as amostras receberam tratamentos distintos.

4.18 Quantificação indireta da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no cólon

Para o ensaio de MPO, após a divisão do homogenato, aquele destinado à dosagem da atividade da MPO foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado em água a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado três vezes consecutivas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10000 RPM. Foi retirada uma alíquota de 100 µL do sobrenadante para diluição em Buffer 2 e realização do ensaio enzimático.

Em microplaca de 96 poços, foram pipetados, em duplicata, 25 µL de cada amostra. Posteriormente, foram adicionados 25 µL do substrato TMB, previamente diluído em DMSO. A placa foi colocada em estufa a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram acrescentados 100 µL de H₂O₂ 0,002% e as amostras foram novamente incubadas a 37°C por 5 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de H₂SO₄. A leitura

da absorvância foi feita a 450nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para a determinação da atividade da enzima.

4.19 Quantificação indireta da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG)

Após a divisão do homogenato, a avaliação da atividade da NAG foi feita separadamente. Para isso, foi acrescentada ao homogenato a solução Salina/Triton (Salina 0,9% e Triton x-100 0,1%), numa proporção de 2mL/100mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e em seguida centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 3000 RPM. Cem microlitros (100 µL) do sobrenadante foram coletados e diluídos em tampão citrato fosfato (ácido cítrico 0,1M e Na₂HPO₄ 0,1M) para proceder ao ensaio de NAG. Na microplaca, foram pipetados 100 µL de cada amostra diluída. Foram acrescentados 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida, diluídos em tampão citrato fosfato. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 5 minutos. Após a reação, 100 µL de tampão glicina 0,2M foram adicionados às amostras para paralisar a reação. A absorvância foi lida a 400nm. Utilizou-se a média dos valores obtidos em cada duplicata para determinação da atividade da enzima.

4.20 Dosagem de citocinas nos extratos de tecido de baço, linfonodos mesentéricos, linfonodo cecal e cólon

As amostras do cólon, baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal foram pesadas e adicionados 1mL de solução tampão (0,05% de Tween-20, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzotônio, 10mM de EDTA e 20 KIU de aprotinina A) para cada 100mg de tecido. As amostras foram trituradas com um homogeneizador de tecidos e centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos

a 4°C. Durante o período de manipulação, as amostras foram mantidas em gelo e as amostras foram plaqueadas no mesmo dia.

A determinação da concentração de citocinas foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático ELISA (MARON et al., 1999). 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, TGF-β, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-17 e IL-12 diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnigth* a 4°C.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com salina tween e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS-caseína, por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse tempo, as placas foram lavadas com salina Tween. Em seguida, foram adicionadas as amostras, assim como o padrão (do qual foi realizada diluição seriada) e as placas foram incubadas *overnigth* a 4°C.

No terceiro dia, as placas foram novamente lavadas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com 100 µL/poço de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para as citocinas já citadas e marcados com biotina na concentração de 0,5 µg/mL. Posteriormente, 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 revelada incubando-se as placas, ao abrigo da luz, 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. As absorvâncias ($\lambda = 492 \text{ nm}$) das amostras foram obtidas pelo leitor de ELISA automático (Asys- modelo Expert plus). Os valores das absorvâncias

foram convertidos em ng/mL baseando-se em curvas obtidas com diferentes concentrações de citocinas recombinantes, utilizadas como padrão.

4.21 Citometria de fluxo

Após o sacrifício dos animais, o baço, os linfonodos mesentéricos e o linfonodo cecal foram retirados cuidadosamente com o auxílio de uma pinça cirúrgica, sendo em seguida, colocados em tubos de 15 mL contendo 2 mL de meio de cultura incompleto, no caso dos baços, ou completo, no caso dos linfonodos. 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.

O baço foi macerado com auxílio de um êmbolo de seringa usado para pressionar o tecido contra uma redinha e mantido na mesma solução (meio RPMI incompleto) em que se encontrava. O conteúdo foi novamente colocado no tubo Falcon de 15 mL após a maceração.

Os linfonodos foram macerados por meio da fricção dos mesmos entre duas lâminas de vidro. O conteúdo macerado, juntamente com os 2 mL de meio RPMI completo retornaram ao tubo de 15 mL.

Após a maceração, os tubos contendo as células dos baços e dos linfonodos foram centrifugados a 300g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e no caso dos linfonodos, o *pellet* ressuspenso em 200 µL de meio completo. Nos tubos contendo células de baço, deve-se proceder primeiro a hemólise das hemácias restantes no sedimento, para tal, adicionou-se 9 mL de água destilada a cada tubo e

posteriormente 1 mL de PBS concentrado 10x. A suspensão foi novamente centrifugada a 300g, por 10 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o concentrado celular foi ressuspensionado em 1000 µL de meio incompleto, para realização da contagem de células.

Para a contagem das células, as suspensões de células de baço diluídas 100 vezes e as de linfonodos diluídas 20 vezes, foram homogeneizadas com eritrocina para marcação das células inviáveis, para tal procedimento, 50 µL de solução de células 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° de células/mL = [(células viáveis x diluição x 10⁴)/n^o campos contados na Câmara de Neubauer] x volume inicial da suspensão celular.

A partir do número de células obtido, as concentrações das suspensões foram todas padronizadas pela adição do volume necessário de RPMI completo para se obter 10⁶ células/mL.

Para a leitura em citômetro de fluxo, foram utilizadas placas de 96 poços com fundo em U. Em cada poço, foi adicionada uma quantidade de solução de células isoladas do baço e dos linfonodos contendo um total de 10⁶ células e 10 µL do anticorpo previamente diluído. As placas foram incubadas durante 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz.

Após o período de incubação, foram adicionados 200 µL de PBS *wash* em cada poço e posteriormente, as placas foram levadas para centrifugação a 1200 RPM, durante 10 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo sedimentado foi homogeneizado cuidadosamente. Esse procedimento foi repetido.

As células foram ressuspensas com 100 µL de MAC-FACS (paraformaldeído diluído 1/20 em PBS 1x) e incubadas por 30 minutos em geladeira (4°C). Após esse tempo, as placas foram lavadas e as células ressuspensas com 200 µL de PBS 1x. Finalmente, as células suspensas em PBS 1x foram transferidas para tubos para leitura de FACS e armazenadas em geladeira a 4°C *overnight*.

Para as células marcadas com Foxp3, foram necessárias outras etapas referentes à marcação intracelular além dessas citadas acima. Após o plaqueamento com solução contendo 10⁶ células e os anticorpos marcadores de superfície, a placa foi incubada durante 30 minutos em geladeira ao abrigo da luz. Em seguida, foi lavada em PBS-*wash* e levada para centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. Essa última etapa foi repetida. Nesse ponto, inicia-se o protocolo de fixação e permeabilização específico para marcação intracelular de Foxp3. Para essa marcação, foi utilizado o Kit da BD para marcação intracelular de Foxp3. As células foram então ressuspensas utilizando 100 µL/poço de Tampão de Fixação da BD (solução 4% de paraformaldeído). A placa ficou incubada por 30 minutos, a 4°C ao abrigo da luz. A placa foi posteriormente levada para centrifugação (1200 rpm por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, a placa foi lavada 1 vez com o Tampão de Permeabilização da BD e incubada durante 30 minutos a 37°C (na estufa), ao abrigo da luz. As células foram novamente centrifugadas (1200 rpm por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante desprezado. A placa foi lavada com PBS-*wash* e novamente levada para centrifugação. O sobrenadante foi descartado.

Após todas essas etapas, o *pellet* pode receber 10 µL de solução de anti-Foxp3 diluído em PBS-*wash* e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A placa foi então lavada com PBS-*wash* e levada para centrifugação. O sobrenadante foi desprezado. Este último passo foi

repetido e a placa incubada por 30 min à temperatura ambiente com 200 µL/poço de MAC FACS. A placa foi novamente lavada, centrifugada e o sobrenadante descartado. As células foram finalmente ressuspendidas em µL/poço de PBS 1x e armazenadas em tubos para leitura de FACS em geladeira.

A análise dos dados foi realizada utilizando um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickison, Mountain View, Califórnia). O percentual de células positivas foi analisado através do software FlowJo versão 7.0. Primeiramente a região de células foi delimitada por tamanho e granulosidade (FSC-H x SSC-H). O quadro 1 indica as marcações realizadas para determinação do percentual de células reguladoras, neutrófilos e macrófagos no baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal.

Quadro 1. Marcadores utilizados na citometria de fluxo de células isoladas do baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal

Marcação 1	F4 80	CCR2	CD86	
<i>Fluorocromo</i>	APC	FITC	PE	
<i>Diluição</i>	1/300	1/100	1/300	
Marcação 2	CD4	Foxp3	Neuropilina	
<i>Fluorocromo</i>	FITC	PE	APC	
<i>Diluição</i>	1/100	1/100	1/50	
Marcação 3	CD4	CD25	LAP	
<i>Fluorocromo</i>	FITC	PERCP-CY	PE	
<i>Diluição</i>	1/100	1/50	1/100	
Marcação 4	F4/80	CD11 B	Ly6G	Ly6C
<i>Fluorocromo</i>	APC	CY	PE	FITC
<i>Diluição</i>	1/300	1/300	1/300	1/100

Para determinação do percentual de células reguladoras, dentro da região de CD4+ da população de linfócitos, foram consideradas as células Foxp3+neuropilina+, LAP+CD25+ e LAP+CD25-. Para a determinação de macrófagos, dentro da região de células F4/80+, foram consideradas as células CCR2+CD86+. E finalmente, para a determinação da frequência de neutrófilos, foram consideradas as células Ly6G+Ly6C-, dentro da região F4/80- (selecionada dentro de CD11 B+). O esquema da estratégia adotada para determinação das células referidas é representado pela figura 6.

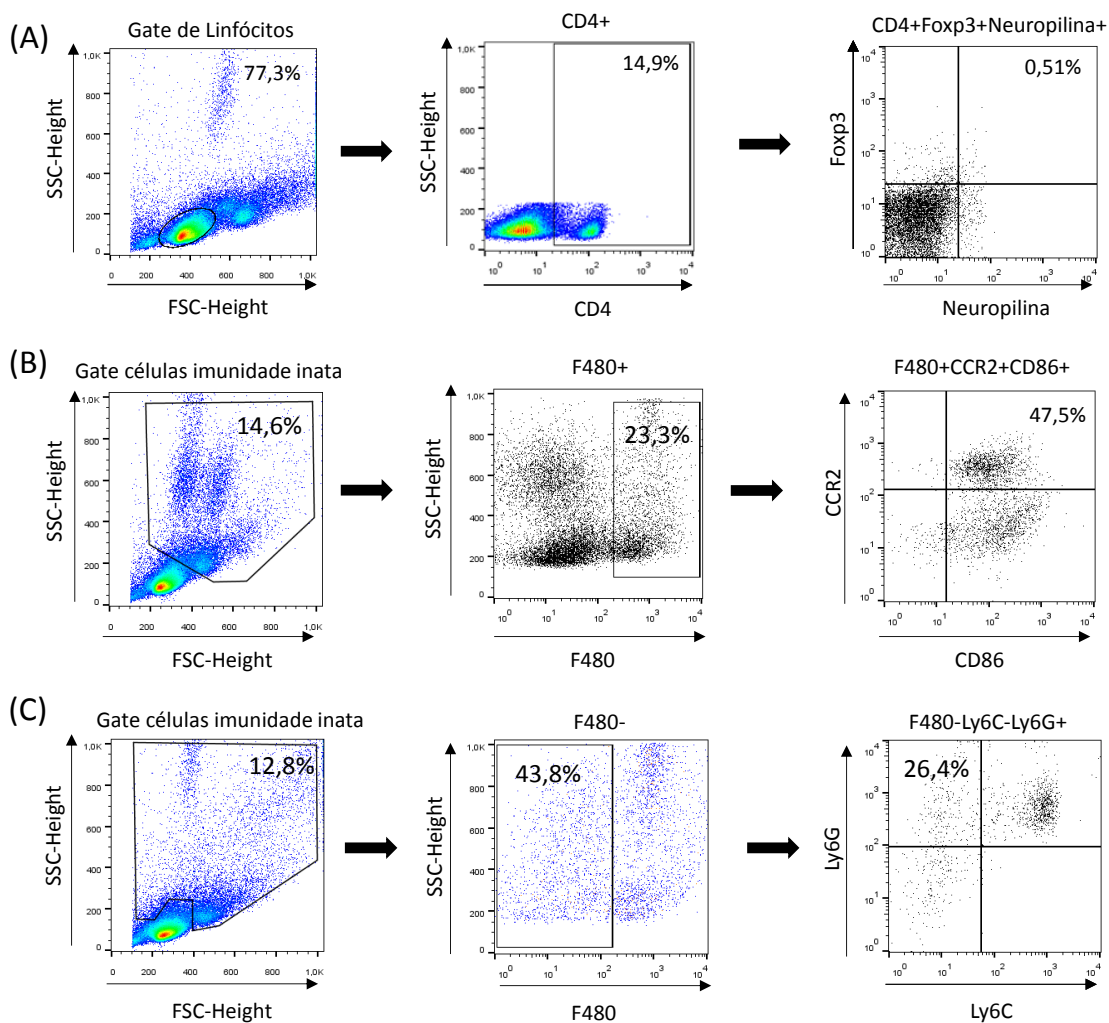


Figura 6. Esquema representativo da estratégia utilizada para determinação das células reguladoras, macrófagos e neutrófilos. (A) Células reguladoras determinadas a partir de percentual de células Foxp3+neuropilina+, CD25+LAP+ e CD25-LAP+, dentro das células CD4+ selecionadas no *gating* de linfócitos. (B) Macrófagos determinados por meio do percentual de células F480+CCR2+CD86+. (C) Neutrófilos determinados pelo percentual de células Ly6G+Ly6C- dentro de F480-, selecionadas dentro de CD11B+.

4.22 Análises estatísticas

Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t de *Student*. Já a comparação do peso corporal e consumo de dieta entre os grupos foi realizada através do teste two-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. O programa utilizado para fazer os testes foi o GraphPad Prism versão 6.

4.23 Soluções utilizadas

4.22.1 Soluções para preparação celular

PBS 10x – pH 7,2

- ✓ 80,00 g de NaCl;
- ✓ 2,00 g de KCl;
- ✓ 21,70 g de Na_2HPO_4 ;
- ✓ 2,00 g de KH_2PO_4 ;
- ✓ 1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Salina 10x

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

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

- ✓ 100 mL da solução salina 10X;

- ✓ 900 mL de água bidestilada ou deionizada;
- ✓ Filtrada em fluxo laminar ou autoclavada

RPMI 1640 incompleto - pH 7,3

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

RPMI 1640 completo

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

4.22.2 Soluções usadas para os testes de ELISA (diluídas em água bidestilada ou deionizada)

Tampão Carbonato pH 9,6 (Coating Buffer)

- ✓ 1,86 g de Na_2CO_3 ;
- ✓ 2,93 g NaHCO_3 - 0,035M;
- ✓ 1000 mL de água destilada ou deionizada

Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

- ✓ NaCl 0,0015M
- ✓ KCl 0,0081M
- ✓ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,1369M
- ✓ KH_2PO_4 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 Na_2HPO_4
- ✓ 5,19 g de Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
- ✓ 1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Solução de ácido sulfúrico 2N

- ✓ 53,24 mL de H_2SO_4
- ✓ 1000 mL de água bidestilada ou deionizada

Solução do substrato (por placa)

- ✓ OPD: 4 mg
- ✓ H_2O_2 – 2 μL
- ✓ Tampão citrato pH 5: 10 mL

4.22.3 Soluções usadas para a medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Buffer 1 pH 4,7

- ✓ 5,84 g/L de NaCl 0,1M
- ✓ 3,12 g/L de Na_3PO_4 0,02M
- ✓ 5,58 g/L de Na_2EDTA 0,015M

Buffer 2 pH 5,4

- ✓ 7,8 g/L de Na₃PO₄ 0,05M
- ✓ 5 g/L de HETAB 0,5% p/v

TMB (1,6 mM final na placa)

- ✓ 3,845 mg/mL do substrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) em DMSO (dimetilsulfóxido)

H2O2 0,002%

- ✓ 1:10 (em água deionizada) a solução estoque 30% = H₂O₂ 3%
- ✓ 7 µL de H₂O₂ 3% em 12 mL de *buffer 2*

4.22.4 Soluções utilizadas para a medida da atividade de N-acetilglicosamidase (NAG)

Salina Triton

- ✓ Solução salina 0,9%/Triton x-100 0,1% v/v

Substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida) Sigma diluído

- ✓ 0,767 mg de substrato por mL de tampão citrato/fosfato

Tampão Citrato/Fosfato pH 4,5

- ✓ 100 mL de ácido cítrico 0,1M
- ✓ 155 mL de Na₂HPO₄ 0,1M

Tampão Glicina 0,2M pH 10,6

- ✓ Homogeneizar quantidades iguais de:
- ✓ Glicina 0,8M
- ✓ NaCl 0,8M
- ✓ NaOH 0,8M

5 RESULTADOS

5. Resultados

A dieta rica em sal (HSD, do inglês *High Salt Diet*) foi capaz de alterar alguns parâmetros histológicos e bioquímicos em relação ao grupo controle que recebeu a dieta padrão. Essa dieta também alterou parâmetros histológicos, clínicos, bioquímicos e imunológicos quando associada a um evento inflamatório intestinal. Foram observadas diferenças entre o grupo que recebeu dieta rica em sal e foi submetido à administração de DSS para indução de colite quando comparado ao grupo que foi submetido ao DSS, mas recebeu dieta padrão. Os resultados serão apresentados por parte, parte I, parte II, parte III e parte IV, conforme o protocolo utilizado.

5.1 Resultados Parte I

Os resultados apresentados nesse tópico referem-se ao primeiro protocolo apresentado, no qual os animais do grupo controle receberam dieta padrão e água durante as três semanas de experimento; o grupo HSD recebeu dieta rica em sal durante as duas primeiras de experimento, mas esta é substituída por dieta padrão na última semana; o grupo DSS que recebeu dieta padrão durante todo o experimento e tem a água substituída por DSS na terceira semana e, finalmente, o grupo HSD + DSS que recebeu dieta rica em sal durante as duas primeiras semanas de experimento e dieta padrão na última semana, quando também a água é substituída por DSS.

5.1.1 A dieta rica em sal provocou o agravamento da colite

A avaliação de parâmetros como peso corporal e o consumo de dieta são de extrema importância para a determinação do estado nutricional do animal que é, por sua vez, um dos indicadores do quadro clínico da doença, além de estar intimamente ligado ao sistema imune do indivíduo.

Os camundongos foram pesados semanalmente durante as duas primeiras semanas e diariamente a partir da terceira semana, sempre no mesmo horário. A partir do peso inicial e do peso no dia da eutanásia, foi calculado o percentual de ganho de peso. Pode-se observar que não houve diferença entre o percentual de ganho de peso entre o grupo DSS e o grupo HSD + DSS. Porém, foi encontrada diferença entre o ganho de peso dos grupos HSD e controle e entre HSD e HSD + DSS (figura 7A).

O peso dos animais também foi avaliado por meio de uma curva de crescimento que abrange desde o início do experimento até o dia da eutanásia (figura 7B). Houve diferença de peso nos dias 5 e 6 da terceira semana de experimento entre os grupos controle e HSD + DSS. E no último dia do experimento, o grupo controle apresentou menor peso corporal do que o HSD, também apresentou menor peso do que esse último grupo, o grupo HSD + DSS.

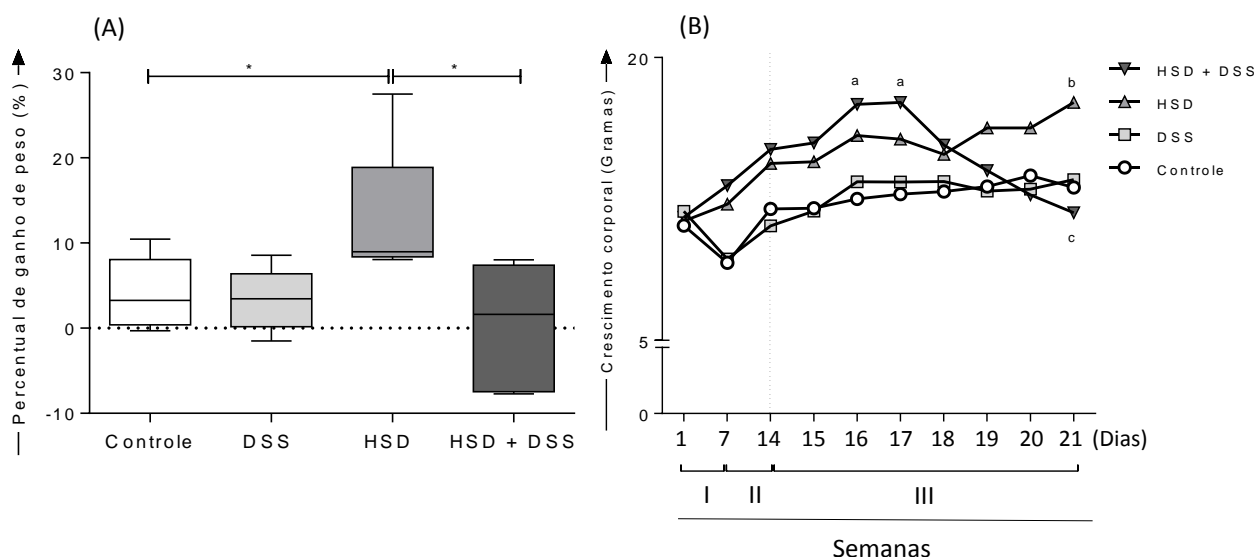


Figura 7: Avaliação do peso dos animais durante a aplicação do primeiro protocolo experimental. As diferenças de ganho de peso foram avaliadas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). (A) Percentual de ganho de peso dos animais em cada grupo experimental calculado como percentual da diferença de peso no valor do peso inicial dos camundongos. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$. (B) Curva de peso corporal dos animais em cada grupo experimental. Os animais foram pesados semanalmente durante as duas primeiras semanas e diariamente durante a terceira semana. Níveis de significância baseado no Teste two-way ANOVA. ^a representa diferenças entre os grupos Controle e HSD + DSS; ^b representa diferença entre os grupos Controle e HSD; ^c representa diferença entre HSD e HSD + DSS. O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

A quantificação do consumo de DSS e de dieta é extremamente relevante para o experimento, tendo em vista que consumos diferentes tanto de um quanto de outro poderiam levar a resultados que não seriam necessariamente devidos à dieta rica em sal, ou seja, aumentaria uma variável no experimento. Com isso, tanto o consumo de DSS quanto de dieta foram monitorados durante todo o experimento. No primeiro protocolo utilizado, o consumo de DSS foi diferente entre os grupos que foram submetidos à administração do agente químico (Figura 8A). Essa diferença poderia acrescentar uma nova pergunta ao trabalho: os resultados obtidos a partir desse protocolo seriam devido ao consumo da dieta rica em sal ou ao consumo aumentado de DSS? Porém, posteriormente, nos experimentos utilizando os demais protocolos, essa diferença é abolida por meio da restrição de oferta de DSS. A restrição foi feita pela oferta de quantidades equivalentes de DSS para ambos os grupos (quantidade adequada de líquido para cada animal – aproximadamente 6 mL/dia/camundongo) e pela não reposição de líquido (solução de DSS ou água) quando este era completamente consumido pelos animais de um grupo, de modo a prevenir uma possível recuperação.

O consumo de dieta foi mensurado com o objetivo de garantir que as alterações clínicas observadas não seriam decorrentes de um consumo diferenciado de dieta. Como representado na Figura 8B, não houve diferença entre os grupos em nenhum tempo de consumo de dieta.

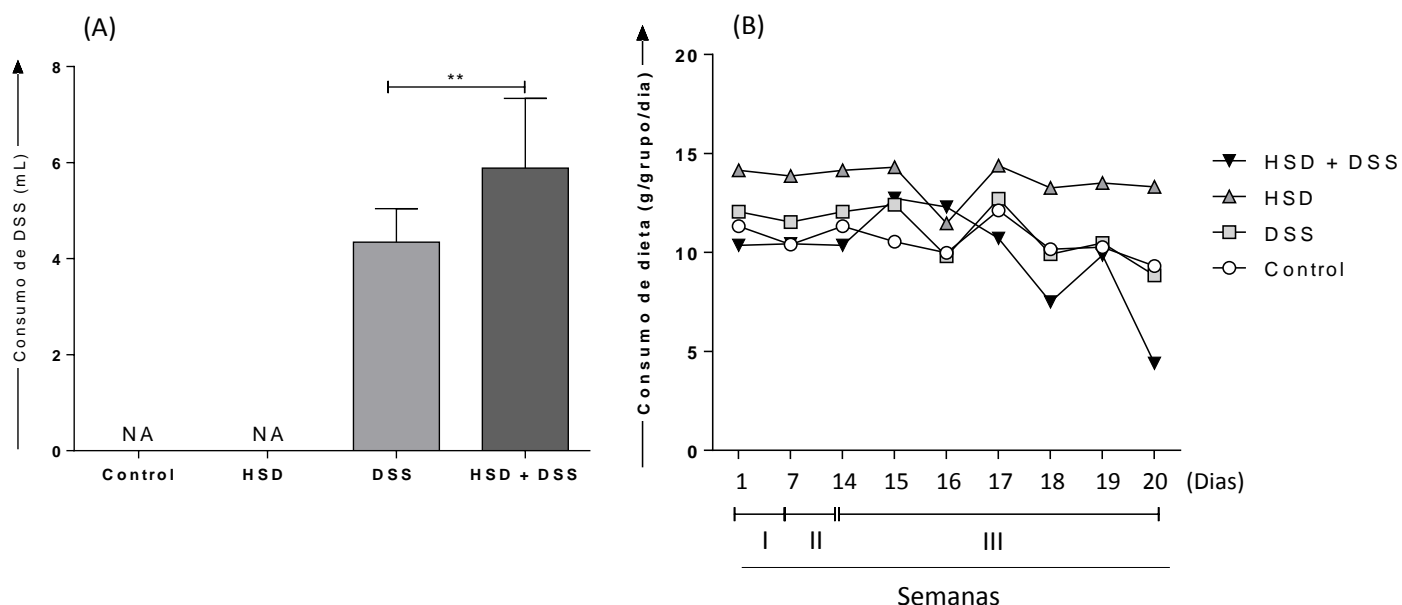


Figura 8: Consumo de Dextrana Sulfato de Sódio (DSS) e consumo da dieta nos grupos experimentais. As diferenças de consumo de DSS e dieta foram avaliadas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). (A) O consumo de DSS foi avaliado nos grupos DSS e HSD + DSS. Esse consumo foi obtido diariamente a partir da diferença entre a quantidade de DSS ofertada e a sobra nas mamadeiras. Barras representam a média e o desvio padrão de cada grupo. Níveis de significância baseados no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativa são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$. (B) O consumo de dieta foi obtido por meio da diferença entre a quantidade ofertada e a sobra na gaiola. Níveis de significância baseados no Teste two-way ANOVA. O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

A avaliação do quadro clínico que acompanha a doença é importante para a percepção dos efeitos da dieta rica em sal na colite. Para tal, foi utilizado um protocolo desenvolvido por Kang e colaboradores (KANG et al., 2006) que se baseia na atribuição de pontos aos seguintes parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento. Quanto maior o índice clínico, maior a gravidade da colite. A dieta rica em sal alterou parâmetros clínicos da doença no grupo DSS comparado ao grupo HSD + DSS. Não foi observada diferença nesses parâmetros ao se comparar o grupo controle com o grupo HSD que somente consumiu a dieta rica em sal (Figura 9A).

Além do índice clínico, o comprimento do cólon é um fator clínico relevante a ser considerado na colite, tendo em vista que, em geral, é

inversamente proporcional à gravidade da doença. Como representado na figura 9B, a dieta rica em sal levou ao encurtamento do cólon no grupo que foi submetido à dieta associada à administração do DSS quando comparado com o grupo que recebeu dieta padrão e DSS.

As alterações morfológicas dos cólons dos animais foram avaliadas por meio da adaptação do protocolo desenvolvido por McCafferty e colaboradores (MCCAFFERTY et al., 2000). A avaliação leva em consideração os seguintes parâmetros: extensão da destruição da arquitetura da camada da mucosa, presença e grau do infiltrado celular inflamatório, presença ou ausência de abscessos nas criptas e depleção das células caliciformes. Foi observado que a dieta rica em sal foi capaz de aumentar o índice histológico quando comparados os grupos controle e HSD e os grupos DSS e HSD + DSS, ou seja, a dieta rica em sal levou a alterações histológicas até mesmo quando o camundongo não é submetido à administração de DSS (Figuras 9C e 9D).

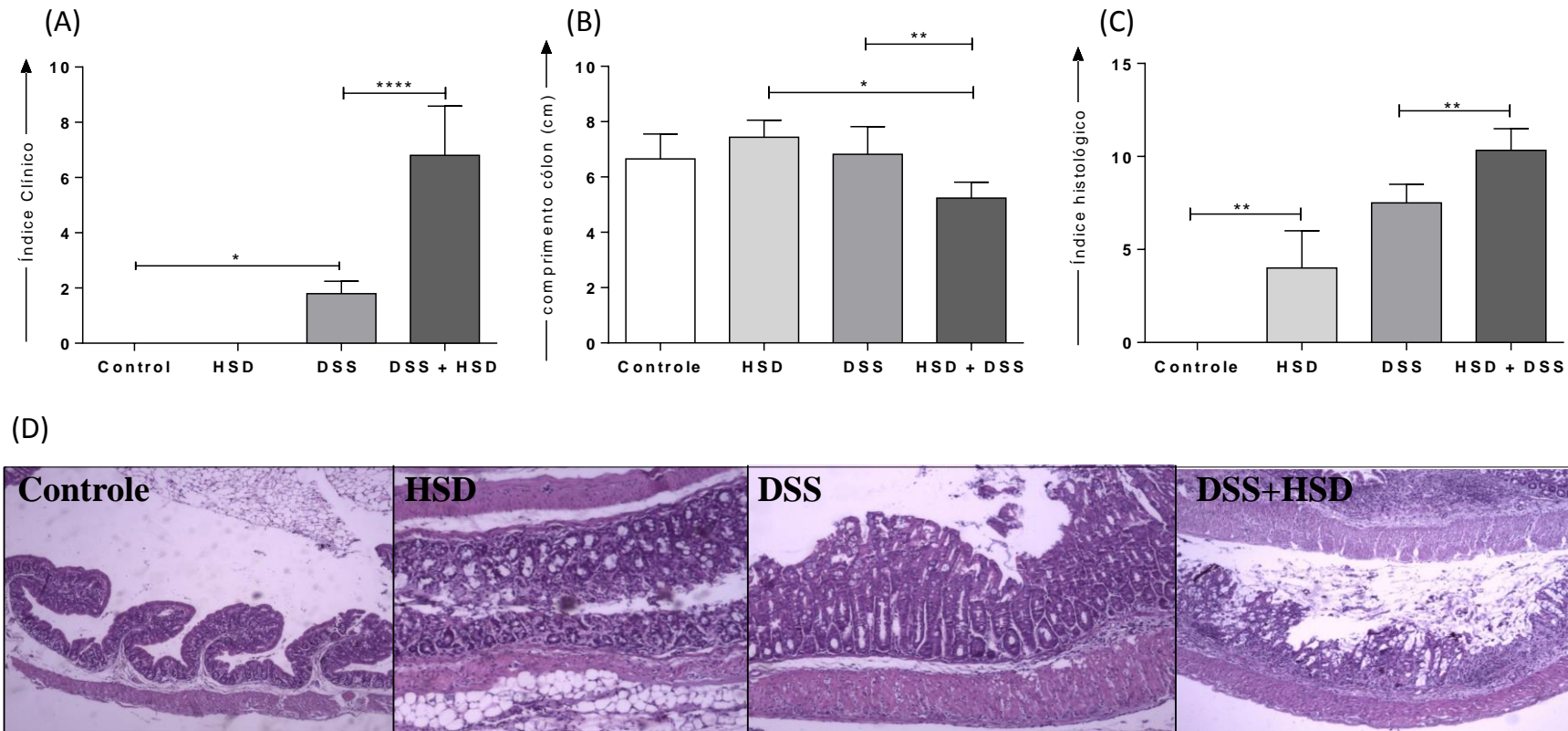


Figura 9: Avaliação do quadro clínico e alterações histológicas da colite ulcerativa murina. O quadro clínico foi avaliado entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). (A) Avaliação do índice clínico da doença, que foi obtido por meio de pontuações atribuídas aos parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento. (B) O comprimento do cólon foi medido com uma régua a partir da base do cólon até o início do reto e foi representado em centímetros (cm). (C) A avaliação das alterações morfológicas do cólon foi avaliada por um índice obtido a partir da pontuação dos seguintes parâmetros: destruição da mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes. Diferenças estatisticamente significativa são representadas por asterisco (*). Níveis de significância baseado no Teste two-way ANOVA. O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$. (D) Análises histológicas mostram seções do cólon coradas com hematoxilina e eosina (HE), foi usado um aumento de 4x.

5.2 Resultados Parte II

Os resultados apresentados nesse tópico referem-se ao segundo protocolo apresentado, no qual os animais do grupo controle receberam dieta padrão e água durante as três semanas de experimento; o grupo HSD recebeu dieta rica em sal e água durante as três semanas de experimento; o grupo DSS que recebeu dieta padrão durante todo o experimento e tem a água substituída por DSS na terceira semana e finalmente o grupo HSD + DSS que recebeu dieta rica em sal durante todo o experimento, tendo a água substituída por DSS na terceira e última semana.

5.2.1 A dieta rica em sal causa o agravamento da colite

Assim como no protocolo anterior, os animais foram pesados durante todo o experimento, sendo que nas duas primeiras semanas a aferição foi feita semanalmente e na terceira e última semana, os animais foram pesados diariamente. O grupo que recebeu dieta rica em sal e água teve menor ganho de peso do que o grupo que recebeu dieta padrão e água (controle). Foi diferente também, o percentual de ganho de peso do grupo DSS e do grupo que recebeu dieta rica em sal e foi submetido à administração de DSS (figura 10A).

Com relação à curva de crescimento corporal, houve diferenças entre os pesos dos animais nos dias 5, 6, 7, 8, 9 e 10 da última semana. Sendo que nos dias 7, 8, 9 e 10, o grupo que recebeu DSS e dieta padrão teve peso corporal maior que o grupo de animais que recebeu dieta rica em sal e DSS (figura 10B).

Os gráficos de ganho de peso corporal e de curva de crescimento corporal mostram que a dieta rica em sal levou a um menor ganho de peso quando associada à inflamação induzida pelo DSS, ou seja, o grupo HSD + DSS ganhou menos peso do que o grupo DSS.

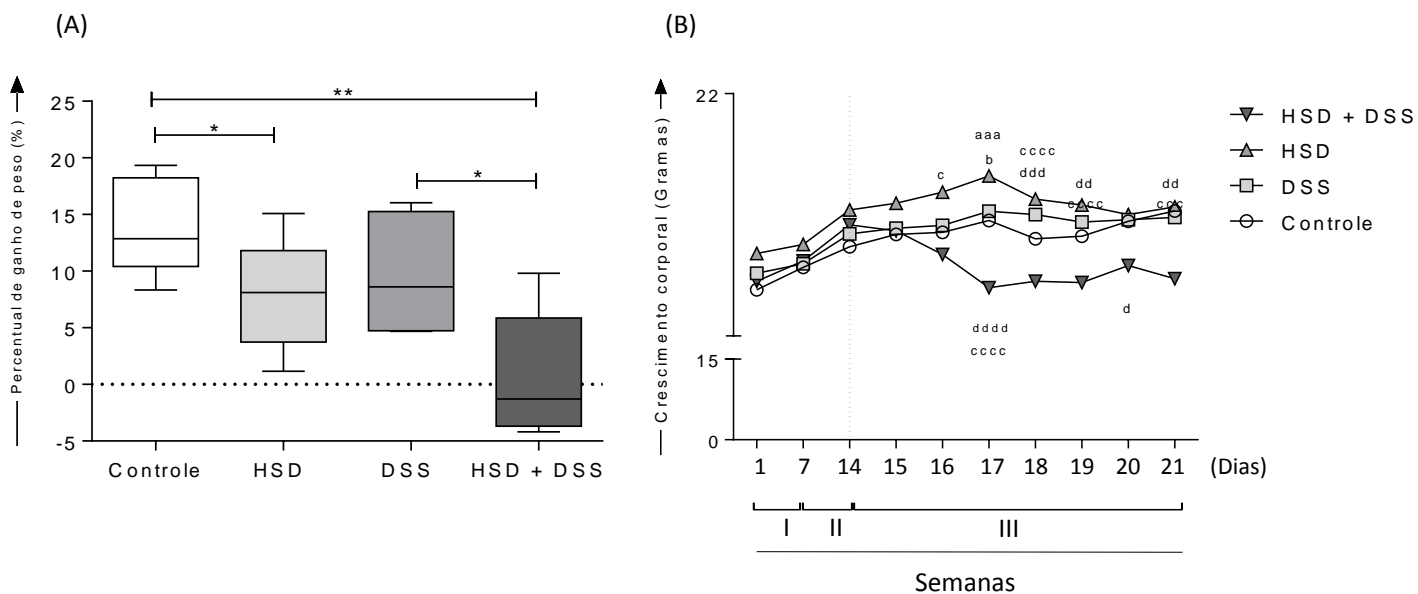


Figura 10: Avaliação do peso dos animais durante a aplicação do segundo protocolo experimental.

As diferenças de ganho de peso foram avaliadas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). (A) Percentual de ganho de peso dos animais em cada grupo experimental foi realizado como percentual da diferença de peso no valor do peso inicial dos camundongos. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$. (B) Curva de crescimento corporal dos animais em cada grupo experimental. Os animais foram pesados semanalmente durante as duas primeiras semanas e diariamente durante a terceira semana. Níveis de significância baseado no Teste two-way ANOVA. ^a representa diferenças entre os grupos Controle e HSD + DSS; ^b representa diferença entre os grupos Controle e HSD; ^c representa diferença entre HSD e HSD + DSS. O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

Em todos os experimentos do segundo protocolo, o consumo de DSS entre os grupos DSS e HSD + DSS foi restrito para que ambos os grupos consumissem a mesma quantidade. Essa restrição foi importante para que os resultados encontrados pudessem ser relacionados à dieta rica em sal e não a um consumo diferenciado de DSS (figura 11A).

Deve-se observar que os grupos apresentaram consumo de dieta sem diferenças durante todo o experimento, o que mostra que as alterações de peso encontradas não decorreram de um consumo dietético diferente em termos quantitativos (figura 11B).

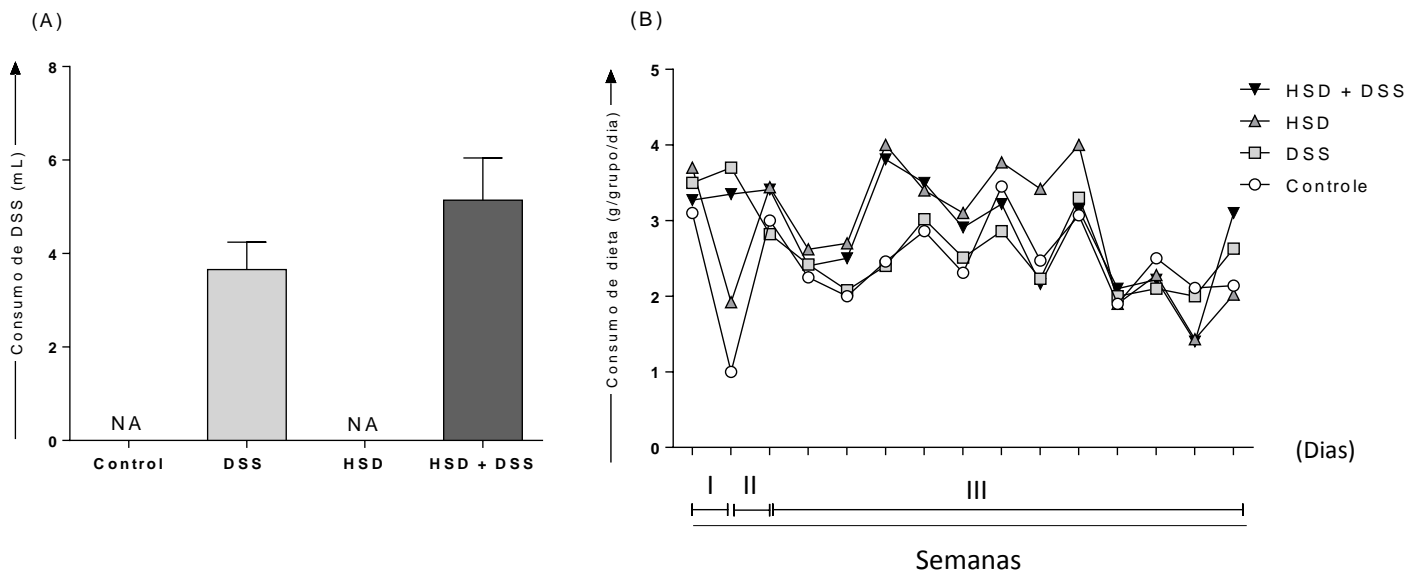


Figura 11: Consumo de Dextrana sulfato de Sódio (DSS) e consumo da dieta nos grupos experimentais. As diferenças de consumo de DSS e dieta foram avaliadas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). (A) O consumo de DSS foi avaliado nos grupos DSS e HSD +DSS. Esse consumo foi obtido diariamente a partir da diferença entre a quantidade de DSS ofertada e a sobra nas mamadeiras. Barras representam a média e o desvio padrão de cada grupo. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativa são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$. (B) O consumo de dieta foi obtido por meio da diferença entre a quantidade ofertada e a sobra na gaiola. Níveis de significância baseado no Teste two-way ANOVA. O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

Assim como no primeiro protocolo utilizado, o escore ou índice clínico da doença foi maior no grupo que recebeu a dieta rica em sal e foi submetido à administração do DSS em relação ao grupo que foi submetido ao DSS, mas recebeu dieta padrão (figura 12A).

Também foi observado um encurtamento do cólon no grupo dos animais tratados com dieta rica em sal e DSS quando comparados com os animais que receberam DSS e dieta padrão (figura 12B).

O índice histológico, avaliado para verificar a presença de inflamação por meio das alterações morfológicas, foi obtido por meio de pontuações atribuídas aos seguintes parâmetros: extensão da destruição da mucosa, presença e grau do infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscesso nas criptas e depleção das células caliciformes. Quanto maior o índice histológico, maior o grau de inflamação. Assim como observado anteriormente, o índice ou escore histológico foi maior no grupo HSD quando comparado ao grupo controle e maior também no grupo HSD + DSS que no grupo DSS (figuras 12C e 12D).

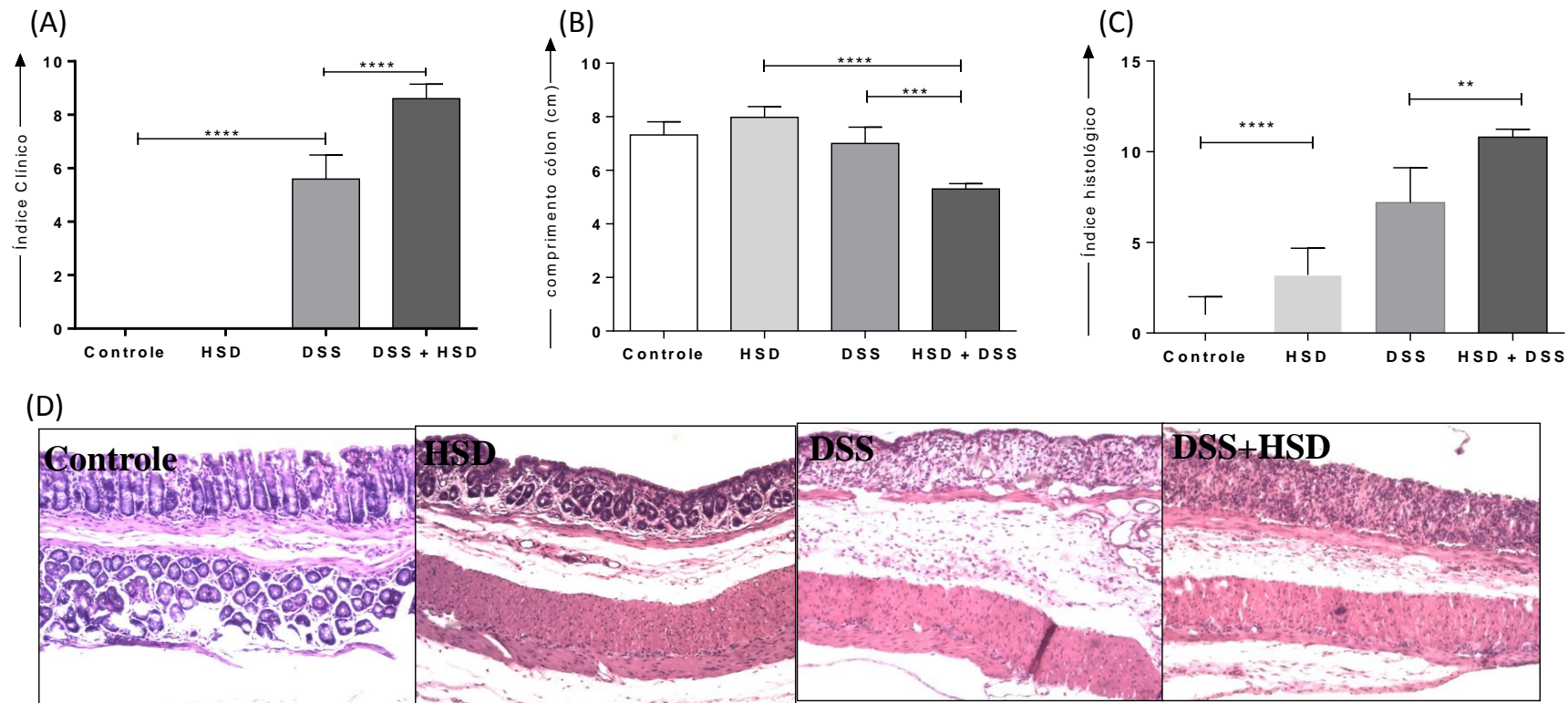


Figura 12: Avaliação do quadro clínico e alterações histológicas da colite ulcerativa murina. O quadro clínico foi avaliado entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). (A) Avaliação do índice clínico da doença, que foi obtido por meio de pontuações atribuídas aos parâmetros: percentual de perda de peso, diarreia e sangramento. (B) O comprimento do cólon foi medido com uma régua a partir da base do cólon até o início do reto e foi representado em centímetros (cm). (C) A avaliação das alterações morfológicas do cólon foi avaliada por um índice obtido a partir da pontuação dos seguintes parâmetros: destruição da mucosa, infiltrado inflamatório, espessamento do músculo, abscessos nas criptas e depleção de células caliciformes. Diferenças estatisticamente significativa são representadas por asterisco (*). Níveis de significância baseado no Teste two-way ANOVA. O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$. (D) Análises histológicas mostram seções do cólon coradas com hematoxilina e eosina (HE), foi usado um aumento de 4x.

5.2.2 A dieta rica em sal modificou o perfil de citocinas na colite

Para verificação de alteração do perfil das citocinas pró ou anti-inflamatórias com a dieta rica em sal, foram avaliadas as citocinas IL-10 (anti-inflamatória), IFN- γ , IL-23 e IL-17A (pró-inflamatórias). As citocinas IL-10, IL-17A e IFN- γ foram medidas no extrato do cólon, baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal; a IL-23 foi analisada apenas no cólon.

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória com funções variadas, incluindo atividade antiviral, aumento da expressão de MHC e estimulação de células T e células NK. Já foi demonstrado que essa citocina está envolvida na iniciação da colite induzida por DSS (ITO et al., 2006).

Em nosso trabalho, o IFN- γ foi semelhante entre os grupos analisados nos extratos de baço e de linfonodos (cecal e mesentéricos) (figuras 13A.1 e 13A.2) , porém foi encontrada uma concentração aumentada dessa citocina no grupo controle em relação ao grupo HSD e também no grupo DSS quando comparado ao grupo HSD + DSS no cólon (figura 13A.3).

A IL-17A induz respostas pró- e anti-inflamatórias em vários tecidos além de induzir alguns genes relacionados à inflamação, incluindo IL-6 (CHABAUD et al., 1998; FOSSIEZ, F. et al., 1996). Essa citocina apresenta diversas funções e tem sido relacionada a diversas desordens inflamatórias, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, gastrite associada à *Helicobacter pylori* e asma brônquica (CHABAUD et al., 2001; CHEN et al., 2003; LUZZA et al., 2000; WONG et al., 2000). Foi mostrado também que a frequência de células T produtoras de IL-17 e de macrófagos/monócitos está aumentada na mucosa inflamada de pacientes portadores de IBD (FUJINO et al., 2003; NIELSEN et al., 2003). Porém, o papel patofisiológico do aumento da IL-17 nessas situações ainda precisa ser esclarecido.

No nosso experimento, os níveis de IL-17A no baço foram mais altos no grupo controle que no grupo HSD e não sofreram alterações entre os outros grupos (figura 13B.1). Nos linfonodos, não houve diferenças (figura 13B.2). Já no cólon, a concentração de IL-17A foi maior

no grupo DSS do que no HSD + DSS, o que não foi observado nos demais grupos (figura 13B.3).

A IL-23 é uma citocina muito ligada a um amplo espectro de doenças autoimunes como esclerose múltipla, artrite reumatoide, psoríase e as próprias doenças inflamatórias intestinais (DIIs) (KLEINWIETFIELD et al., 2013; WU et al., 2013). Essa citocina aparece como uma das poucas para as quais seu requerimento em um estado pró-inflamatório de doenças autoimunes parece ser absoluto (CROXFORD; MAIR; BECHER, 2012). Além disto, ela apresenta um papel crítico na estabilização e manutenção do fenótipo de células Th17 por meio do aumento da expressão do receptor da IL-23 (IL-23R) e por levar as células Th17 a desempenharem funções patogênicas (AGGARWAL et al., 2003; ZHOU et al., 2007).

A IL-23 no cólon foi semelhante entre os grupos DSS e HSD + DSS, porém apresentou-se aumentada no grupo HSD quando comparada ao grupo controle (figura 13B.4).

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, é produzida por células T reguladoras e uma variedade de outros tipos celulares incluindo células epiteliais, macrófagos ativados, células dendríticas e células B1. É uma citocina com atividade imunossupressora que age diretamente em células apresentadoras de antígenos (APCs), inibindo a secreção de IL-12 (citocina pró-inflamatória) e regulando de forma negativa a expressão de MHC-II e suas moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (SKEEN et al., 1996). Essa citocina apresenta papel fundamental na homeostase intestinal e sua falta já foi relacionada com doenças inflamatórias intestinais em modelos experimentais e em humanos (GOMES-SANTOS et al., 2012).

Nesse trabalho, não foram observadas diferenças na concentração de IL-10 entre os grupos no baço nem nos linfonodos (figuras 13C.1 e 13C.2). Porém, nos extratos de cólons, a concentração de IL-10 foi maior no grupo que recebeu dieta rica em sal e água durante o experimento quando comparado ao grupo controle (figura 13C.3).

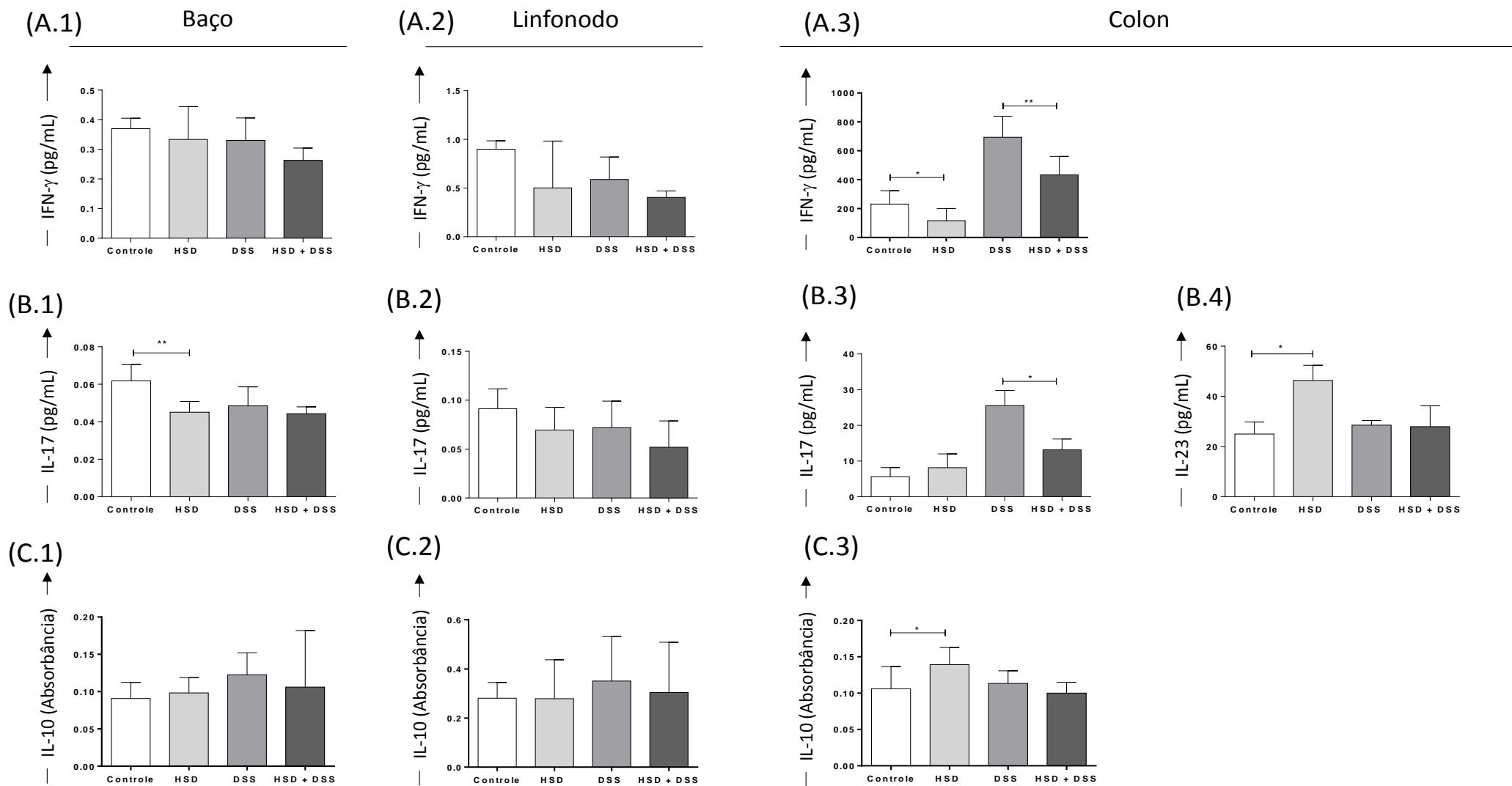


Figura 13. Concentração de IFN-γ, IL-10 e IL-17 no baço, linfonodos (mesentéricos e cecal) e no cólon e IL-23 no cólon. A concentração das citocinas foi avaliada após sete dias de indução da colite por DSS. As diferenças de concentrações das citocinas foram avaliadas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). As citocinas foram mensuradas em extrato de tecido através da técnica de ELISA. (A.1) Concentração de IFN-γ no baço. (A.2) Concentração de IFN-γ nos linfonodos. (A.3) Concentração de IFN-γ no cólon. (B.1) Concentração de IL-17 no baço. (B.2) Concentração de IL-17 nos linfonodos. (B.3) Concentração de IL-17 no cólon. (B.4) Concentração de IL-23 no cólon (C.1) Concentração de IL-10 no baço (C.2) Concentração de IL-10 nos linfonodos (C.3) Concentração de IL-10 no cólon. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.2.3 A dieta rica em sal levou a menor produção de sIgA

Tendo em vista que a produção de IgA secretória (sIgA) é um importante marcador de inflamação, a sIgA foi mensurada no lavado do intestino delgado dos diferentes grupos experimentais. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo DSS e o grupo HSD + DSS. Porém, o grupo HSD teve a concentração de sIgA diminuída quando comparado ao grupo controle, conforme representado na figura 14.

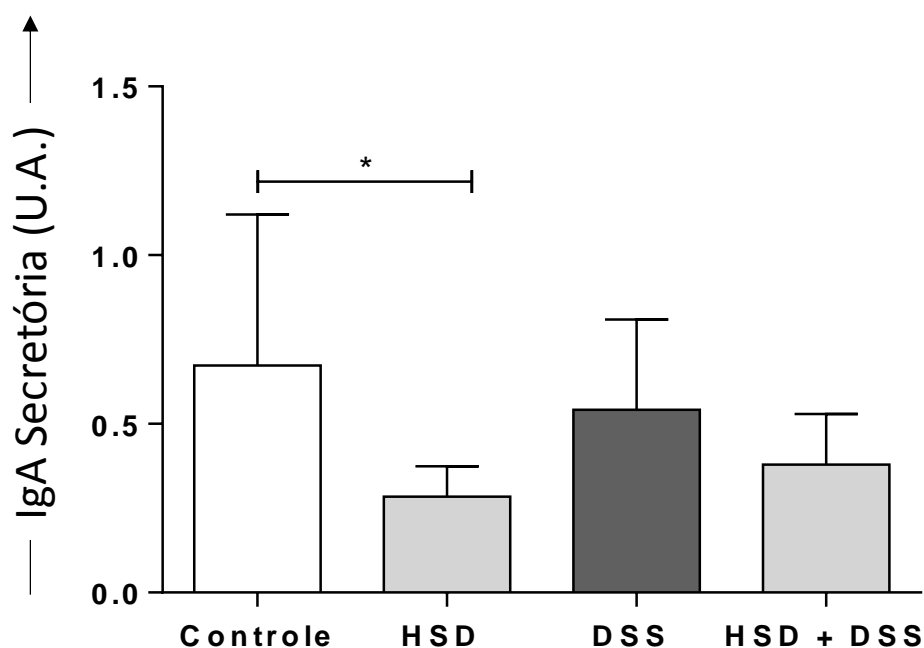


Figura 14. Concentração de sIgA no lavado do intestino delgado. As concentrações de sIgA foram medidas pela técnica de ELISA. As diferenças de concentrações foram feitas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.2.4 Dieta rica em sal aumenta o peso do baço nos animais com colite

O peso do baço pode refletir o aumento de células no órgão, como por exemplo, durante a inflamação causada na colite ulcerativa. Por esse motivo, o baço dos animais foi pesado logo após a eutanásia. Foi observado um aumento de peso do baço no grupo HSD + DSS quando comparado ao grupo DSS (figura 15).

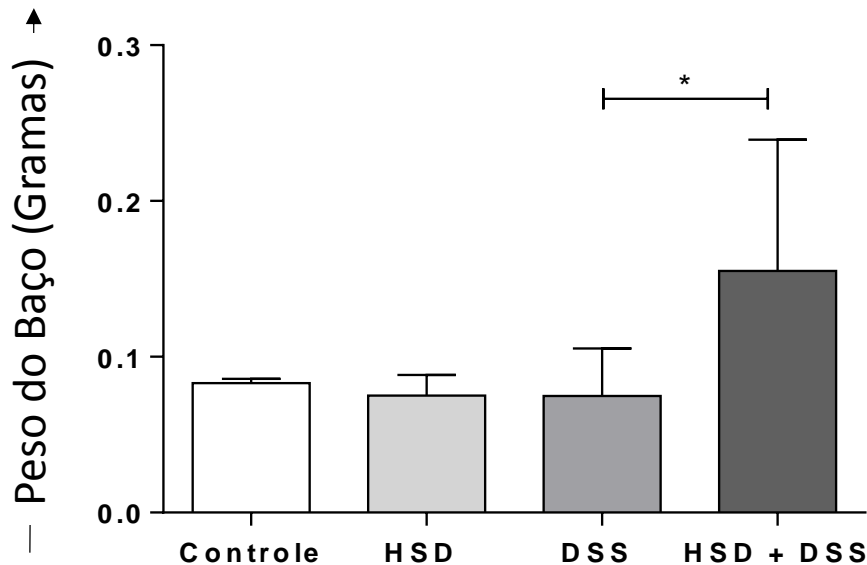


Figura 15. Peso do baço. O peso do baço foi obtido após a eutanásia dos animais. As diferenças de peso do baço foram feitas entre os grupos. Controle (recebeu dieta padrão e água), DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.2.5 Dieta rica em sal modifica o fenótipo de células em animais com colite

Para verificação do fenótipo das células envolvidas no agravamento da colite com a associação à dieta rica em sal, foi realizada uma análise fenotípica por citometria de fluxo das células isoladas do baço, linfonodo cecal e linfonodos mesentéricos dos quatro grupos de animais. Foram avaliadas células T reguladoras (Foxp3+Neuropilina+; LAP+CD25+; LAP+ CD25-), macrófagos (F480+CCR2+CD86+) e neutrófilos (Ly6C-Ly6G+).

As células T CD4+CD25+ foram identificadas como células com efeito supressor de células T, ou seja, células T reguladoras - Tregs (SAKAGUCHI et al., 1995). Posteriormente, um grande avanço foi dado ao se identificar o fator de transcrição nuclear Foxp3 como um marcador específico para células T reguladoras (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003).

A neuropilina-1 (Nrp-1) é um receptor para membros da família VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), cuja função é promover a angiogênese e funciona também como receptor para a família da semaforina (que secreta polipeptídeos neuronais) (ROSSIGNOL; POUYSSÉGUR; KLAGSBRUN, 2003). A neuropilina-1 foi primeiramente reportada como marcador de Tregs por Dunja e colaboradores, quando observaram que foi altamente expressa em células T reguladoras CD4+CD25+, nas quais a expressão de Foxp3 estava conectada com a expressão da Nrp-1 (BRUDER et al., 2004).

As células CD4+LAP+, diferentes das clássicas CD4+CD25+Foxp3+, são uma população única de células expressando *latency-associated peptide* (LAP), que apresentam propriedades reguladoras (GANDHI et al., 2010; OIDA et al., 2003). LAP, que é o domínio amino-terminal do peptídeo precursor do TGF- β , permanece associado não covalentemente ao peptídeo TGF- β após a clivagem e forma o complexo latente TGF- β na membrana dessas células (OIDA et al., 2003).

Entre as células T reguladoras (Foxp3+ Neuropilina+; LAP+ CD25+; LAP+ CD25), tanto no baço quanto nos linfonodos, não houve diferença na frequência das células (figura 16), apesar de uma tendência para aumento de células Foxp3+Neuropilina+ no grupo HSD com relação ao controle (figura 16A.3).

Além das células T reguladoras, os macrófagos também foram avaliados no baço, linfonodos mesentéricos e cecal, por meio da marcação CCR2 e de CD86. No baço e nos linfonodos mesentéricos, as células CCR2+ CD86+ foram mais frequentes

no grupo HSD + DSS do que no grupo DSS. Já no linfonodo cecal, não foram encontradas diferenças quanto a essa população de células (figura 17A).

Os neutrófilos, identificados como Ly6C-Ly6G+, estavam aumentados em frequência no baço dos animais do grupo controle do que do grupo HSD (figura 17B.1). Já nos linfonodos mesentéricos e cecal, essa população de células foi mais frequente no grupo HSD + DSS do que no grupo DSS (figura 17B.2).

A marcação de CCR2 para macrófagos foi utilizada visto que as citocinas quimiotáticas são conhecidas como mediadores críticos para o tráfego de células inflamatórias aos locais de inflamação (LUSTER, 1998; ROSSI e ZLOTNIK, 2000). Uma das mais potentes quimiocinas identificadas para monócitos e macrófagos é a MCP-1 que age ao se ligar ao CCR2, assim, o CCR2 é importante para o recrutamento de macrófagos ativados para o tecido inflamado (KURIHARA et al, 1997; BORING et al, 1997; BORING et al, 1999).

Os dados da literatura mostram que a interação entre CD28 expressa em células T e as moléculas co-estimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), expressas em APCs especializadas, são responsáveis pelo sinal estimulador mais importante (FREEMAN et al, 1993a; LINSLEY e LEDBETTER, 1993). Tanto CD80 quanto CD86 levam ao co-estímulo nas células T para proliferação e produção de IL-2 (FREEMAN et al, 1993b; LEVINE et al, 1995). Entretanto, apesar de as células dendríticas expressarem ambos os ligantes, os macrófagos expressam de forma constitutiva apenas CD86 (AZUMA et al, 1993). Com isso, utilizamos a marcação de CCR2 e de CD86 em células dentro da população F480+, sabendo-se que o F480 é um dos marcadores mais específicos para macrófagos e é expresso constitutivamente nessas células.

Para a determinação de neutrófilos, utilizamos a marcação de células Ly6C-Ly6G+, dentro das células F480-, considerando-se que, apesar de pouco se saber

sobre a função das proteínas da família Ly6, já é bastante estabelecido que o Ly6G é um marcador específico que separa os neutrófilos dos demais leucócitos (HENG et al., 2008). Já Ly6C, outra proteína da família Ly6, está presente em monócitos, células dendríticas e granulócitos na medula óssea (MCCORMACK et al., 1993).

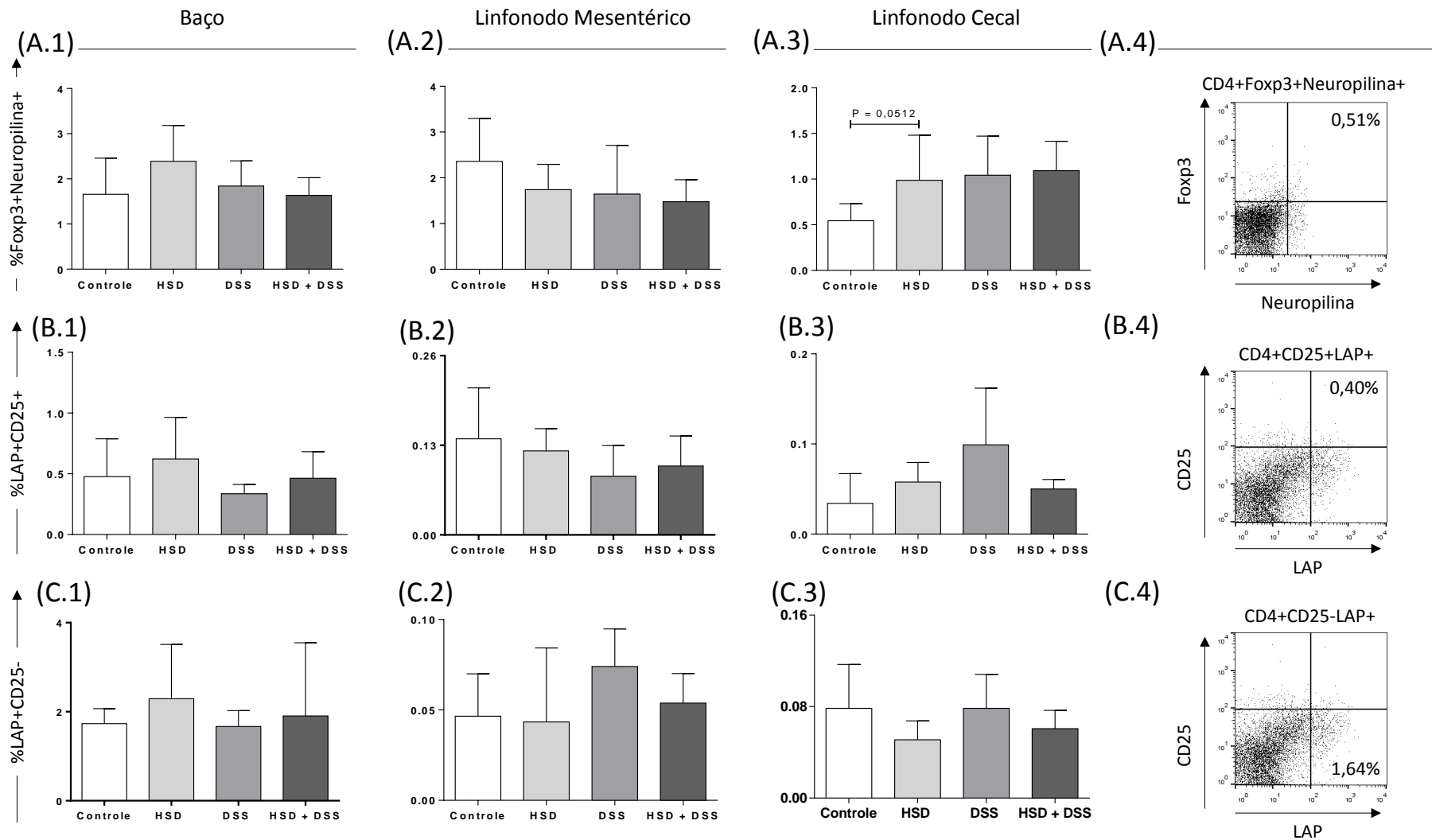


Figura 16. Percentual de células T reguladoras no baço, linfonodos mesentéricos e linfonodo cecal. As células T reguladoras foram consideradas pela frequência de expressão de Fox p3 e neuropilina, CD25 e LAP, verificadas por meio de citometria de fluxo. (A.1) Percentual de células T Foxp3+Neuropilina+ no baço (A.2) Percentual de células T Foxp3+Neuropilina+ nos linfonodos mesentéricos (A.3) Percentual de células T Foxp3+Neuropilina+ no linfonodo cecal (A.4) Dot plot representativo de células CD4+Foxp3+neuropilina+ (B.1) Percentual de células T CD25+LAP+ no baço (B.2) Percentual de células T CD25+LAP+ nos linfonodos mesentéricos (B.3) Percentual de células T CD25+LAP+ no linfonodo cecal (B.4) Dot plot representativo de células LAP+CD25+ (C.1) Percentual de células T CD25-LAP+ no baço (C.2) Percentual de células T CD25-LAP+ nos linfonodos mesentéricos (C.3) Percentual de células T CD25-LAP+ no linfonodo cecal (C.4) Dot plot representativo de células LAP+CD25-. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

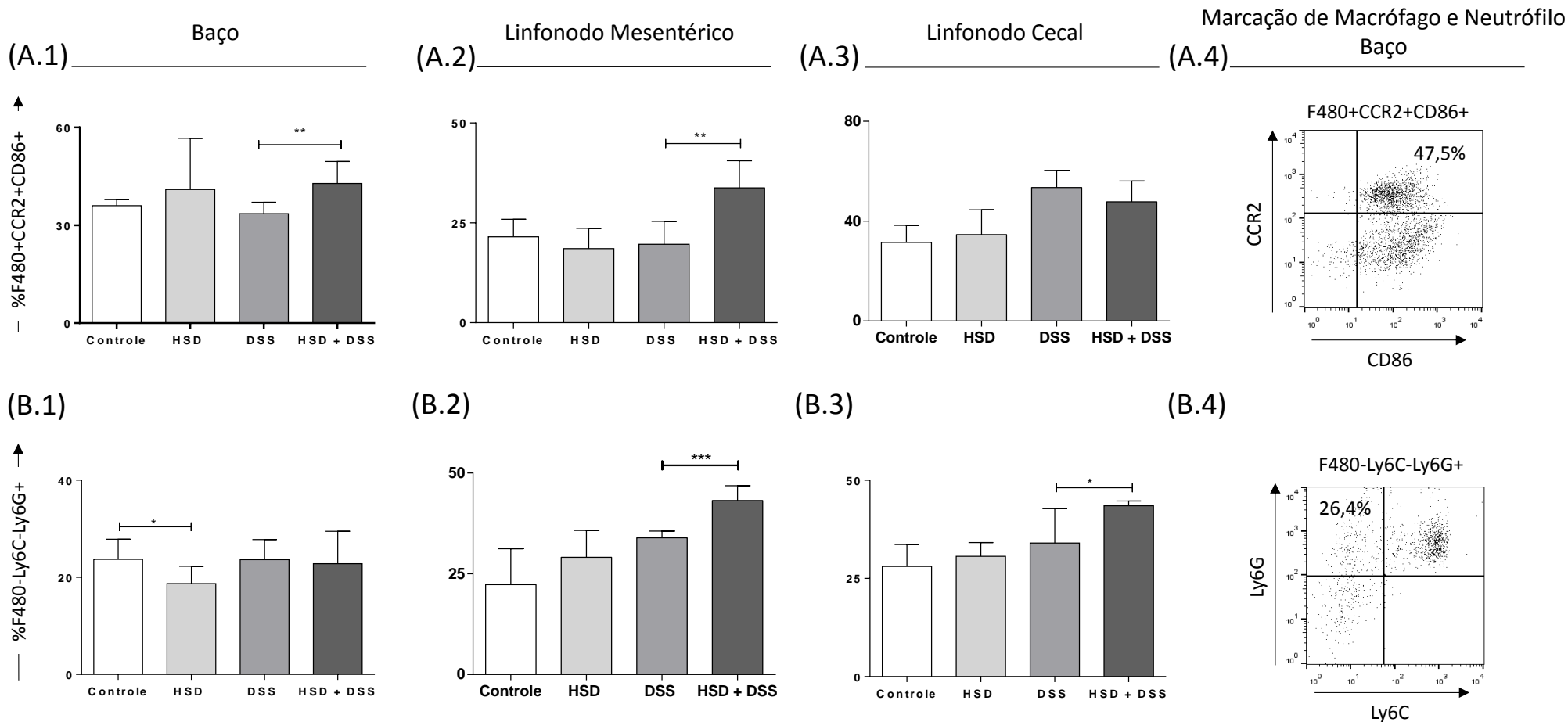


Figura 17. Expressão de CCR2, CD86, Ly6C e Ly6G em células do baço, linfonodo cecal e linfonodos mesentéricos. A expressão dessas moléculas é apresentada como intensidade média de fluorescência (MIF). A citometria de fluxo foi realizada após o sétimo dia de indução da colite por DSS. As diferenças foram avaliadas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em sal e água) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS). (A.1) Frequência de células CCR2+CD86+ no baço (A.2) Frequência de células CCR2+CD86+ nos linfonodos mesentéricos (A.3) Frequência de células CCR2+CD86+ no linfonodo cecal (A.4) Dot plot representativo das células F480+CCR2+CD86+ (B.1) Frequência de células LY6C-Ly6G+ no baço (B.2) Frequência de células LY6C-Ly6G+ nos linfonodos mesentéricos (B.3) Frequência de células LY6C-Ly6G+ no linfonodo cecal (B.4) Dot plot representativo das células Ly6G+Ly6C-. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.3 Resultados Parte III

Os resultados apresentados na terceira parte referem-se ao protocolo no qual é feita uma cinética, com eutanásia dos animais em diferentes tempos após o início da administração do DSS: 1, 3, 5 e 7 dias para avaliação da produção de NAG e MPO nesses diferentes tempos.

5.3.1 A dieta rica em sal não alterou a N- acetilglicosamidase (NAG) no cólon dos animais com colite

Para analisar o infiltrado de macrófagos no cólon, foi avaliada a atividade da enzima N- acetilglicosamidase (NAG) nesse tecido. Conforme representado na figura 18A, a dieta rica em sal não levou a mudanças na produção da enzima NAG no cólon dos animais em nenhum dos tempos de administração do DSS.

5.3.2 A dieta rica em sal modificou a produção de mieloperoxidase (MPO) no cólon dos animais com colite

Para avaliar o infiltrado de neutrófilos no cólon dos animais, a enzima mieloperoxidase (MPO) foi quantificada nesse tecido. A dieta rica em sal levou ao aumento da produção de MPO no cólon dos camundongos que foram submetidos a sete dias de administração de DSS, não sendo diferente nos outros tempos. A elevação da produção dessa enzima leva à inferência de que houve aumento do acúmulo de neutrófilos produtores de MPO no tecido após sete dias de administração de DSS (figura 18B).

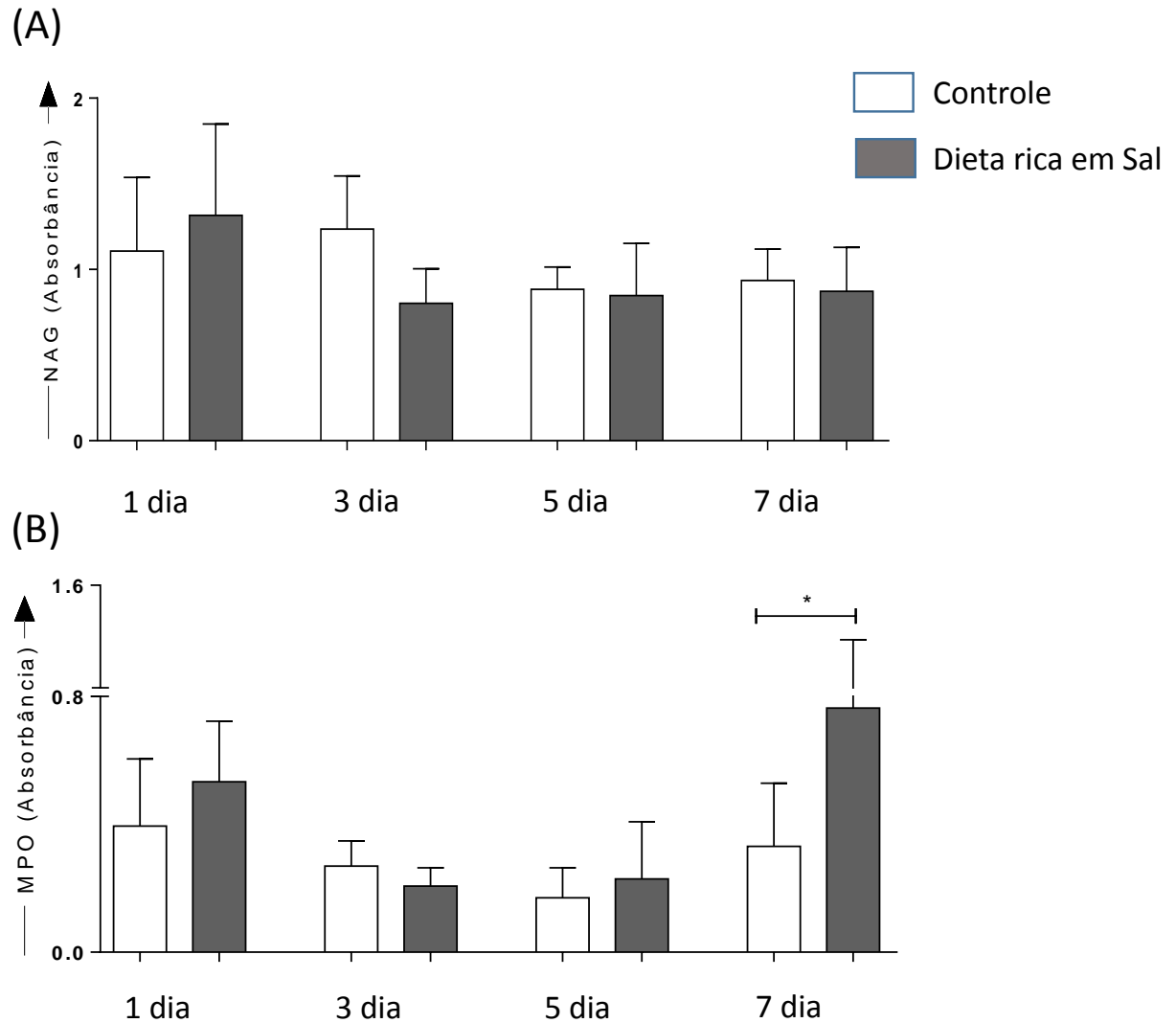


Figura 18. Quantificação da atividade da enzima NAG e da enzima MPO no cólon. A quantificação das enzimas foi feita no extrato de cólon dos animais em diferentes tempos: 1, 3, 5 ou 7 dias após o início da indução da colite por DSS. Foi feito um ensaio enzimático e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro a 500nm. A diferença das quantificações foi avaliada entre os grupos DSS (recebeu dieta padrão e DSS) e HSD + DSS (recebeu dieta rica em sal e DSS) em cada um dos tempos. (A) Quantificação da atividade de NAG (B) Quantificação da atividade de MPO. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.4 Resultados Parte IV

Na quarta parte de resultados, serão representados aqueles obtidos com o quarto e último protocolo, no qual os animais são separados em seis grupos: controle, HSD, DSS, HSD + DSS, KCl e KCl + DSS, para comparação dos efeitos da dieta rica em NaCl e efeitos da dieta rica em KCl.

5.4.1 A dieta rica em NaCl modificou exames bioquímicos dos animais sem colite

A determinação da ureia (que é o produto de degradação final do metabolismo de proteínas e aminoácidos), juntamente com a determinação da creatinina, é amplamente utilizada para a avaliação da função renal. A creatinina é um produto catabólico da creatina que participa da contração da musculatura esquelética.

Apesar de não ter sido observada diferença na dosagem de ureia entre os grupos experimentais (figura 19A), houve um aumento de creatinina no grupo HSD comparado ao grupo controle (figura 19B). O que mostra que a dieta rica em NaCl, mas não a dieta rica em KCl, pode ter levado a um início de comprometimento da função renal.

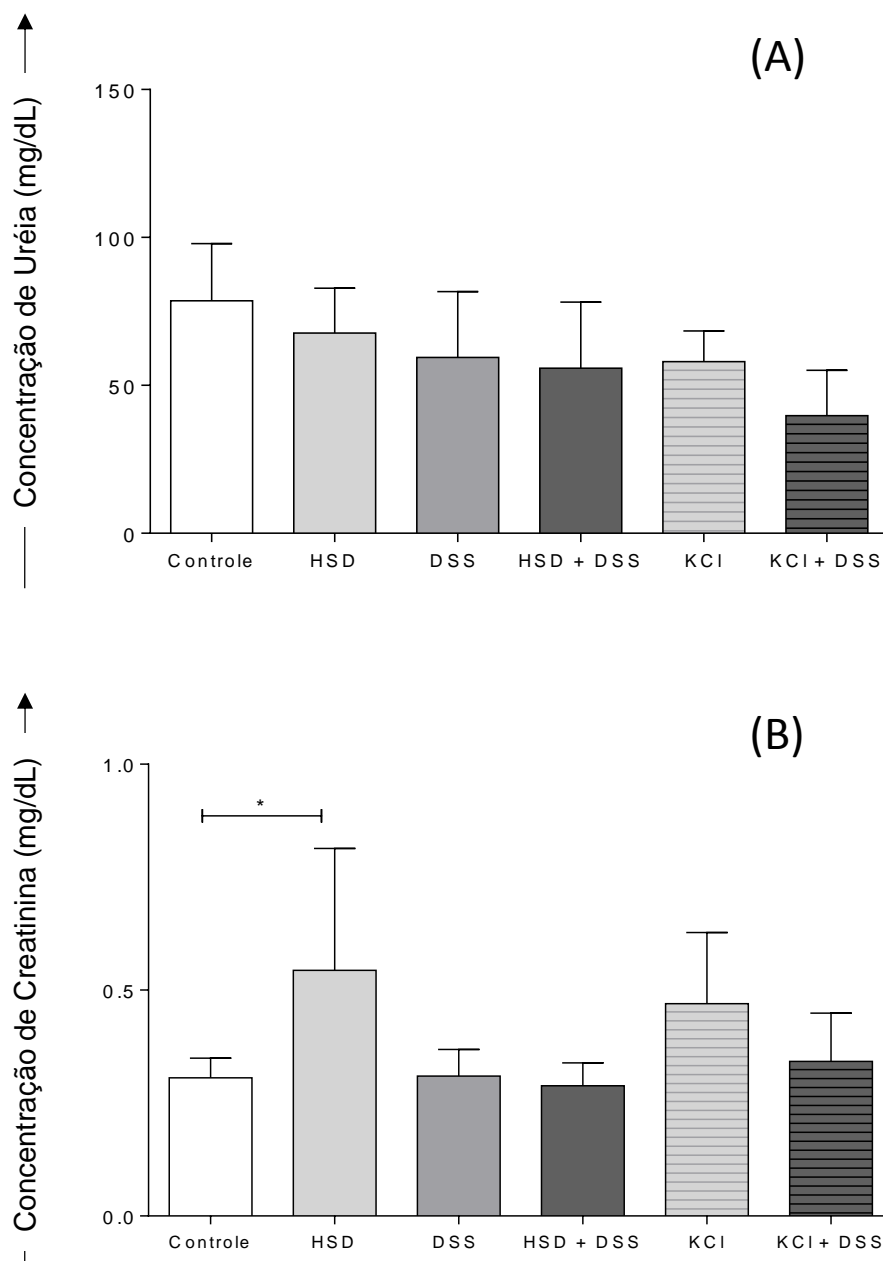


Figura 19. Concentração de ureia e de creatinina do soro. A determinação da concentração de ureia e de creatinina foram feitas com kits para dosagem de ureia e creatinina. As diferenças de concentrações foram feitas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em NaCl e água), HSD + DSS (recebeu dieta rica em NaCl e DSS), KCl (recebeu dieta rica em KCl e água) e KCl + DSS (recebeu dieta rica em KCl e DSS). (A) Concentração de ureia no soro (B) Concentração de creatinina no soro. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.4.2 As dietas ricas em sal modificaram a concentração de hemácias, de hemoglobina, do hematócrito e das plaquetas dos animais com colite

Ambas as dietas ricas em sal, NaCl e KCl, levaram à redução da hemoglobina no sangue dos animais com colite (figura 20). O hematócrito também se apresentou mais baixo nos animais que receberam as dietas ricas em NaCl e em KCl (figura 20B). Assim como os outros parâmetros, as plaquetas (figura 20C) e o número de hemácias também foram mais baixos nos grupos submetidos às dietas ricas em sal (figura 20D).

5.4.3 Os leucócitos e linfócitos totais não foram alterados com as dietas ricas em sal

Como representado nas figuras 20E e 20F, as dietas ricas em NaCl ou KCl não levaram a alterações significativas nos leucócitos ou linfócitos do sangue.

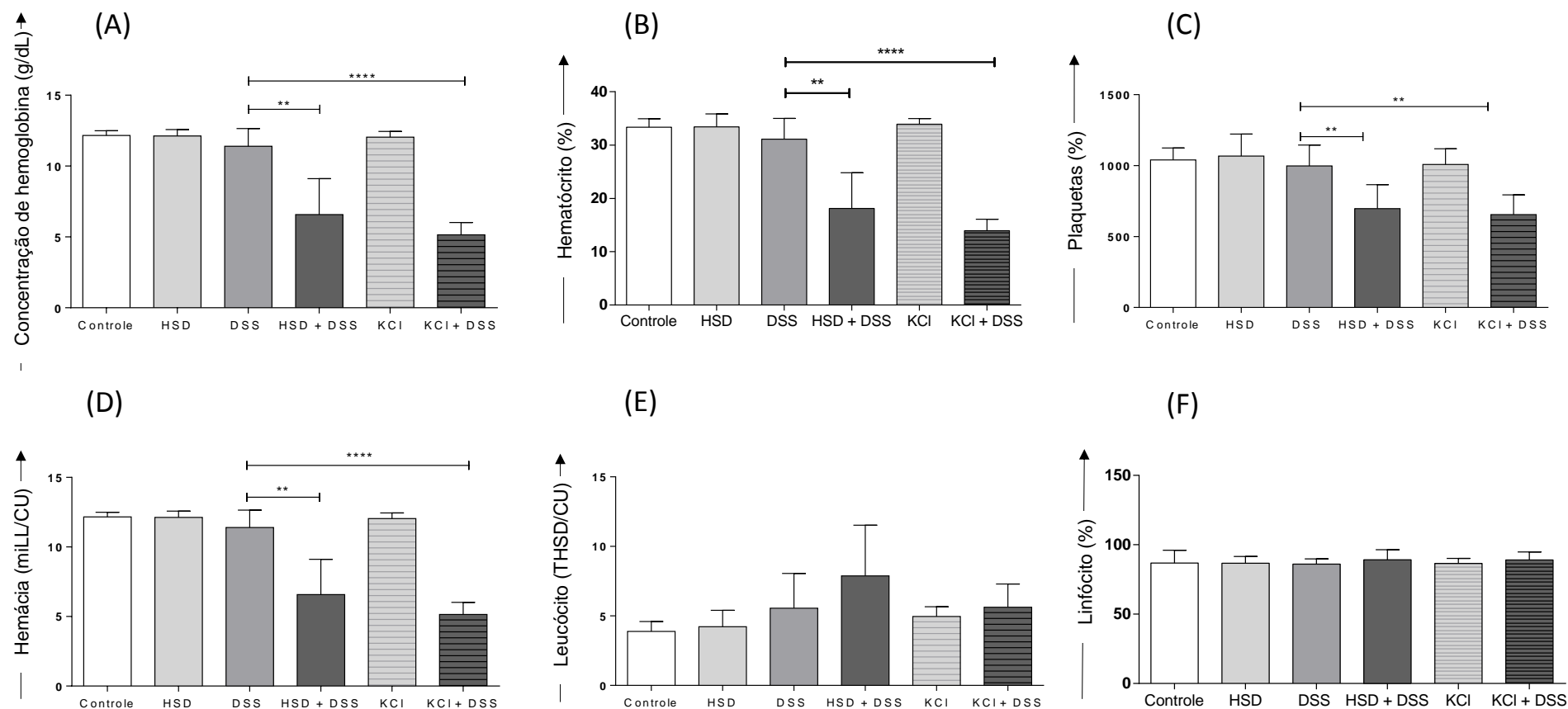


Figura 20. Concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de hemácias, plaquetas, leucócitos e linfócitos no sangue. Essas análises foram realizadas como parte do hemograma completo logo após a eutanásia dos animais com 7 dias de indução da colite por DSS. As diferenças de concentrações foram feitas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em NaCl e água), HSD + DSS (recebeu dieta rica em NaCl e DSS), KCl (recebeu dieta rica em KCl e água) e KCl + DSS (recebeu dieta rica em KCl e DSS). (A) Concentração hemoglobina (B) Hematócrito (C) Contagem de plaquetas (D) Contagem de hemácias (E) Contagem de leucócitos (F) Contagem de linfócitos. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.4.4 As dietas ricas em sal levaram a alterações no perfil de citocinas

Os níveis de IFN- γ , citocina pró-inflamatória importante no início do desenvolvimento da colite, foram mais altos no grupo controle do que no grupo HSD e foi maior também no grupo DSS do que no grupo HSD + DSS. Não houve diferenças entre os demais grupos experimentais (figura 21A).

A IL-10, importante citocina anti-inflamatória e essencial para a homeostase intestinal (Gomes-Santos *et al.*, 2012), foi dosada no cólon dos animais. A única diferença encontrada foi entre o grupo controle e o grupo HSD. Não foi observada diferença na concentração dessa citocina entre os outros grupos (figura 21B).

A IL-17A, citocina pró-inflamatória associada a diversas doenças inflamatórias (Chen *et al.*, 2003; Chabaud *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2000; Luzzza *et al.*, 2000; Linden, 2001), apresentou-se aumentada no grupo KCl com relação ao grupo controle. O grupo HSD + DSS teve menor concentração da citocina do que o grupo DSS. E ainda foi observado um aumento da concentração de IL-17A no grupo KCl + DSS quando comparado ao grupo HSD + DSS (figura 21C).

A citocina IL-23, também relacionada a doenças inflamatórias e responsável pela manutenção das células Th17, apresentou-se mais alta no grupo HSD do que no grupo controle. Entre os demais grupos, não foram observadas diferenças na concentração dessa citocina (figura 21D).

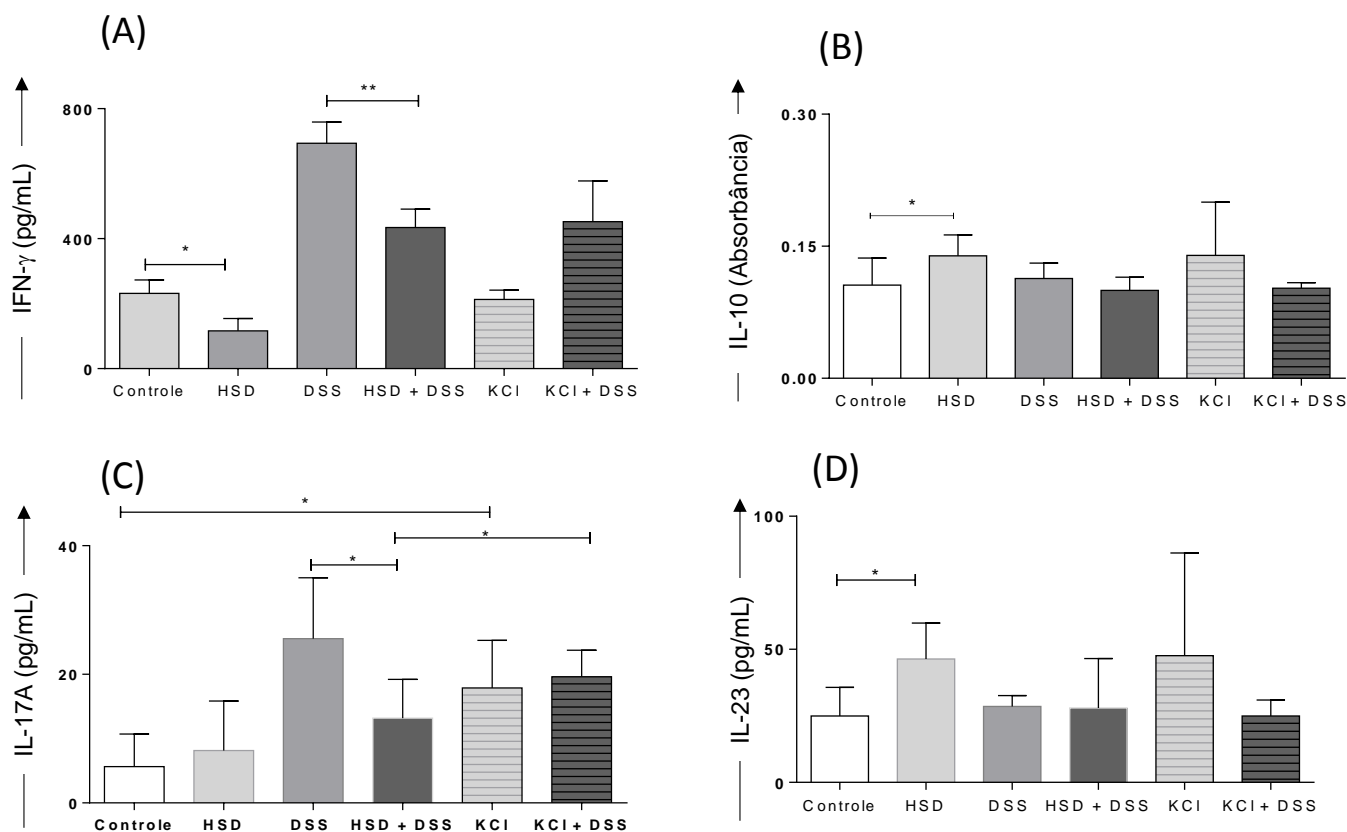
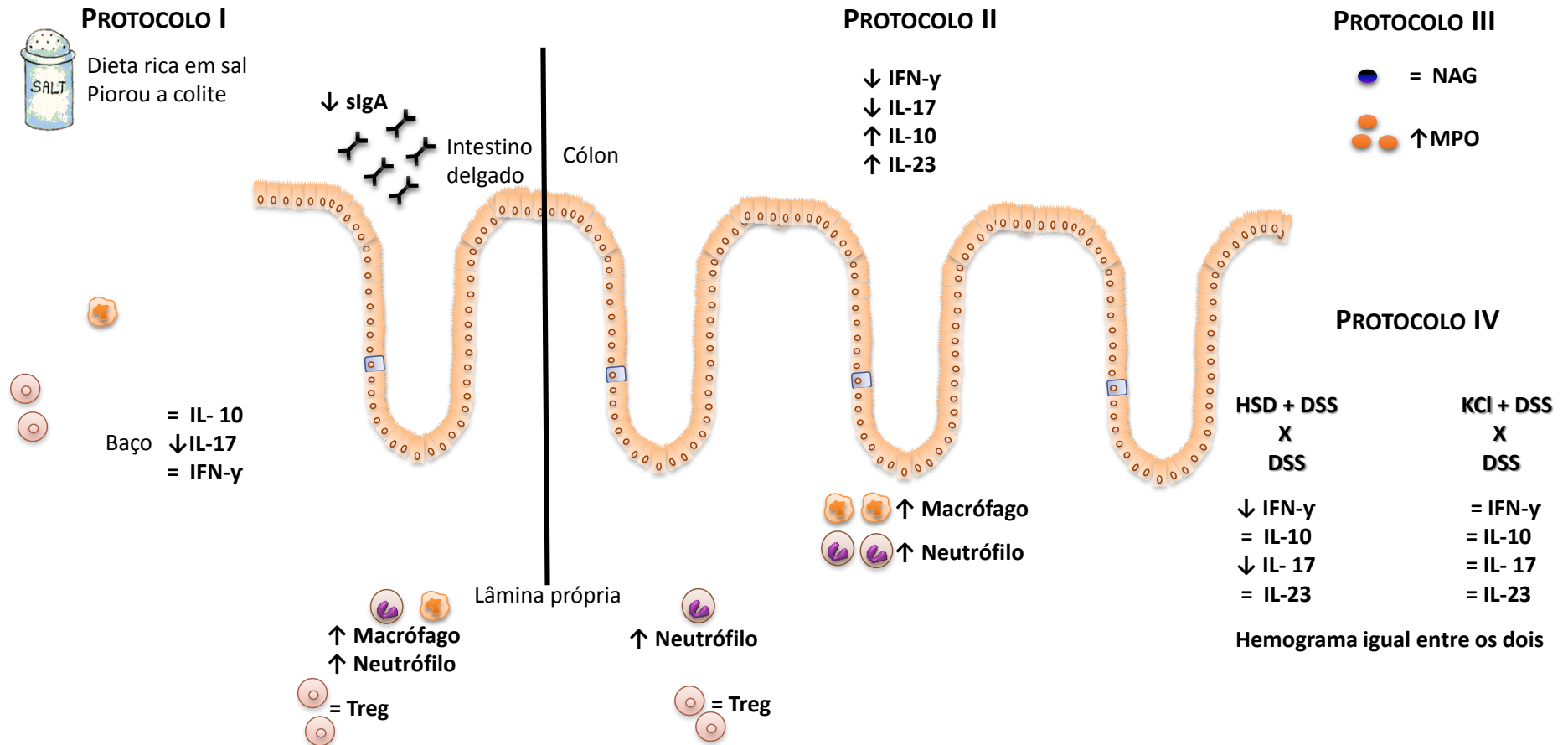


Figura 21. Concentração de IFN- γ , IL-10, IL-17 e IL-23 no cólon. A concentração das citocinas foram avaliadas após sete dias de indução da colite por DSS. As diferenças de concentrações foram feitas entre os grupos controle, DSS (recebeu dieta padrão e DSS), HSD (recebeu dieta rica em NaCl e água), HSD + DSS (recebeu dieta rica em NaCl e DSS), KCl (recebeu dieta rica em KCl e água) e KCl + DSS (recebeu dieta rica em KCl e DSS). As citocinas foram mensuradas em extrato de tecido através da técnica de ELISA. (A) Concentração de IFN- γ no cólon (B) Concentração de IL-10 no cólon (C) Concentração de IL-17 no cólon (D) Concentração de IL-23 no cólon. Níveis de significância baseado no Teste t de student. Diferenças estatisticamente significativas são representadas por asterisco (*). O nível de significância mínimo aceito foi $p < 0,05$.

5.5 Resumo dos resultados



6 DISCUSSÃO

6. Discussão

Considerando a importância epidemiológica, clínica e de saúde pública que as doenças inflamatórias intestinais representam em todo o mundo, há inúmeros modelos experimentais para o estudo da colite em animais. Os modelos experimentais são de extrema importância para o estudo de aspectos das doenças que seriam muito difíceis de serem abordados em seres humanos.

O modelo de colite induzida pelo DSS é um dos modelos animais mais utilizados e foi primeiramente descrito por Okayasu e colaboradores em 1990 (OKAYASU et al., 1990). Sua ampla utilização nos estudos de DIIs deve-se provavelmente à facilidade de utilização e indução (o agente químico é solubilizado na água de beber das gaiolas) além da possibilidade de se definir com precisão o período da indução, o que não é possível nos camundongos com deficiências genéticas que predispõem ao desenvolvimento da colite espontânea. O modelo também apresenta um baixo risco de mortalidade na indução se comparado ao modelo de colite induzida por TNBS. Porém, deve-se observar que a indução da colite depende, entre outros fatores, da linhagem de camundongos utilizada, sendo os camundongos C57BL/6 os mais susceptíveis a indução da colite pelo DSS (MELGAR et al., 2005).

Observados esses fatores, neste trabalho, foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas que foram mantidos em gaiolas coletivas.

Nosso trabalho foi desenvolvido tendo como referência dois trabalhos publicados em 2013, nos quais a dieta rica em sal (NaCl) piorou a encefalomielite autoimune experimental (EAE) de camundongos submetidos à dieta (KLEINWIETFELD et al., 2013; WU et al., 2013). A principal citocina envolvida no agravamento da EAE nesses estudos foi a IL-17A e foi demonstrado que a dieta rica em sal atua diretamente na diferenciação das células Th17 pela sinalização via SGK1. Essa citocina pró-inflamatória também tem um papel patogênico importante na Doença de Crohn, na colite ulcerativa e no modelo experimental de colite induzida por DSS.

Como a associação da dieta rica em sal com colite não havia ainda sido estudada, nosso trabalho utilizou a mesma dieta rica em sal utilizada por Kleinewietfeld em seu trabalho, onde foi feito um acréscimo de 4% de NaCl na dieta AIN 93 G.

Parte I

Neste trabalho, foi demonstrado que a dieta rica em NaCl leva a alterações histológicas no cólon de camundongos mesmo sem a indução de colite, além de levar a alterações clínicas, bioquímicas e imunológicas nos camundongos alimentados com a dieta rica em sal e submetidos à administração de DSS.

Em 2013, dois trabalhos (KLEINEWIETFELD et al., 2013; WU et al., 2013) fizeram uma associação inédita ao relacionar a dieta rica em sal (NaCl) com uma doença autoimune, a encefalomielite autoimune experimental (EAE). Esses trabalhos mostraram que a dieta rica em sal desencadeia o desenvolvimento de células Th17 patogênicas. Porém, a associação da dieta rica em sal e a colite ulcerativa ainda não havia sido investigada, sendo esta a relevância deste trabalho, que avaliou os efeitos da dieta rica em sal na colite murina induzida por DSS, na qual as células Th17 apresentam papel importante (ITO et al., 2008).

Para o reconhecimento adequado dos efeitos da dieta rica em sal na colite experimental murina, é necessário que seja feita uma avaliação do estado nutricional e do quadro clínico dos animais. Foi demonstrado que, durante a fase aguda da colite induzida por DSS, os camundongos desenvolvem uma inflamação da mucosa do cólon, com ulcerações, perda de peso corporal, diarreia e sangramento retal (OKAYASU et al., 1990). A colite induzida por DSS também leva ao encurtamento do cólon (MELGAR et al., 2005), sendo este outro parâmetro importante a ser avaliado na doença. Neste trabalho, os parâmetros clínicos citados acima foram avaliados para verificação do agravamento da doença. Mas é importante observar que as alterações clínicas foram

avaliadas em conjunto com a quantificação do consumo de dieta e de DSS para garantir que as manifestações clínicas não seriam decorrentes de diferenças no consumo alimentar ou de DSS. No primeiro protocolo utilizado, apesar do consumo igual de dieta entre os grupos, o consumo de DSS no grupo dos animais submetidos à dieta rica em sal e à administração de DSS foi maior do que no grupo que recebeu dieta padrão e DSS, o que levou ao questionamento de que os resultados obtidos a partir desse protocolo seriam decorrentes do consumo aumentado de DSS ou da dieta rica em sal. Com isso, nos experimentos posteriores, o consumo de DSS foi restringido, garantindo que os dois grupos consumissem a mesma quantidade de DSS.

No nosso trabalho, como proposto por Okayasu e colaboradores em 1990 e demonstrado em estudos posteriores (MELGAR et al., 2005; MELGAR et al., 2008), os camundongos submetidos à administração de DSS apresentaram perda de peso, diarreia e sangramento. Os animais que, além da administração de DSS, também receberam a dieta rica em sal, manifestaram essas características clínicas de forma mais exacerbada, comprovando que a dieta rica em sal leva ao agravamento da colite induzida por DSS. Esses dados são semelhantes aos encontrados por Kleinewietfeld e colaboradores em seu trabalho, no qual os camundongos com EAE alimentados com dieta rica em sal apresentaram índices clínicos da doença maiores do que aqueles camundongos com EAE que receberam dieta padrão (KLEINewIETFELD et al., 2013).

Tendo em vista que as dietas utilizadas neste trabalho, dieta AIN 93 G (dieta padrão) e a dieta rica em sal (NaCl 4%), apresentam a mesma quantidade calórica, sendo diferentes apenas na quantidade de sódio e de cloreto, aliado ao fato de não houve diferenças no consumo alimentar entre os grupos, pode-se inferir que o menor ganho de peso observado no grupo que recebeu DSS e dieta rica em sal com relação ao grupo que recebeu DSS e dieta padrão foi decorrente dos efeitos da dieta rica em sal.

As alterações clínicas e histológicas observadas na colite induzida por DSS assemelham-se àquelas observadas nas doenças inflamatórias intestinais em humanos. Típicas alterações histológicas na colite por DSS incluem depleção de mucinas, degeneração e necrose do epitélio levando ao desaparecimento das células epiteliais, infiltrado de neutrófilos na lâmina própria e submucosa e abscessos nas criptas (PERSE E CERAR, 2012). No presente trabalho, as alterações histológicas observadas nos camundongos submetidos à administração de DSS nas mamadeiras foram principalmente alterações na arquitetura da mucosa colônica, aumento de edema, infiltrado inflamatório, espessamento da camada muscular, depleção de células caliciformes e abscessos nas criptas. Ambos os grupos que receberam o DSS apresentaram essas alterações, porém, o grupo que recebeu dieta rica em sal teve o índice histológico maior, mostrando que a dieta rica em NaCl foi capaz de agravar a inflamação. Kleinewietfeld e colaboradores, que estudaram o efeito da dieta rica em sal na EAE, também encontraram alterações histológicas mais exacerbadas na medula espinhal dos animais com EAE alimentados com dieta rica em sal do que naqueles que receberam dieta padrão (KLEINewIETFELD et al., 2013). Um ponto importante do nosso trabalho é que o grupo que recebeu dieta rica em sal e água apresentou alterações morfológicas quando comparado ao grupo controle, o que demonstra que a dieta rica em sal foi capaz de levar a inflamação mesmo que na ausência dos efeitos do DSS.

Parte II

Na segunda parte do trabalho, o protocolo foi ligeiramente modificado. Enquanto que no primeiro momento os animais que recebiam dieta rica em sal eram submetidos a essa dieta apenas nas duas primeiras semanas sendo a dieta substituída pela dieta padrão na última semana, no segundo protocolo, a dieta rica em sal foi ofertada durante todo o experimento para os grupos que seriam submetidos ao

tratamento com essa dieta. Como isso, era esperado que os resultados obtidos no primeiro protocolo se mantivessem no segundo, ou seja, a dieta rica em sal levaria ao agravamento da colite induzida por DSS também no desenho experimental com três semanas de dieta. E foi exatamente isso o que nosso trabalho mostrou: o grupo HSD + DSS obteve maior índice clínico da doença, maior encurtamento do cólon e maior índice histológico do que o grupo DSS. Ou seja, novamente a dieta rica em sal piorou a colite experimental murina. Assim, como anteriormente, a dieta rica em sal no grupo que recebeu água durante todo o experimento também levou a alterações morfológicas quando comparado ao grupo controle.

O consumo alimentar e o consumo de DSS, que foram monitorados durante todo o experimento, não apresentaram diferenças entre os grupos. O que demonstra que as alterações observadas nos experimentos são decorrentes do efeito da dieta e não de outro fator externo. Enquanto que, no primeiro protocolo, o consumo de DSS foi maior no grupo que recebeu DSS e dieta rica em sal do que no grupo que recebeu DSS e dieta padrão, no segundo desenho experimental, foi feita uma restrição da oferta de DSS aos grupos submetidos a esse tratamento de modo que ambos os grupos recebessem a mesma quantidade. Com isso, pode-se garantir que o agravamento da colite observado com a dieta rica em sal foi originado da dieta e não de um maior consumo de DSS.

Os camundongos com colite induzida por DSS exibem algumas mudanças histológicas e um perfil de produção de citocinas semelhantes àqueles observados em humanos com doenças inflamatórias intestinais, principalmente a colite ulcerativa. Na colite aguda induzida por DSS, um massivo infiltrado aparece nas lesões inflamatórias, consistindo principalmente em linfócitos B e T, macrófagos e neutrófilos que produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, e IL-17 (ZHANG e LI, 2014). Apesar de o mecanismo pelo qual o DSS passa pelas células epiteliais ainda permanecer desconhecido, Yan e colaboradores mostraram que as primeiras modificações observadas com a administração do DSS foram detectadas

depois de um dia e incluem além de alterações na permeabilidade intestinal (ICHIKAWA-TOMIKAWA et al., 2011; PORITZ et al., 2007), aumento significativo da expressão de citocinas anti- e pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-10, eIL-12) no cólon (YAN et al., 2009).

A IL-17A é uma importante citocina pró-inflamatória secretada pelas células Th17, sendo que alguns monócitos e macrófagos também produzem essa citocina. Em camundongos, essa citocina também é secretada por células NKT e por células T $\gamma\delta$. O receptor de IL-17A (IL-17RA) é amplamente expresso em uma variedade de tipos celulares e essencialmente envolvido na sinalização de IL-17A e IL-17F (OGAWA et al., 2004).

Além das citocinas citadas acima, a IL-23, envolvida em diversas doenças inflamatórias, foi identificada como tendo um papel crucial na estabilização e manutenção do fenótipo de células Th17 por meio do aumento do receptor da IL-23 (IL-23R) (AGGARWAL et al., 2003; ZHOU et al., 2007).

As respostas inflamatórias são seguidas de alterações na produção de citocinas. No nosso trabalho, as citocinas no extrato do cólon sofreram algumas modificações. O IFN- γ estava aumentado nos extratos de cólon dos animais do grupo controle em relação aos do grupo HSD e estava maior também nos extratos do grupo DSS quando comparado aos do grupo HSD + DSS. Apesar da recente descoberta da importância das células Th17 na patogênese das DIIs, essas doenças tem sido há muito tempo descritas como mediadas por células Th1 pelo fato de o IFN- γ ser essencial para a progressão das mesmas (POWRIE et al., 1994; ZHANG e LI, 2014). Nosso resultado, mostrando que os níveis locais de IFN- γ estavam reduzidos no grupo HSD + DSS quando comparados aos níveis do grupo DSS no 7º dia de administração do DSS pode indicar a destruição do tecido (demonstrada na histologia realizada nesse dia) com consequente perda de células o que levaria a uma menor produção de citocinas nos grupos com maiores danos ao tecido. Para a detecção dos efeitos da dieta rica em sal no padrão de citocinas do cólon seria mais adequado realizar a medida destas em momentos anteriores do protocolo de indução da colite. Um acompanhamento da

cinética de produção dessas citocinas antes e ao longo dos 7 dias de administração de DSS será realizado em experimentos futuros para esclarecimento desse aspecto da análise dos efeitos da dieta rica em sal.

Assim como o IFN- γ , no cólon, a IL-17A também foi maior no grupo controle do que no grupo HSD, possivelmente pela mesma razão, a destruição do tecido causada pela inflamação pode ter levado a uma menor produção da citocina ou o tempo da dosagem da citocina não foi adequado para detecção de diferença de concentração da IL-17A.

Ainda no cólon, a IL-23 mostrou-se aumentada no grupo HSD quando comparada ao grupo controle. A citocina IL-23 foi identificada como importante na diferenciação de células Th17, porém, atualmente, acredita-se ainda que, além disso, essa citocina seja essencial para a sobrevivência e expansão das células Th17 patogênicas (CUA et al., 2003; HARRINGTON et al., 2005; LANGRISH et al., 2005; PARK et al., 2005; VELDHOEN et al., 2006). A quinase serina/treonina (SGK1) foi identificada como parte essencial da sinalização de IL-23 e importante para a regulação da expressão do receptor de IL-23 (IL-23R), assim como na estabilização do fenótipo de células Th17 por meio da desativação do Foxo1, um repressor direto de IL-23R. A SGK1 foi ainda mostrada como importante controladora do transporte de Na e na homeostase de NaCl em algumas células (WULFF et al., 2002; SALKER et al., 2011; ZHANG et al., 2005; SHELLY e HERRERA, 2002). Wu e colaboradores mostraram que pequenos aumentos na concentração de NaCl podem induzir a expressão de SGK1, promover a expressão de IL-23R e aumentar a diferenciação de células Th17 *in vitro* e *in vivo*, elevando o desenvolvimento de doenças autoimunes (WU et al., 2013).

Assim, o aumento da IL-23 no cólon pode ser decorrente da ação do sal no aumento da expressão de IL-23R, por meio da SGK1. Esse resultado é importante pois demonstra que no grupo tratado somente com dieta rica em sal (HSD), o efeito do sal sobre a produção de IL-23 (que posteriormente levaria a um efeito sobre a

diferenciação de células Th17) pode ser observado. Provavelmente, o fato da inflamação do cólon nesses animais não ser muito pronunciada (ainda que presente) permite a detecção dessa citocina. Por outro lado, o grupo HSD + DSS não apresentou diferença da concentração da citocina possivelmente devido à grande destruição tecidual observada no cólon desses animais no dia 7 do protocolo de indução de colite. Dessa maneira, a detecção de uma citocina precoce na diferenciação Th17 no cólon dos animais tratados com a dieta rica em sal (mas não tratados com DSS) confirma nossa hipótese de que o sal induz mediadores importantes nessa diferenciação que serão potenciados por um evento inflamatório já presente (a colite).

As citocinas IL-10, IL-17A e IFN- γ foram dosadas também no baço e nos linfonodos (cecal e mesentéricos). No baço, a IL-10 e o IFN- γ apresentaram-se sem alterações, mas a IL-17A foi menor no grupo HSD do que no grupo controle. Nos linfonodos, não foram observadas diferenças entre as concentrações das citocinas.

A IgA secretória (sIgA) produzida no intestino pode ser proveniente de duas fontes principais: células B2 e células B1 presentes nas Placas de Peyer ou folículos linfoides isolados e na lâmina própria do intestino, respectivamente (FAGARASAN et al., 2001; MORA e VON ANDRIAN, 2008). Essa imunoglobulina exerce funções imunológicas não inflamatórias, participando do *clearance* de complexos imunes e neutralização de patógenos além de suprimir a atração de neutrófilos, eosinófilos e monócitos e inibir a produção de algumas citocinas como IL-1 e TNF- α por monócitos (SUTHERLAND e FAGARASAN, 2012; BRANDTZAEG, 2010; STRUGNELL e WIJBURG, 2010). No nosso trabalho, os níveis de sIgA estavam aumentados no grupo controle quando comparado ao grupo HSD sendo que não houve diferenças entre os demais grupos. Resultados semelhantes foram encontrados por Squarcia e colaboradores em seu trabalho, no qual a produção de sIgA no intestino foi maior no grupo controle do que no grupo tratado com DSS (SQUARCIA *et al.*, 1991). Além disto, existem dados na literatura mostrando que a produção de sIgA está reduzida em

humanos com Doença de Crohn. Nesses indivíduos ocorre um desvio da atividade dos linfócitos B da mucosa intestinal para a produção de IgG, isotipo em geral raro na mucosa do intestino (BRANDTZAEG, 1985). Essa redução na produção local de IgA pode ocorrer devido à produção de citocinas inflamatórias que são inibidoras dos mediadores responsáveis pela secreção de IgA. A síntese de IgA requer inicialmente a troca de isotipos pelos linfócitos B2 das placas de Peyer e posteriormente a proliferação das células B IgA+ nos linfonodos mesentéricos. Essas atividades são induzidas pelas citocinas TGF- β , IL-10 e IL-5 produzidas por linfócitos T CD4+ residentes nesses órgãos (BEMARK et al, 2012). Por outro lado, a produção de IgA na lamina própria do intestino pelas células B1 ocorre independentemente da ação auxiliar dos linfócitos T embora seja também estimulada por TGF- β , ácido retinóico e IL-10 derivadas de vários tipos celulares como células dendrítica, macrófagos e linfócitos (FAGARASAN et al., 2001; MORA et al., 2006; MORA e VON ANDRIAN, 2008; BEMARK et al., 2012).

O peso do baço foi comparado entre os grupos e foi encontrado que os animais do grupo HSD + DSS apresentavam baços mais pesados do que os demais grupos. Esse resultado pode ser indicativo de maior atividade imunológica inflamatória

Para a análise do fenótipo de células envolvidas no agravamento da colite na presença da dieta rica em sal, fizemos uma análise das células imunes presentes no baço, linfonodos mesentéricos e cecal por citometria de fluxo e observamos um aumento na frequência de células CCR2+ CD86+ no baço e nos linfonodos mesentéricos, mas não no linfonodo cecal. Esse resultado pode sugerir o aumento da migração de macrófagos nos animais alimentados com dieta rica em sal. As células Ly6C- Ly6G+, mais frequentes no grupo HSD + DSS, nos linfonodos mesentéricos e cecal, podem indicar um aumento de neutrófilos com a administração de DSS aliada à dieta rica em sal.

O aumento de células Ly6C- Ly6G+ (neutrófilos) está de acordo com o resultado da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), produzida por

neutrófilos, no extrato de cólon dos animais tratados com a dieta rica em sal e com DSS. Nesse local, foi observado um aumento da concentração da enzima no tempo de sete dias após o início da indução da colite. O aumento da MPO também foi encontrado em outros trabalhos que observaram a produção dessa enzima durante a colite induzida por DSS (VERMA et al., 2014; ITO et al., 2006). Esses resultados em conjunto mostram a importância do neutrófilo no agravamento da colite pelo tratamento com a dieta rica em sal.

Com relação às células T reguladoras, não houve diferenças nas células CD4+CD25+Foxp3+Neuropilina+, tampouco nas células CD25+LAP+ ou CD25-LAP+. Células CD4+CD25+Foxp3+ já foram descritas como importantes na manutenção da homeostase intestinal. Além disso, a secreção de IL-10 por células dendríticas é fundamental para a manutenção da expressão de Foxp3 em células T reguladoras induzidas na periferia durante o desenvolvimento da colite (MURAI et al., 2009). Assim, esse resultado é coerente com a produção inalterada de IL-10 encontrada neste trabalho.

Parte III

O experimento de análise cinética dos mediadores inflamatórios ao longo da indução de colite teve como objetivo verificar o momento no qual o envolvimento de macrófagos e neutrófilos é importante para o agravamento da colite na presença da dieta rica em sal. Para tal, foram feitos teste para quantificação de MPO e NAG nos tempos 1, 3, 5 e 7 dias após o início da administração de DSS.

A atividade de MPO foi maior no grupo HSD + DSS no tempo de sete dias. A atividade de NAG não foi diferente entre os grupos em nenhum dos tempos estudados. Esses resultados indicam que os neutrófilos são importantes no agravamento da colite na presença da dieta rica em sal em momento mais tardio da doença. Verma e

colaboradores também encontraram o aumento da MPO em camundongos submetidos a sete dias de administração de DSS (VERMA et al., 2014). Por outro lado, nossos resultados são coerentes também com o aumento da IL-23 nos animais tratados com a dieta rica em sal somente (grupo HSD). Todos os dados disponíveis indicam que a indução da diferenciação de células Th17 e o consequente recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório são importantes componentes responsáveis pelo agravamento da colite pela dieta rica em NaCl.

Parte IV

Os resultados de índice clínico, comprimento do cólon, índice histológico e produção de MPO evidenciaram que a dieta rica em sal leva ao agravamento da colite induzida por DSS em camundongos com um concomitante aumento no recrutamento de neutrófilos no grupo que consome dieta rica em sal. Em seguida, realizamos um experimento no qual os camundongos foram divididos nos grupos dos experimentos anteriores (controle, HSD, DSS e HSD + DSS) com o acréscimo de outros dois grupos: KCl e KCl + DSS. Nosso objetivo foi comparar os resultados anteriores com a dieta rica em NaCl com uma dieta rica em outro sal, no caso foi utilizado o KCl. Para tal, foram dosadas as citocinas IL-10, IL-17A, IL-23 e IFN- γ no cólon, o hemograma foi analisado além de testes bioquímicos. As citocinas no grupo que recebeu dieta rica em KCl e DSS foram semelhantes às concentrações no grupo que recebeu HSD e DSS. Esse resultado foi diferente do encontrado por Kleinewietfeld em seu trabalho com dieta rica em sal em camundongos com EAE, onde a o aumento da concentração de NaCl levou a uma maior secreção de IL-17A sendo que o aumento de MgCl₂ não levou a uma maior produção da citocina (KLEINewIETFELD et al., 2013).

A creatinina estava mais aumentada no grupo que recebeu dieta rica em NaCl quando comparado ao controle, o que não foi observado pelo grupo que recebeu KCl.

Isso indica que teve início um comprometimento da função renal dos animais do grupo HSD, o que não foi observado nos demais grupos, nem no grupo com maior teor de outro sal, o KCl.

Além das citocinas, o hemograma também apresentou resultados semelhantes entre os efeitos da dieta rica em NaCl e em KCl na colite induzida por DSS.

Esses resultados sugerem que a dieta rica em NaCl e a dieta rica em KCl apresentam efeitos semelhantes na colite, sendo os efeitos de agravamento da colite não exclusivos do sal NaCl.

Uma possível justificativa para esses resultados semelhantes dos efeitos da dieta rica em NaCl e dieta rica em KCl seria a WNK (*with no lysine* (K)), uma família de quatro membros de proteínas quinases deficientes em lisina, encontrada em todos os eucariotos multicelulares e em alguns unicelulares. As ações das WNKs levam a conexões com transportadores e canais de íons, co-transportadores de NaCl e KCl, canal renal de potássio e canal epitelial de sódio (ENaC). Os mecanismos pelos quais as WNKs regulam esses transportadores não são claros, mas sabe-se que a WNK1 está relacionada com a ativação de outras proteínas quinases que modulam o transporte de íons, entre elas a SGK1. A SGK1 afeta a atividade de ENaC, a quinase responsiva ao estresse oxidativo (ORS1) e a quinase rica em alanina, prolina e serina (SPAK) que controla a atividade de co-transportadores de NaCl e KCl. Além disto, ela ainda é essencial para a sinalização de IL-23R e conseqüentemente estabilização do fenótipo de células Th17 por meio da desativação da Foxo1, um repressor direto da expressão de IL-23R.

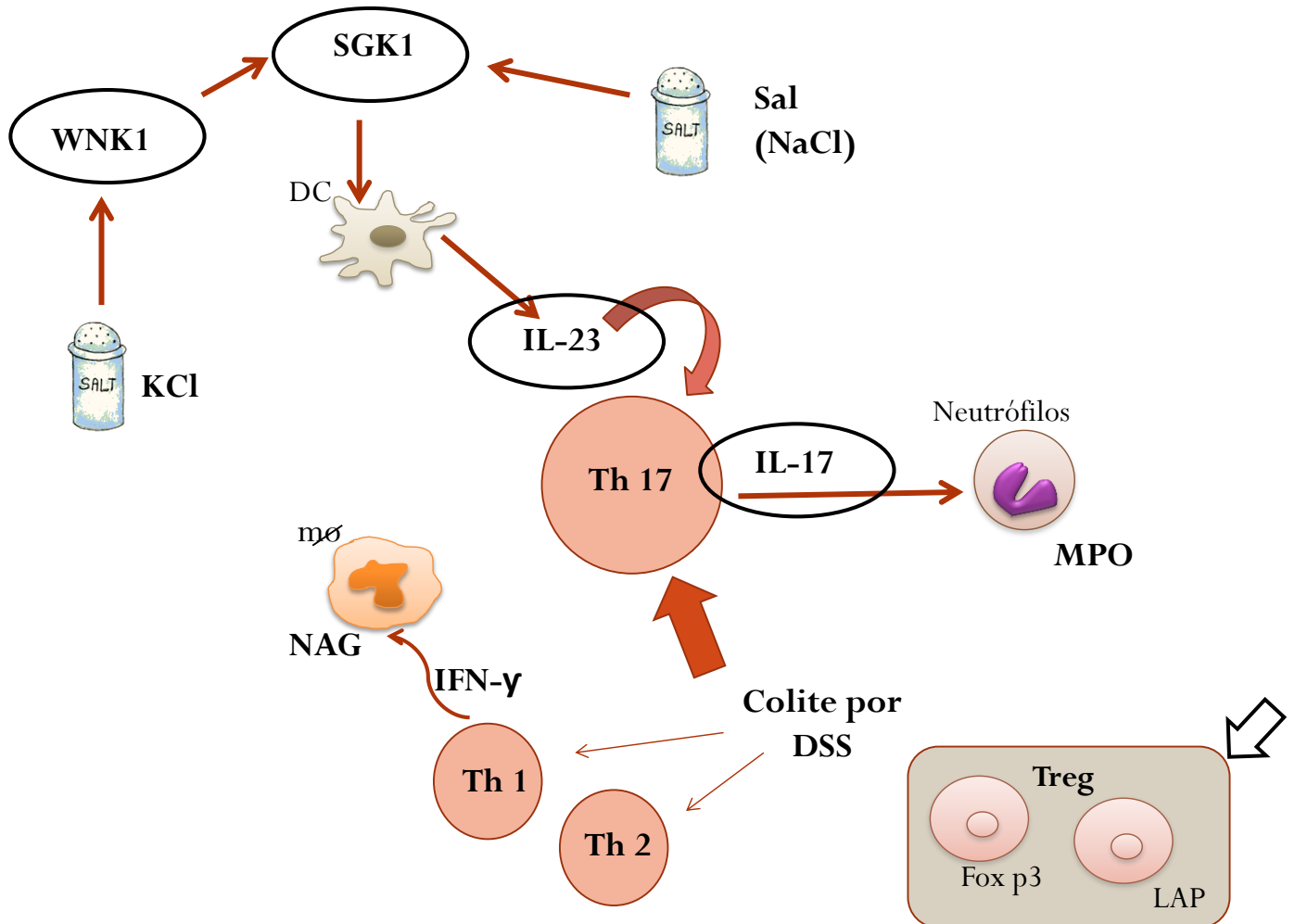
Wu e colaboradores mostraram que aumentos modestos na concentração de sal induziram a expressão de SGK1, promoveram a expressão de IL-23R e aumentaram a diferenciação de células Th17. Eles mostraram ainda que a perda da SGK1 evitou a diferenciação de Th17 mediada por Na, de forma dependente da IL-23. Em seu

trabalho, Wu e colaboradores demonstraram, então, o papel crucial da SGK1 no desenvolvimento de células Th17 patogênicas desencadeado pela dieta rica em sal (WU et al., 2013).

Tendo em vista que a SGK1 pode ser induzida tanto pelo aumento da concentração de NaCl quanto pelo aumento de KCl (por meio da WNK1), pode-se inferir que os efeitos de agravamento da colite observados nos animais alimentados com dieta rica em NaCl e dieta rica em KCl estão relacionados à ativação da SGK1.

Seria interessante utilizar, em experimentos futuros, como controle do NaCl, o mesmo sal utilizado por Kleinewietfeld e colaboradores, $MgCl_2$, para confirmar que apenas os sais que interferem com a ação de SGK1 são capazes de agravar a colite, como mostrado no modelo de EAE.

6.1 Discussão: Hipótese de mecanismo de ação do sal no agravamento da colite



7 CONCLUSÃO

7. Conclusão

A dieta rica em NaCl consumida antes da indução da colite por DSS e substituída por dieta padrão durante a indução da colite leva ao agravamento da colite, medido pelo aumento do índice clínico da doença, encurtamento do cólon e aumento do índice histológico.

Como esperado, a dieta rica em sal consumida antes e durante o período de indução da colite por DSS também agravou a colite, com aumento do índice clínico da doença, encurtamento do cólon e aumento do índice histológico, além de induzir alterações no perfil de citocinas e frequência de células.

A comparação dos efeitos da dieta rica em NaCl e aqueles observados pela dieta rica em KCl mostrou semelhança entre os resultados, sugerindo que os efeitos da piora da colite podem não ser exclusivos do NaCl.

Os efeitos observados pelas dietas ricas em NaCl e KCl podem ser oriundos da ativação da SGK1, quinase comum na sinalização por esses dois tipos de sais.

8 PERSPECTIVAS

8. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, no qual foi observada piora da colite por DSS com o tratamento com uma dieta rica em sal, NaCl e KCl, e sendo a hipótese de agravamento da doença a ativação da SGK1 e aumento da diferenciação de células Th17, alguns pontos devem ser melhor investigados para confirmação da hipótese.

Nos próximos experimentos, outras citocinas importantes no fenótipo de células Th17 e para a colite por DSS serão avaliadas, como IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-22 e TNF- α . É importante também a análise fenotípica das células imunes por citometria de fluxo para verificação de células produtoras das citocinas relevantes no fenótipo de células Th17.

Além disso, para esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos dos sais, verificaremos a expressão de SGK1 e WNK e receptores de IL-23 e IL-17A nas células da lamina própria do cólon dos animais tratados com os sais NaCl e KCl.

Para comprovar esse efeito via SGK1, utilizaremos, como controle do efeito dos sais NaCl e KCL, o sal MgCl₂ que não tem efeito na quinase SGK1.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

AGGARWAL, S. et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1910-1914, 2003.

APPEL, L. J. et al. The importance of population-wide sodium reduction as a means to prevent cardiovascular disease and stroke a call to action from the american heart association. **Circulation**, v. 123, n. 10, p. 1138-1143, 2011.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 411-420, 2008.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. **Annals of neurology**, v. 61, n. 6, p. 504-513, 2007.

ASSEMAN, C. et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 7, p. 995-1004, 1999.

AXELSSON, L.-G. et al. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4⁺-cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. **Inflammation Research**, v. 45, n. 4, p. 181-191, 1996.

AZUMA, Miyuki et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. **Nature**, v. 366, n. 6450, p. 76-79, 1993

BAILEY, R.; BOURNE, E. Intracellular glycosidases of dextran-producing bacteria. 1961.

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

BEMARK M, BOYSEN P, LYCKE NY. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways. *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1247, p. 97-116 Jan 2012.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 6, p. 652-657, 2007.

BORING, Landin et al. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in CC chemokine receptor 2 knockout mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 10, p. 2552, 1997.

BORING, Landin; CHARO, Israel F.; ROLLINS, Barrett J. MCP-1 in human disease. In: **Chemokines in Disease**. Humana Press, 1999. p. 53-65.

BRANDTZAEG, P. Immunopathology of Crohn's disease. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)*. 1985 Jul-Sep;21(4):202-20

_____. History of Oral Tolerance and Mucosal Immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 778, n. 1, p. 1-27, 1996.

_____. Mucosal immunity: from allergy to coeliac disease. In: (Ed.). **Allergy Frontiers: Classification and Pathomechanisms**: Springer, 2009. p.529-561. ISBN 4431883142.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scandinavian journal of immunology**, v. 70, n. 6, p. 505-515, 2009.

BRANDTZAEG, P. et al. **Microbial Host-interaction: Tolerance Versus Allergy**. Karger, 2009. ISBN 3805591675.

BRANDTZAEG, P. Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. **Immunological investigations**, v. 39, n. 4-5, p. 303-355, 2010.

BROWN, I. J. et al. Salt intakes around the world: implications for public health. **International journal of epidemiology**, v. 38, n. 3, p. 791-813, 2009.

BRUDER, D. et al. Frontline: Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. **European journal of immunology**, v. 34, n. 3, p. 623-630, 2004.

CHABAUD, M. et al. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 1, p. 409-414, 1998.

CHABAUD, M. et al. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. **Arthritis research**, v. 3, n. 3, p. 168-177, 2001.

CHEN, Y. et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17036-17043, 2003.

CHIBA, T. Cell kinetics of carcinoma originating from rat colitis induced by dextran sulphate sodium]. **Nihon Shokakibyō Gakkai zasshi= The Japanese journal of gastro-enterology**, v. 90, n. 4, p. 774, 1993.

CHO, J. H. Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 3, p. 338-47, Jan 21 2008.

CONTROL, C. F. D.; PREVENTION. Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 1996-2010. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 60, n. 22, p. 749, 2011.

COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β -and retinoic acid-dependent mechanism. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 8, p. 1757-1764, 2007.

COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 have a multi-faceted largely negative role in fungal infection. **European journal of immunology**, v. 37, n. 10, p. 2680-2682, 2007.

COOPER, H. S. et al. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 4, p. 757-768, 2000.

CROHN, B. B. **Notes on the Evolution of a Medical Specialist, 1907-1965**. Additional copies available from Burrill B. Crohn Research Foundation, c/o Division of Gastroenterology, Mount Sinai Medical Center, 1984.

CROXFORD, A. L.; MAIR, F.; BECHER, B. IL-23: One cytokine in control of autoimmunity. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 9, p. 2263-2273, 2012.

CUA, Daniel J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744-748, 2003.

CUROTTO DE LAFAILLE MA, KUTCHUKHIDZE N, SHEN S, DING Y, YEE H, LAFAILLE JJ. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. **Immunity**, v. 2, n. 1, p. 114-26, 2008.

CUTLER, J. A.; FOLLMANN, D.; ALLENDER, P. S. Randomized trials of sodium reduction: an overview. **The American journal of clinical nutrition**, v. 65, n. 2, p. 643S-651S, 1997.

DE L FREITAS, M.; FERNÁNDEZ, L. Evaluación del diferencial leucocitario realizado por el coulter stks y el coulter maxm. **Revista de Hematología Volumen**, v. 12, n. Suplemento 1, p. S66, 2011.

DIELEMAN, L. A. et al. Helicobacter hepaticus does not induce or potentiate colitis in interleukin-10-deficient mice. **Infection and immunity**, v. 68, n. 9, p. 5107-5113, 2000.

DIELEMAN, L. A. et al. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. **Gastroenterology-Orlando**, v. 107, n. 6, p. 1643-1652, 1994.

ELSON, C. O. et al. Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Seminars in immunology*, 2001. Elsevier. p.187-194.

FAGARASAN, Sidonia et al. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. **Nature**, v. 413, n. 6856, p. 639-643, 2001.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. Artmed, 2003. ISBN 8536320818.

FARIA AM, WEINER HL. Oral tolerance. **Immunol Rev**, V. 206, P. 232-59, 2005

FEAGAN, B. G. Maintenance therapy for inflammatory bowel disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 98, n. 12, p. S6-S17, 2003.

FISHER, S. A. et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. **Nature genetics**, v. 40, n. 6, p. 710-712, 2008.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Nature immunology**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

FOSSIEZ, F. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 6, p. 2593-2603, 1996.

FOSSIEZ, F. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J Exp Med**, v. 183, n. 6, p. 2593-603, Jun 1 1996.

FREEMAN, Gordon J. et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. **Science**, v. 262, n. 5135, p. 909-911, 1993a.

FREEMAN, G. J. et al. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. **The Journal of experimental medicine**, v. 178, n. 6, p. 2185-2192, 1993b.

FUJINO, S. et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 65-70, 2003.

FUKUMOTO, T. et al. Differences in composition of sweat induced by thermal exposure and by running exercise. **Clinical Cardiology**, v. 11, n. 10, p. 707-709, 1988.

FUSS, I. J. et al. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. 1, p. 9-15, 2006.

FUSS, I. J. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 10, p. 1490-1497, 2004.

GANDHI, R. et al. Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 9, p. 4620-4624, 2010.

GAUDIO, E. et al. Dextran Sulfate Sodium (DSS) Colitis in Rats (Clinical, Structural, and Ultrastructural Aspects). **Digestive diseases and sciences**, v. 44, n. 7, p. 1458-1475, 1999.

GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. **Nature**, v. 467, n. 7318, p. 967-71, Oct 21 2010.

GOMES-SANTOS, A. C. et al. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

HARRINGTON, Laurie E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1123-1132, 2005.

HATA, K. et al. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 282, n. 6, p. G1035-44, Jun 2002.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 3, 2004.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. How far should salt intake be reduced? **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1093-1099, 2003.

HELGELAND, L.; BRANDTZAEG, P. Development and function of intestinal B and T cells. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 12, n. Supplement 2, p. 110-127, 2000.

HENG, Tracy SP et al. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. **Nature immunology**, v. 9, n. 10, p. 1091-1094, 2008.

HOLBROOK, J. et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. **The American journal of clinical nutrition**, v. 40, n. 4, p. 786-793, 1984.

ICHIKAWA-TOMIKAWA, Naoki et al. Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. **BioMed Research International**, v. 2011, 2011.

INCE, M. N.; ELLIOTT, D. E. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. **Surgical Clinics of North America**, v. 87, n. 3, p. 681-696, 2007.

ITO, R. et al. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 330-338, 2006.

ITO, Reiko et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 377, n. 1, p. 12-16, 2008.

JOHANSSON, M. E. et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 39, p. 15064-15069, 2008.

JUMP, R. L.; LEVINE, A. D. Mechanisms of natural tolerance in the intestine. Implications for inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 10, n. 4, p. 462-478, 2004.

JUNGER, W. G. et al. Hypertonic saline enhances cellular immune function. **Circulatory shock**, v. 42, n. 4, p. 190-196, 1994.

KANG, O.-H. et al. Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. **International journal of molecular medicine**, v. 18, n. 5, p. 893-899, 2006.

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

KIM, Y. S. et al. Th17 responses are not induced in dextran sodium sulfate model of acute colitis. **Immune Netw**, v. 11, n. 6, p. 416-9, Dec 2011.

KITAJIMA, S.; TAKUMA, S.; MORIMOTO, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. **Experimental animals/Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 137, 1999.

_____. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. **Experimental Animals**, v. 49, n. 1, p. 9-15, 2000.

KLEINewIETFELD, M. et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. **Nature**, 2013.

KO, B. C. et al. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 26, p. 16431-16437, 1997.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.

KORN, T. et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in immunology*, 2007. Elsevier. p.362-371.

KULLBERG, M. C. et al. Helicobacter hepaticus triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12-and gamma interferon-dependent mechanism. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5157-5166, 1998.

KULLMANN, F. et al. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *International journal of colorectal disease*, v. 16, n. 4, p. 238-246, 2001.

KURIHARA, Takao et al. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *The Journal of experimental medicine*, v. 186, n. 10, p. 1757-1762, 1997.

LANGRISH, Claire L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 2, p. 233-240, 2005.

LEVINE, Bruce L. et al. CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. **International immunology**, v. 7, n. 6, p. 891-904, 1995.

LIANG, S. C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 10, p. 2271-2279, 2006.

LINSLEY, Peter S.; LEDBETTER, Jeffrey A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual review of immunology**, v. 11, n. 1, p. 191-212, 1993.

LOFTUS, C. G. et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940–2000. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 3, p. 254-261, 2007.

LOFTUS JR, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, n. 6, p. 1504-1517, 2004.

LUSTER, Andrew D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436-445, 1998.

LUZZA, F. et al. Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 9, p. 5332-5337, 2000.

MACDONALD, T. T. The mucosal immune system. **Parasite immunology**, v. 25, n. 5, p. 235-246, 2003.

MACHNIK, A. et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C–dependent buffering mechanism. **Nature medicine**, v. 15, n. 5, p. 545-552, 2009.

MÄHLER, M. et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 274, n. 3, p. G544-G551, 1998.

MARCUS, R.; WATT, J. Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals. **The Lancet**, v. 294, n. 7618, p. 489-490, 1969.

_____. Colonic ulceration in young rats fed degraded carrageenan. **The Lancet**, v. 298, n. 7727, p. 765-766, 1971.

MARON, R. et al. Genetic susceptibility or resistance to autoimmune encephalomyelitis in MHC congenic mice is associated with differential production of pro- and anti-inflammatory cytokines. **Int Immunol**, v. 11, n. 9, p. 1573-80, Sep 1999.

MCCAFFERTY, D.-M. et al. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 1, p. G90-G99, 2000.

MCCORMACK, J. M.; LEENEN, P. J.; WALKER, W. S., Macrophage progenitors from mouse bone marrow and spleen differ in their expression of the Ly-6C differentiation antigen. **J. Immunol.** 151: 6389–6398, 1993.

MCGUIRE, S. Institute of Medicine. 2010. Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States. Washington, DC: The National Academies Press. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 1, n. 1, p. 49-50, 2010.

MCLEOD, R. S. Surgery for inflammatory bowel diseases. **Digestive diseases**, v. 21, n. 2, p. 168-179, 2003.

MELGAR, S; KARLSSON, A; MICHAËLSSON, 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. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 6, p. G1328-G1338, 2005.

MELGAR, S. et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 6, p. 836-844, 2008.

MHURCHU, C. N. et al. Sodium content of processed foods in the United Kingdom: analysis of 44,000 foods purchased by 21,000 households. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 3, p. 594-600, 2011.

MONTELEONE, G. et al. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. **Current opinion in gastroenterology**, v. 22, n. 4, p. 361-364, 2006.

MORA JR, VON ANDRIAN UH. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. **Mucosal Immunol**, vol. 1, n. 2, p. 96-109 Jan 2008.

MORA, J. Rodrigo et al. Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. **Science**, v. 314, n. 5802, p. 1157-1160, 2006.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331-341, 2003.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256-260, 2007.

MURAI, M. et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nat Immunol**, v. 10, n. 11, p. 1178-84, Nov 2009.

NAGLER-ANDERSON, C. Man the barrier! strategic defences in the intestinal mucosa. **Nature reviews immunology**, v. 1, n. 1, p. 59-67, 2001.

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

NEURATH, M. F. et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1281-1290, 1995.

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

NIELSEN, O. et al. Upregulation of interleukin-12 and-17 in active inflammatory bowel disease. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 38, n. 2, p. 180-185, 2003.

NURIEVA, R. et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 480-483, 2007.

OGAWA, A. et al. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **Clinical immunology**, v. 110, n. 1, p. 55-62, 2004.

OHKUSA, T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. **Nihon Shokakibyo Gakkai zasshi= The Japanese journal of gastro-enterology**, v. 82, n. 5, p. 1327, 1985.

OIDA, T. et al. CD4+ CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+ CD45RBhigh-induced colitis by a TGF- β -dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2516-2522, 2003.

OKAYASU, I. et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.

ORGANIZATION, W. H. **Prevention of Cardiovascular Disease: Guidelines for Assessment and Management of Cardiovascular Risk. With CD-ROM.** World Health Organization, 2007. ISBN 9240687181.

PARK, Heon et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133-1141, 2005.

PERŠE, Martina; CERAR, Anton. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

PICARD, F. et al. Use of the new Coulter MAXM for leucocyte differentials. **Nouvelle revue française d'hématologie**, v. 34, n. 4, p. 309-314, 1991.

PLATTEN, M. et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1-and TH17-mediated autoimmunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 35, p. 14948-14953, 2009.

PORITZ, Lisa S. et al. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. **Journal of Surgical Research**, v. 140, n. 1, p. 12-19, 2007.

POWRIE, F. et al. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. **Int Immunol**, v. 5, n. 11, p. 1461-71, Nov 1993.

POWRIE, F. et al. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RB^{hi} CD4⁺ T cells. **Immunity**, v. 1, n. 7, p. 553-562, 1994.

QUILICI, F. et al. Guia práctico doença inflamatória intestinal. **Guia práctico doença inflamatória intestinal**, 2007.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

REZENDE RM1, OLIVEIRA RP, MEDEIROS SR, GOMES-SANTOS AC, ALVES AC, LOLI FG, GUIMARÃES MA, AMARAL SS, DA CUNHA AP, WEINER HL, AZEVEDO V, MIYOSHI A, FARIA AM. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells. **Journal of Autoimmun**, v. 40, p. 45-57, 2013.

ROSSI, Devora; ZLOTNIK, Albert. The biology of chemokines and their receptors. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 217-242, 2000.

ROSSIGNOL, M.; POUYSSÉGUR, J.; KLAGSBRUN, M. Characterization of the neuropilin-1 promoter; gene expression is mediated by the transcription factor Sp1. **Journal of cellular biochemistry**, v. 88, n. 4, p. 744-757, 2003.

RUSSEL, M. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? **European journal of internal medicine**, v. 11, n. 4, p. 191-196, 2000.

SALKER, Madhuri S. et al. Deregulation of the serum-and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1509-1513, 2011.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, 1995.

SANCHEZ-MUÑOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 27, p. 4280, 2008.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-594, 2008.

SAWKA, M. N.; MONTAIN, S. J. Fluid and electrolyte supplementation for exercise heat stress. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 564s-572s, 2000.

SHAPIRO, L.; DINARELLO, C. A. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 26, p. 12230-12234, 1995.

SHELLY, Candace; HERRERA, Roman. Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and integrin-mediated cell adhesion in MDCK cells: PI-3K-dependent and-independent pathways. **Journal of cell science**, v. 115, n. 9, p. 1985-1993, 2002.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. **Annual review of medicine**, v. 60, p. 261-277, 2009.

SKEEN, M. J. et al. Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 3, p. 1196-1206, 1996.

SOLOMON, L. et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 3, p. 235-239, 2010.

SQUARCIA, O. et al. Phenotypes and spontaneous immunoglobulin production in mononuclear cells suspensions isolated from colonic biopsies of patients with mild active and quiescent ulcerative colitis. **Gastroentérologie clinique et biologique**, v. 15, n. 3, p. 194-198, 1991.

STEGBAUER, J. et al. Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 35, p. 14942-14947, 2009.

STRAZZULLO, P. et al. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. **BMJ: British Medical Journal**, v. 339, 2009.

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

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The Immunology of Mucosal Models of Inflammation 1. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 495-549, 2002.

STROCCHI, A. et al. Measurements of the jejunal unstirred layer in normal subjects and patients with celiac disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 270, n. 3, p. G487-G491, 1996.

STRUGNELL, Richard A.; WIJBURG, Odilia LC. The role of secretory antibodies in infection immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 656-667, 2010.

SUTHERLAND, Duncan B.; FAGARASAN, Sidonia. IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 3, p. 261-268, 2012.

TAKAYA, H. et al. Interleukin-17 stimulates chemokine (interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1) secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 37, n. 2, p. 239-245, 2002.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799-809, 2009.

VAN KOOTEN, C. et al. Interleukin-17 activates human renal epithelial cells in vitro and is expressed during renal allograft rejection. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 8, p. 1526-1534, 1998.

VELDHOEN, Marc et al. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179-189, 2006.

VERMA, Nirmal et al. Effect of salicin on gut inflammation and on selected groups of gut microbiota in dextran sodium sulfate induced mouse model of colitis. **Inflammation Research**, v. 63, n. 2, p. 161-169, 2014.

WATT, J.; MARCUS, R. Ulcerative colitis in the guinea-pig caused by seaweed extract. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 21, n. S1, p. 187S-188S, 1969.

WEBSTER, J. L.; DUNFORD, E. K.; NEAL, B. C. A systematic survey of the sodium contents of processed foods. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 2, p. 413-420, 2010.

WEINER HL, CUNHA AP, QUINTANA F, WU H. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 241, n.1, p. 241-59, 2011.

WHO, J.; CONSULTATION, F. E. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **WHO technical report series**, v. 916, 2003.

Wilhelm Fabry (1560-1624)--the Other Fabricius. **JAMA**, v. 190, p. 933, Dec 7 1964.

WILKS, S. Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. **London Medical Times & Gazette**, v. 2, p. 264, 1859.

WONG, C. K. et al. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 9, n. 8, p. 589-593, 2000.

WU, C. et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 513-7, Apr 25 2013.

WULFF, Peer et al. Impaired renal Na⁺ retention in the sgk1-knockout mouse. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1263-1268, 2002.

YAMADA, M.; OHKUSA, T.; OKAYASU, I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. **Gut**, v. 33, n. 11, p. 1521-1527, 1992.

YAN, Yutao et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e6073, 2009.

YAO, Z. et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 12, p. 5483-5486, 1995.

YEN, D. et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1310-1316, 2006.

ZHANG, Liping et al. Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I κ B kinase. **Cancer research**, v. 65, n. 2, p. 457-464, 2005.

ZHANG, Z. et al. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, n. 5, p. 382-8, May 2006.

ZHANG YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 1, p. 91-99, Jan 2014

ZHOU, L. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 967-74, Sep 2007.

Anexo 1. Protocolo de submissão à Comissão de Ética no uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) tatiani uceli maioli,

Esta é uma mensagem automática de notificação de recebimento do seu projeto intitulado "Efeitos imunológicos da dieta rica em sal na colite experimental em camundongos" sob o número de protocolo 50 / 2014 para ser avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) dentro do prazo ESTIMADO de 15 dias.

O(a) senhor(a) receberá neste e-mail a decisão do seu processo e também poderá, a qualquer momento, entrar em nosso sistema e analisar o status do seu protocolo.

Belo Horizonte, 20/02/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br