

Ana Leticia Malheiros Silveira

Avaliação do efeito terapêutico da dieta rica em fibra na colite experimental induzida
por sulfato de sódio dextrana

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte - MG
Fevereiro, 2013

Ana Leticia Malheiros Silveira

Avaliação do efeito terapêutico da dieta rica em fibra na colite experimental induzida
por sulfato de sódio dextrana

Dissertação apresentada ao departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientadora: Prof. Dra. Angelica Thomaz Vieira

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte - MG

Fevereiro, 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família principalmente à tia Su, minha mãe Dôra, Nego e a Gustavo. Ao meu namorado Frê, que me ajudou de diversas formas no desenvolvimento do meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao meu orientador, professor Mauro Martins Teixeira, por me aceitar como sua aluna de mestrado e acreditar que eu seria capaz de executar projeto em seu laboratório, apesar da minha inexperiência na área;

Aos amigos de Bases, que estiveram comigo nos momentos mais árduos da vida acadêmica;

Agradeço a todos do laboratório de Imunofarmacologia, que me ajudaram no início, auxiliando sobre as técnicas e funcionamento dos equipamentos e rotina laboratorial, em especial à Bárbara, Camila, Lívia, Luciana, que me introduziram no laboratório e tornaram o início laboratorial mais fácil e, também, à Juliana, com quem sempre puder contar e compartilhar alguns momentos importantes;

À Dra. Angelica, que me ensinou os primeiros passos necessários à execução do meu projeto e que ajudou com seus conselhos no desenvolvimento do mesmo;

À professora Adaliene, que sempre esteve presente, e às suas alunas que sempre contribuíram comigo nos experimentos: Débora, Jaque, Laís, além da Marina que foi mais que companheira de experimentos, foi uma amiga que sempre me ajudou quando podia e quando não podia;

Ao professor Flávio Amaral, que, sempre muito atento, esteve presente e disponível a ajudar, quando possível;

À professora Milene Rachid, que auxiliou nas análises histopatológicas;

À professora Lucíola, por disponibilizar equipamentos necessários para o desenvolvimento dos resultados;

Ao professor Flaviano Martins, que sempre esteve acessível a ajudar durante a elaboração dos experimentos e por ter me ensinando algumas técnicas fundamentais. Além de ter disponibilizado alguns dos seus alunos para a realização dos experimentos;

À Larissa, que foi uma amiga que fiz ao entrar no laboratório e que quero sempre ter por perto, por sua amizade e alegria;

Ao Bráulio, que me ajudou muito nos momentos de apertos e dificuldades;

À Cristiana, que me auxiliou tantas vezes a entender protocolos, fazer cálculos e análises estatísticas, além de ser exemplo de pesquisadora;

À Ilma e Frank, que me ajudaram fornecendo todo o suporte técnico necessário;

Ao Elisão, Nat, Aline, Norinne pelos momentos de conversa e à Flávia, não apenas pelas conversas, mas também pelas contribuições nos experimentos;

Às minhas amigas de graduação: Adna, Ana Alice, Ísis, Juliana, Luiza, Marcella, Nathália Beltrão, Nathália Luíza, Sarah, Stephanie, Thaís pelo companheirismo e amizade;

Às novas companheiras de laboratório: Izabela e Daiane, que tornaram mais fácil a vida nos experimentos finais;

Às demais pessoas e professores que fazem parte do grupo de Imunofarmacologia que sempre estão disponíveis a ajudar quando necessário;

E agradeço, principalmente, às minhas amigas de colégio e de vida, que, apesar da minha ausência, sei que sempre estarão presentes: Ana Paula, Dani, Mariana e Marina;

Finalmente, agradeço ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG pela oportunidade de realizar esta Dissertação de Mestrado e a todo o corpo docente pelos conhecimentos fundamentais que foram transmitidos.

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (*Inflammatory Bowel Disease* - IBD), dentre elas a doença de Crohn e a Colite Ulcerativa, possuem importante impacto na saúde mundial e a incidência tem aumentado por todo o mundo. Acredita-se que o desequilíbrio da microbiota intestinal seja fator contribuinte para o desenvolvimento das IBDs, em indivíduos susceptíveis, e o consumo de prebióticos poderia atuar na modulação das comunidades bacterianas e melhora da resposta inflamatória intestinal. A pectina, fibra alimentar solúvel, devido a sua capacidade de fermentação no intestino, apresenta potencial efeito como prebiótico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da dieta rica em pectina, como pré-tratamento e tratamento, na colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrana (*dextran sulfate sodium* - DSS). Camundongos BALB/c, com colite aguda, submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra apresentaram redução dos sinais clínicos da doença (escore clínico e perda de peso), manutenção do comprimento colônico, redução do recrutamento de neutrófilos e da lesão epitelial da mucosa colônica, quando comparado ao grupo alimentado com dieta padrão. Essa melhora refletiu na sobrevivência e os animais pré-tratados com dieta rica em pectina apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto animais alimentados com dieta padrão apenas 40%, após a administração de DSS (4%). O pré-tratamento com dieta rica em pectina apresentou efeitos semelhantes ao pré-tratamento com acetato (ácido graxo de cadeia curta com conhecida propriedade anti-inflamatória) nos parâmetros clínicos e histopatológicos da colite aguda. Em modelo de colite crônica induzida por DSS (3%), animais pré-tratados com dieta rica em pectina apresentaram melhora clínica, manutenção do comprimento colônico, redução da peroxidase eosinofílica (EPO) e aumento da concentração das citocinas interleucina (IL)-6 e IL-10, no cólon. Já o tratamento com a dieta rica em fibra, iniciada após o estabelecimento da colite (terceiro, quarto ou quinto ciclo de DSS), resultou apenas na redução da EPO e em menor peso colônico, em relação aos animais com colite e dieta convencional, enquanto os outros parâmetros clínicos e inflamatórios, da colite, permaneceram inalterados. Em conclusão, o tratamento com dieta rica em fibra exerceu efeito protetor na colite induzida por DSS e foi similar ao efeito do acetato, sugerindo papel na geração dessa molécula como efeito benéfico da dieta rica em fibra. Como no pré-tratamento foram observados resultados mais efetivos, o uso da dieta rica em fibra, assim como outras

estratégias que visam modificar o ambiente intestinal (outros prebióticos ou probióticos) deveriam ser utilizadas no início da evolução da doença.

Palavras chaves: doença inflamatória intestinal, colite, prebiótico, fibra alimentar, pectina.

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Diseases, including Crohn's disease and Ulcerative Colitis, have an important impact on global health and their incidence has increased considerably around the world. It is believed that an imbalance of gut microbiota is associated with the development of IBD in susceptible individuals. Consumption of prebiotics could be an alternative to modulate intestinal bacterial communities which could lead to amelioration of inflammatory responses in the gut. Pectin is a dietary soluble fiber which is fermented at the colon and has prebiotic properties. The aim of this study was to evaluate the effect of a pectin-rich diet, used as a pre-treatment and as therapy in murine models of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). In BALB/c with acute colitis, the pre-treatment with high fiber diet substantially improved the clinical signs of disease (clinical score and weight loss), colon length, reduced neutrophil recruitment and mucosal epithelial lesion, when compared to mice fed with conventional chow. This improvement was reflected in survival. Mice pre-treated with high pectin diet presented 100% of survival, while animals fed with chow diet had only 40% survival after DSS (4%) treatment. The high pectin diet had similar effect on clinical and histopathological parameters to pre-treatment with acetate (a short chain fatty acid with anti-inflammatory property) in acute colitis. In a chronic model of colitis induced by DSS (3%), animals pre-treated with the high pectin diet improved clinically and maintained colon length, reduced eosinophil peroxidase activity (EPO) and had greater levels of interleukin (IL)-6 and IL-10 in the colon. When treatment with high fiber diet was started after disease was established (at cycles 3, 4 or 5 of DSS), there was only a partial effect on EPO and colon weight compared to animals fed with chow diet. Other clinical and laboratory parameters were unaltered. In conclusion, treatment with high fiber diet had major effects on the outcome of colitis induced by DSS. Protective effects are mimicked by short fatty acids, suggesting a role for the generation of these molecules in the beneficial effects of the high fiber diet. However, beneficial effects are mostly seen when diet is given as a pre-treatment, suggesting that therapy aimed at modifying the gut environment (e.g. prebiotic and probiotic strategies) should be given early in the course of disease.

Key word: inflammatory bowel disease, colitis, prebiotic, dietary fiber, pectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O corpo humano e o número de bactérias em diferentes regiões.....	19
Figura 2. Dieta, composição da microbiota e a regulação do sistema imune.....	21
Figura 3. Sugestão do mecanismo da patogênese da doença inflamatória intestinal.	22
Figura 4. Diagrama simplificado da metabolização de polissacarídeos e principais rotas de fermentação de carboidratos no intestino grosso.....	27
Figura 5. Delineamento experimental I.	36
Figura 6. Delineamento experimental II.....	38
Figura 7. Avaliação dos sinais clínicos em animais submetidos a diferentes períodos de pré-tratamento com DF na colite aguda.	44
Figura 8. Comprimento do cólon e atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) em amostras colônicas.....	46
Figura 9. Avaliação de cortes histológicos de cólon na colite aguda induzida por DSS.	48
Figura 10. Curva de sobrevivência de animais com colite aguda.	49
Figura 11. Avaliação de quimiocinas presente em amostras de cólon de animais com colite aguda induzida por DSS.	50
Figura 12. Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias presentes na colite aguda induzida por DSS.....	51
Figura 13. Acompanhamento dos sinais clínicos em animais, com colite aguda, submetidos a diferentes pré-tratamentos.	53
Figura 14. Corte histológico do cólon de animais com colite aguda induzida por DSS e em comparação a animais submetidos a diferentes intervenções terapêuticas.....	55
Figura 15. Acompanhamento do peso relativo de animais com colite crônica, induzida por DSS, e submetidos a diferentes intervenções terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra.....	57
Figura 16. Acompanhamento da avaliação do escore clínico na colite crônica em animais submetidos a cinco ciclos de DSS e diferentes intervenções terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra.....	59
Figura 17. Avaliação do comprimento e peso do cólon, em animais com colite crônica, submetidos a cinco ciclos de DSS e diferentes intervenções terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra.....	60

Figura 18. Avaliação das atividades das enzimas MPO e EPO no cólon de animais submetidos à colite crônica induzida por DSS e diferentes estratégias terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra.....	61
Figura 19. Efeito do pré-tratamento e tratamento com dieta rica em fibra nas concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 em amostras de cólon de animais com colite crônica.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo do efeito da ingestão de prebióticos na alimentação	28
Tabela 2. Ingredientes da dieta AIN93M* – uso em animais com idade superior a seis semanas.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

10DF: 10 dias de fornecimento de dieta rica em pectina anterior à indução de colite
20DF: 20 dias de fornecimento de dieta rica em pectina anterior à indução de colite
40DF: 40 dias de fornecimento de dieta rica em pectina anterior à indução de colite
AnxA1: anexina A1
APC: células apresentadoras de antígenos
AUC: *area under curve* – área sob a curva
BSA: *bovine serum albumin* – albumina bovina
CCL-11: quimiocina eotaxina
CD: *Crohn's disease* - doença de Crohn
CEBIO: centro de bioterismo
DF: dieta rica em pectina (fibra solúvel)
DSS: *dextran sulfate sodium* - sulfato de sódio dextrana
EDTA: *EthyleneDiamineTetrAcetic acid* - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* - ensaio imunoenzimático
EPM: erro padrão da média
EPO: peroxidase eosinofílica
FAO: Food and Agricultural Organization
GPR43: receptor acoplado à proteína G 43
H&E: hematoxilina e eosina
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
H₂SO₄: ácido sulfúrico
HTAB: *Hexadecyl trimethyl ammonium bromide*
IBD: *inflammatory bowel disease* - doença inflamatória intestinal
IFN- γ : interferon- γ
sIgA: imunoglobulina A secretória
IL: interleucina
KO: *knockout*
LPS: lipopolissacarídeo
LXA4: lipoxina A4
MPO: mieloperoxidase
NaCl: cloreto de sódio

NAG: N-acetilglicosaminidase
NaPO₄: fosfato de sódio
NFκB: *factor nuclear kappa B* – fator nuclear kappa B
OD: densidade óptica
OPD: o-fenilenodiamina
PBS: *phosphate-buffered saline* – tampão fosfato de sódio
pH: potencial Hidrogeniônico
PMN: *polimorfonuclear* – polimorfonuclear
Pré-DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra
PSA: polissacarídeo A
rpm: rotações por minuto
SCFA: *short chain fatty acid* - ácido graxo de cadeia curta
TGF-β: fator de crescimento transformante –β
TGI: trato-gastrointestinal
Th: Thelper
Th1: linfócitos T helper tipo 1
TH2: linfócitos T helper tipo 2
TLR: *Toll-like receptors* - receptor do tipo *Toll*
TNBS: *trinitrobenzene sulfonic acid* - ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF: fator de necrose tumoral
Treg: células T regulatórias
UC: *ulcerative colitis* - colite ulcerativa
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Doença inflamatória intestinal	15
1.2 Modelos experimentais	16
1.3 Fisiopatologia da doença inflamatória intestinal	18
1.3.1 Resposta inflamatória da doença inflamatória intestinal.....	18
1.3.2 Microbiota e sua relação com a doença inflamatória intestinal	19
1.4 Modulação da microbiota intestinal.....	23
1.5 Prebióticos	25
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Animais	33
4.2 Colite ulcerativa experimental	33
4.2.1 Modelo experimental agudo.....	33
4.2.2 Modelo experimental crônico.....	34
4.3 Dietas fornecidas aos animais	34
4.4 Delineamento experimental I.....	36
4.5 Delineamento experimental II	37
4.6 Pré-tratamento com acetato	38
4.7 Determinação dos sinais clínicos	39
4.8 Avaliação da perda de peso	39
4.9 Quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da mieloperoxidase - MPO.....	40
4.10 Quantificação da infiltração de eosinófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da peroxidase eosinofílica - EPO	41
4.11 Determinação das concentrações de citocinas/quimiocinas - ensaio imunoenzimático - ELISA	41
4.12 Análises histopatológicas.....	42
4.13 Análise estatística	43

5. RESULTADOS	44
5.1 RESULTADOS PARTE I – COLITE AGUDA	44
5.1.1 Avaliação do pré-tratamento com dieta rica em fibra, em diferentes períodos, na indução de colite.....	44
5.1.3 Efeito da dieta rica em fibra na produção de citocinas e quimiocinas em animais com colite aguda	50
5.1.4 Efeito da dieta rica em fibra em comparação ao pré-tratamento com acetato	52
5.2 RESULTADOS PARTE II – COLITE CRÔNICA.....	56
5.2.1 Efeito da dieta rica em fibra em modelo experimental de colite crônica	56
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO.....	72
APÊNDICE A – Padronização de modelo experimental de colite crônica quanto à resposta inflamatória intestinal.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença inflamatória intestinal

As doenças inflamatórias intestinais (*Inflammatory Bowel Disease* - IBD) apresentam maior incidência em países desenvolvidos (Perse e Cerar, 2012) e, a partir da metade do século XX, tem-se observado crescente aumento em sua ocorrência também em países em desenvolvimento (Molodecky *et al.*, 2012), dentre eles, o Brasil (Brasil, 2010).

As IBDs são doenças complexas, de origem multifatorial (Strober *et al.*, 2002; Sartor, 2006; Vieira *et al.*, 2009; Perse e Cerar, 2012), que geralmente se desenvolvem na segunda ou terceira década de vida e afeta igualmente homens e mulheres (Brasil, 2002; Xavier e Podolsky, 2007). As suas representantes crônicas nos seres humanos são: colite ulcerativa (*Ulcerative Colitis* - UC) e doença de Crohn (*Crohn's Disease* - CD) (Strober *et al.*, 2002; Perse e Cerar, 2012). A UC acomete principalmente a região do cólon e é caracterizada por inflamação da mucosa, com presença de úlceras, perda das criptas e intenso infiltrado inflamatório (Bischoff *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Strober *et al.*, 2002; Lampinen *et al.*, 2008). Os pacientes acometidos por essa doença apresentam perda de peso, diarreia com sangue e/ou muco, febre, dor abdominal e encurtamento do cólon (Strober *et al.*, 2002; Perse e Cerar, 2012). A CD pode acometer qualquer porção do trato gastrointestinal (TGI), apresenta inflamação transmural e de forma segmentar. O envolvimento colônico é comum em 70% dos pacientes e as complicações perianais (fístula e abscessos) são relatadas em um terço dos casos documentados. A inflamação transmural da CD sempre desencadeia abscessos e fibrose e, posteriormente, podem originar estenoses. A presença desse quadro é preditor de desfecho clínico desfavorável, com difícil tratamento (Xavier e Podolsky, 2007; Fields *et al.*, 2008; Louis, 2012).

Diversos fatores podem contribuir para o desencadeamento das IBD, entre eles: defeitos na imunorregulação, alterações na microbiota (Asseman *et al.*, 1999; Mottet *et al.*, 2003; Mannon *et al.*, 2006; Sartor, 2006; Feng *et al.*, 2010; Maslowski e Mackay, 2011) e na permeabilidade intestinal, fatores genéticos e outros fatores ambientais (Halfvarson *et al.*, 2003; Sartor, 2006; Xavier e Podolsky, 2007). Acredita-se que esses componentes se sobrepõem, culminando em quebra da tolerância intestinal aos

microrganismos presentes na microbiota intestinal (Duchmann *et al.*, 1995) em indivíduos geneticamente susceptíveis (Hart *et al.*, 2005).

Como vários fatores podem desencadear as IBDs, pacientes portadores dessas doenças são grande desafio na clínica, principalmente devido à complexidade de tratamento e por serem doenças crônicas, com presença de períodos de remissão e recidiva (Benson *et al.*, 2008; De Cassan *et al.*, 2012; Perse e Cerar, 2012). Por esse motivo, IBD é importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de cólon, com aumento na incidência desse câncer em pacientes com a doença ativa por mais de 30 anos, em torno de 18-20% e 8% em pacientes com UC e CD, respectivamente (Grivennikov, 2012).

A IBD está associada a considerável redução na qualidade de vida dos pacientes e os tratamentos atuais ainda não oferecem a cura e não previnem as complicações relacionadas à doença. Apesar de avanços nos tratamentos, muitos pacientes ainda são submetidos a procedimento cirúrgico. Por esse motivo, ainda é necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas e medicamentos que sejam mais seguros e bem tolerados, além de serem capazes de aumentar o período de remissão da doença ou mesmo curá-la (Benson *et al.*, 2008; Van Der Marel *et al.*, 2011; De Cassan *et al.*, 2012; Perse e Cerar, 2012).

1.2 Modelos experimentais

Devido à complexidade da fisiopatologia das IBDs, os modelos experimentais em animais utilizados para o estudo dessas doenças não representam de forma exata as suas características, mas são ferramentas úteis e válidas que permitem a investigação de fatores relacionados à patologia e também o estudo de novas estratégias terapêuticas (Perse e Cerar, 2012).

Os modelos experimentais utilizados podem ser classificados principalmente em: modelo de colite espontâneo, colite induzida, animais geneticamente modificados, e modelo de transferência adotiva (Okayasu *et al.*, 1990; Elson *et al.*, 1995; Asseman *et al.*, 1999; Perse e Cerar, 2012). Dentre esses, um dos mais utilizados é o de colite induzida por administração de substâncias químicas, que são tóxicas às células colônicas, geram resposta inflamatória intensa, com recrutamento de células

inflamatórias, mimetizando algumas das características observadas na doença humana (Perse e Cerar, 2012).

A colite quimicamente induzida é modelo simples de ser conduzido, cujo início da doença, duração e gravidade da mesma podem ser manipulados. O uso de sulfato de sódio dextrana (*dextran sulfate sodium* – DSS) ou ácido trinitrobenzeno sulfônico (*trinitrobenzene sulfonic acid* – TNBS) têm sido utilizados por mais de duas décadas para o estudo da patogênese da colite, bem como em estudos pré-clínicos (Perse e Cerar, 2012).

O uso do DSS possui algumas vantagens, uma vez que podem ser conduzidos experimentos de modelo de colite aguda ou crônica, apenas alterando as concentrações da substância administrada, bem como o número de ciclos de fornecimento do agente químico (Okayasu *et al.*, 1990). O DSS é polissacarídeo sulfatado resistente à degradação pela microbiota ou condições de pH (potencial Hidrogeniônico) diferentes e também é resistente à incubação anaeróbica (Perse e Cerar, 2012).

A resposta inflamatória desencadeada pela administração de DSS pode ser influenciada por fatores como: concentração fornecida, peso molecular, duração da administração, lote, bem como linhagem de animais utilizados, gênero e microbiota intestinal (Mahler *et al.*, 1998; Perse e Cerar, 2012). Camundongos da linhagem C57BL/6 apresentam maior susceptibilidade ao DSS em relação aos animais da linhagem BALB/c e desenvolvem colite crônica por meio de administração de apenas um ciclo de DSS, enquanto que camundongos BALB/c se recuperam da inflamação desencadeada pela administração do agente químico (Melgar *et al.*, 2005). É observada atrofia no timo dos animais C57BL/6 submetidos ao tratamento com DSS o que poderia contribuir ou ser um resultado da resposta inflamatória mais exacerbada nesses animais (Sasaki *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas observadas nos animais submetidos ao tratamento com DSS são perda de peso, diarreia, presença de sangue oculto nas fezes, piloereção, anemia e, eventualmente, morte (Perse e Cerar, 2012). Além disso, pode ser identificada displasia no cólon dos animais com DSS, na fase crônica da doença, semelhante observado em humanos (Perse e Cerar, 2012).

1.3 Fisiopatologia da doença inflamatória intestinal

1.3.1 Resposta inflamatória da doença inflamatória intestinal

O cólon de pacientes com IBD é caracterizado por intenso infiltrado inflamatório, que é composto predominantemente por neutrófilos, linfócitos, eosinófilos (Bischoff *et al.*, 1996; Lampinen *et al.*, 2005; Williams e Parkos, 2007; Lampinen *et al.*, 2008; Strober e Fuss, 2011). Na colite o grande influxo de neutrófilos tem sido associado à formação de abscessos nas criptas, lesão histológica característica da transmigração dessas células ativadas através do espaço paracelular, separando os enterócitos e rompendo as *tight junctions*, com posterior acúmulo dessas células imunes no lúmen das criptas. Os neutrófilos ao serem ativados liberam o conteúdo presente em seus grânulos (enzimas proteolíticas) em associação com a produção de espécies reativas de oxigênio no sítio inflamatório favorecendo o dano tissular. Por este motivo, os neutrófilos têm sido associados como as principais células efetoras, que promovem lesão e perda da função do cólon (Williams e Parkos, 2007). Estudo realizado por Vieira *et al.* (2009), utilizando modelo experimental de colite induzida por DSS, identificou que, além dos neutrófilos, os eosinófilos também apresentaram papel crucial na patogênese dessa doença, uma vez que a ausência dessas células reduziu a resposta inflamatória observada nos animais.

Além do aumento do recrutamento de células imunes, alterações relacionadas ao reconhecimento de antígenos na mucosa, por meio das células dendríticas, podem contribuir para o desencadeamento da resposta inflamatória (Hart *et al.*, 2005). As células dendríticas são as iniciantes da resposta imune inata e adaptativa, presente em pequeno número em todos os tecidos e, inclusive, no intestino. Nesse órgão, as células dendríticas estão presentes dentro da placa de Peyer e também distribuídas em toda lâmina própria. São capazes de produzir extensões para dentro do lúmen para o reconhecimento de antígenos e são as principais células responsáveis pela polarização das células T (Rescigno *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2010). Nas IBDs, as células dendríticas estão mais ativas e apresentam maior expressão de receptor do tipo *Toll* (*Toll-like receptors* - TLRs) TLR2 e TLR4, fundamentais para o reconhecimento de antígenos estruturais presentes na superfície dos microrganismos (Hart *et al.*, 2005).

Outro fator contribuinte para o desenvolvimento das IBD é o desequilíbrio no perfil de citocinas em direção a maior produção das pró-inflamatórias, uma vez que o equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias na mucosa colônica é essencial para a homeostase intestinal (Sartor, 2006; Muzes *et al.*, 2012). A CD é geralmente descrita como protótipo de *Thelper* (Th)-1, uma vez que os mediadores inflamatórios iniciais são citocinas Th1 como interleucina (IL)-12, interferon γ (IFN γ) e o fator de necrose tumoral α (TNF α). Já a UC está associada à resposta semelhante ao tipo Th-2, devido à expansão de células T *natural killer*, aumento da produção de citocinas como IL-5 e IL-13. No entanto, sem aumento na produção de IL-4, que seria a citocina primordial para essa condição. A iniciação e progressão dessa doença seriam exercidas pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, -6, -8, -12, -17, -23, IFN, TNF. Em contrapartida, citocinas com efeitos anti-inflamatórios como IL-4, IL-10, e em parte IL-13 participariam do processo amenizando a resposta inflamatória, por meio do *down-regulating* na produção das citocinas pró-inflamatórias (Fuss *et al.*, 1996; Strober e Fuss, 2011; Muzes *et al.*, 2012).

1.3.2 Microbiota e sua relação com a doença inflamatória intestinal

Inúmeros microrganismos convivem de forma comensal com os seres humanos, habitando todas as superfícies do corpo exposto ao ambiente (Figura 1). O trato gastrointestinal (TGI) é colonizado por 10^{14} microrganismos, de aproximadamente 1000 espécies diferentes (Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski *et al.*, 2009; Vyas e Ranganathan, 2012). Mais de 90% de todos os tipos filogenéticos das bactérias colônicas pertencem a dois dos 70 filos no domínio das bactérias: *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Turnbaugh *et al.*, 2007).

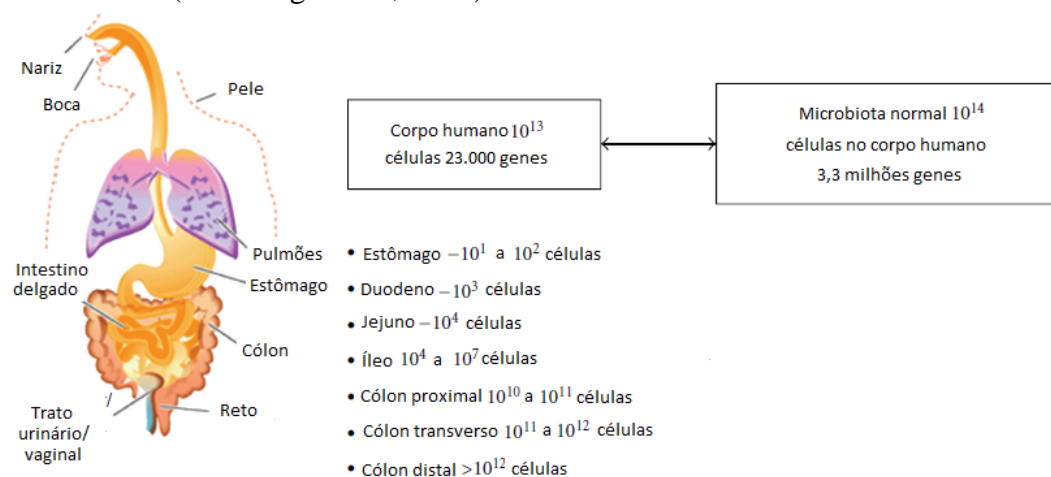


Figura 1. O corpo humano e o número de bactérias em diferentes regiões. Adaptado de Vyas e Ranganathan (2012). 19

A colonização do TGI por microrganismos inicia-se desde o nascimento e é modificada posteriormente por fatores como dieta, uso de antibióticos, fatores genéticos e outros fatores ambientais (Maslowski e Mackay, 2011; Ayres *et al.*, 2012). A composição da microbiota intestinal é de extrema importância para a saúde geral do indivíduo, pois tanto a resposta imune local quanto a sistêmica apresentam-se comprometidas em sua ausência, como nos animais *germ-free*, ou no desequilíbrio das populações dos microrganismos desse habitat (Bauer *et al.*, 1963; Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski *et al.*, 2009). Animais *germ-free* ao serem submetidos à colite induzida por DSS demonstram reposta inflamatória mais exacerbada em relação a animais submetidos à recolonização da microbiota anterior à indução da doença. O que sugere que a presença da microbiota seja importante para adequada resposta inflamatória (Maslowski *et al.*, 2009).

Acredita-se que a alteração na microbiota, denominada disbiose, desequilíbrio entre microrganismos simbiotes e patobiontes (potencialmente patogênicos), seja um dos fatores contribuintes para o desencadeamento das IBDs e sua consequente piora (Sartor, 2006; Mazmanian *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2010; Maslowski e Mackay, 2011). Estudo realizado por Frank *et al.* (2007) em biópsias de pacientes com UC e CD mostrou redução na população de microrganismos do filo dos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e aumento de *Proteobacteria* e *Actinobacteria* quando comparado aos controles sem IBD. Além disso, não se pode eliminar a hipótese de que algumas variedades de microrganismo poderiam atuar como agentes etiológicos das IBDs entre eles micobactéria, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia*, *Enterobacteriaceae* (incluindo cepas de *Escherichia coli* e *Helicobacter*) reovírus e paramixovírus (Gionchetti *et al.*, 2006; Fava e Danese, 2011).

Aparentemente a resposta inflamatória nas IBDs está direcionada às subespécies de microrganismos que são potencialmente patogênicas, mas que não são agentes tipicamente infecciosos bacterianas estão equilibradas. E, por esse motivo, acredita-se que a inflamação resultante da disbiose poderia ser a base molecular para muitas doenças, tanto intestinais quanto extraintestinais (Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski e Mackay, 2011; Ayres *et al.*, 2012). Ainda não se tem o conhecimento do agente que desencadearia a resposta inflamatória, mas acredita-se que, em conjunto com a predisposição genética, o desequilíbrio entre as populações de microrganismos poderia

ser parcialmente responsável pelas IBDs (Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski e Mackay, 2011) (Figura 2).

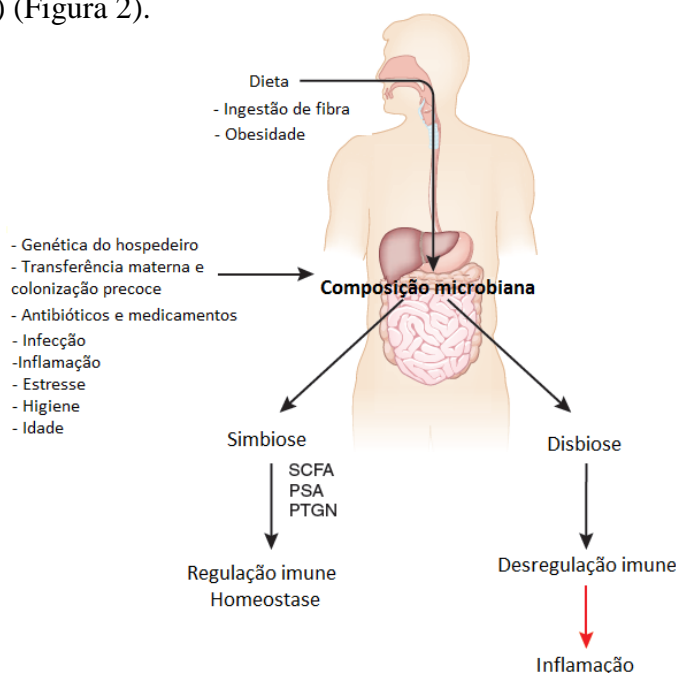


Figura 2. Dieta, composição da microbiota e a regulação do sistema imune. Dieta, fatores ambientais e do hospedeiro são os principais influenciadores na composição da microbiota intestinal. Um balanço entre as populações de microrganismos resulta-se em simbiose; que gera adequada regulação do sistema imune e da resposta inflamatória por meio de produtos anti-inflamatórios e/ou imunomodulatórios (*short chain fatty acid* - SCFA, polissacarídeo A - PSA, e peptidoglicanos), mantendo a homeostase. A disbiose levaria a desregulação do sistema imune, devido à falta de produtos microbianos benéficos, podendo aumentar a susceptibilidade do hospedeiro à inflamação. A disbiose pode ocorrer pelo consumo de dieta do tipo Ocidental, bem como por alterações induzidas por fatores genéticos, transferência materna e uso de antibióticos. Adaptado de Maslowski e Mackay (2011).

Hipóteses sugerem que o desequilíbrio microbiano causaria redução dos níveis luminiais de butirato ou outro SCFA (devido à redução na produção por meio da fermentação e redução na utilização), o que contribuiria para o *down-regulation* das proteínas epiteliais *tight junction* e aumento da permeabilidade epitelial (Chapman *et al.*, 1994; Hering *et al.*, 2012). A disfunção epitelial causaria aumento da translocação bacteriana para a lâmina própria, onde antígenos microbianos provocariam intensa resposta inflamatória à estimulação ectópica (basolateral) dos TRLs, ativação da via do NFκB e consequente secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esse processo inflamatório seria potencializado pela redução na defesa imune inata com redução luminal de defensinas e imunoglobulina A secretória (sIgA), além de defeito no

mecanismo de fagocitose pelos macrófagos. No muco a sIgA atua como uma barreira à antígenos e toxinas, além de favorecer o *clearance* dos antígenos por meio das células dendríticas, neutrófilos e fagócitos; essa imunoglobulina exerce papel também na regulação da colonização microbiana intestinal e acredita-se ser o anticorpo responsável pela mediação da tolerância imunológica existente no intestino contra microrganismos e antígenos alimentares (Peterson *et al.*, 2007; Sartor, 2008; Fava e Danese, 2011). Com o *clearance* bacteriano ineficaz ocorreria excessiva estimulação dos TLR das células residentes, secreção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da resposta imune inata e mediada por células T. A interrupção do mecanismo de tolerância das células epiteliais e das células apresentadoras de antígeno (APC) amplificaria o recrutamento de mais células da imunidade inata (como os neutrófilos) e adicionalmente, defeitos nas células T regulatórias (Treg) e nas APCs causariam excessiva resposta inflamatória (Fava e Danese, 2011) (Figura 3).

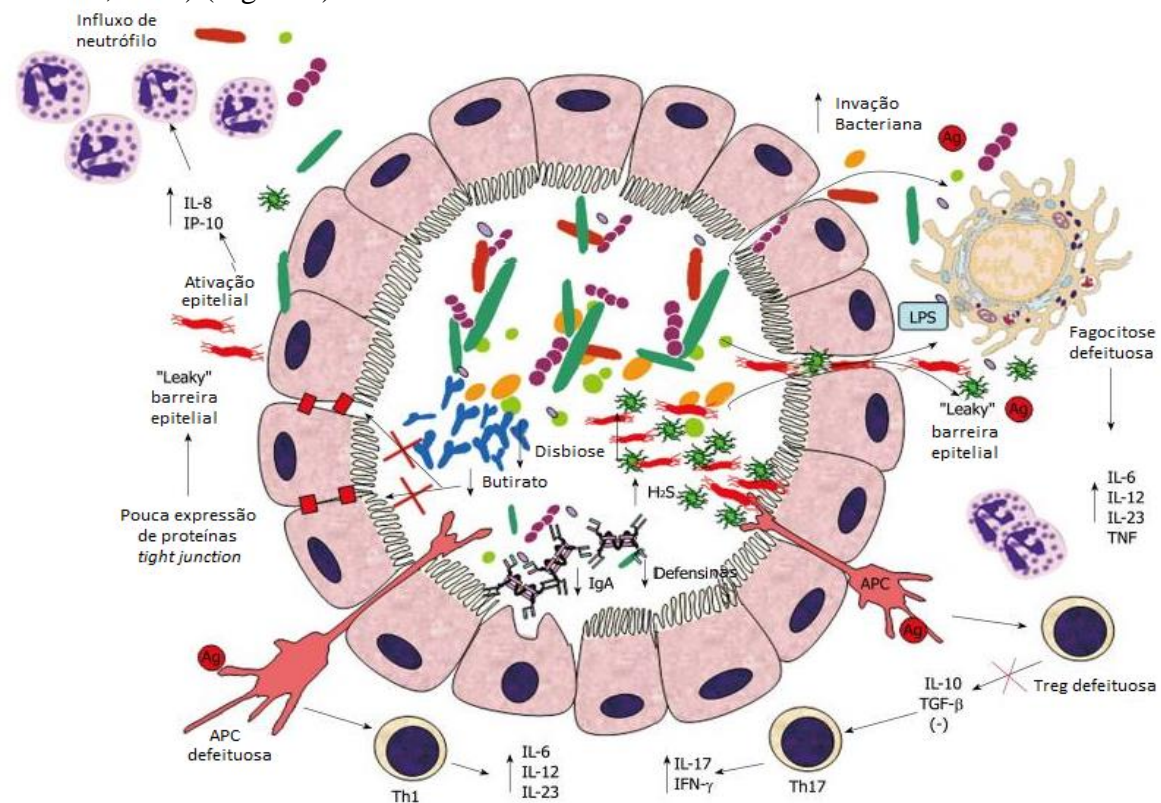


Figura 3. Sugestão do mecanismo da patogênese da doença inflamatória intestinal. A disbiose tem como consequência redução dos níveis luminiais de butirato, o que contribui para o *down-regulation* das proteínas epiteliais *tight junction* e aumento da permeabilidade epitelial. Esse cenário favorece a translocação bacteriana para a lâmina própria, onde antígenos microbianos desencadeiam intensa resposta, ativação da via do NFκB e consequente secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esse processo inflamatório é agravado por redução na defesa imune inata (redução luminal de defensinas, e sIgA, além de defeitos na fagocitose) que amplificaria a magnitude da translocação bacteriana através

da barreira epitelial. IL: interleucina; IFN- γ : interferon- γ ; TNF: fator de necrose tumoral; TGF- β : fator de crescimento transformante - β ; LPS: lipopolissacarídeos. Adaptado de Fava e Danese (2011).

1.4 Modulação da microbiota intestinal

Anteriormente, acreditava-se que os microrganismos no intestino eram apenas nocivos ou patogênicos, mas, atualmente, destaque tem sido atribuído aos efeitos benéficos identificados em algumas espécies ou cepas bacterianas. A microbiota intestinal atua como “órgão” que executa funções fisiológicas e influencia a biologia humana de diversas maneiras (Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski *et al.*, 2009; Maslowski e Mackay, 2011). No estado de saúde, mecanismos finos regulam a tolerância imunológica do hospedeiro ao estímulo constante da microbiota intestinal residente e de seus produtos finais de metabolismo (Fava e Danese, 2011). O funcionamento eficiente da mucosa intestinal é alcançado por meio de combinação entre barreira intestinal intacta e efetivo controle da proliferação bacteriana, por meio de adequada secreção de peptídeos antimicrobiano (defensinas), sIgA e fagocitose efetiva (Fava e Danese, 2011).

A microbiota, por estar em contato direto com as células epiteliais intestinais, estimula a secreção de peptídeos antimicrobianos, além de estimular a renovação das células epiteliais, participar da síntese de vitaminas, usar nutrientes inacessíveis ao hospedeiro e metabolizar xenobióticos (Turnbaugh *et al.*, 2007). Além desses efeitos benéficos da microbiota em contato com a mucosa intestinal, tem sido observado efeito na modulação do sistema imune, por meio de produtos sintetizados pelos microrganismos como o polissacarídeo A (PSA) e os ácidos graxos de cadeia curta (*short chain fatty acid* – SCFA) (Mazmanian *et al.*, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2007; Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010). Esses são produzidos durante a fermentação de substâncias não digeríveis pelo TGI e apresentam propriedades anti-inflamatórias e/ou pró-resolutivas (Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski *et al.*, 2009). Os SCFA produzidos em maior quantidade durante a fermentação são principalmente o acetato (C2), propionato (C3) e butirato (C4) na proporção aproximada de 3:1:1, respectivamente (Macfarlane e Macfarlane, 2003; Flint *et al.*, 2012).

O acetato e propionato se ligam ao receptor acoplado à proteína G, denominado GPR43, já o butirato ao GPR41 (Brown *et al.*, 2003; Le Poul *et al.*, 2003). O GPR43 apresenta-se mais expresso em neutrófilos e eosinófilos nos quais exerce papel fundamental para a regulação da resposta inflamatória. É observada, também, a expressão desse receptor no epitélio colônico exercendo efeito em diversas funções; entre elas, proliferação celular e proteção da integridade da barreira epitelial (Maslowski *et al.*, 2009). Já o butirato é a primeira fonte energética das células epiteliais colônicas (Roediger, 1980), atua como inibidor da expressão de citocinas pró-inflamatórias por mecanismo que envolve a hiperacetilação de histonas e supressão de NFκB (*Factor nuclear kappa B*), aumenta a produção de mucina, peptídeo antimicrobiano e aumenta a expressão das proteínas *tight junction* (Segain *et al.*, 2000; Venkatraman *et al.*, 2003; Fava e Danese, 2011).

Como nas IBDs é observado desequilíbrio entre as populações de microrganismo da microbiota intestinal (Gionchetti *et al.*, 2006; Mazmanian *et al.*, 2008; Fava e Danese, 2011), espera-se que o restabelecimento da homeostase seja opção favorável e contribuinte aos tratamentos atuais dessas doenças. Atualmente o uso de prebióticos, probióticos ou simbióticos (combinação dos dois anteriores) são formas de manipulação do perfil bacteriano intestinal, bastante utilizada, com demonstração de efeito benéfico em diversas situações de saúde ou patológicas (Vyas e Ranganathan, 2012).

Os probióticos são bactérias ou leveduras administradas vivas, por meio de suplementação dietética ou preparações farmacêuticas (Martins *et al.*, 2009). Elie Metchnikoff, em 1907, foi o primeiro a propor o seu uso para a manutenção da saúde e prevenção de doenças. O autor sugeriu que altas concentrações de lactobacilos na microbiota intestinal são importantes para a saúde e a longevidade em humanos (Gionchetti *et al.*, 2006). De acordo com recente definição adotada pelo *Food and Agricultural Organisation (FAO) of the United Nations and the World Health Organisation (WHO)*, probióticos são: “Microrganismos vivos que, quando administrados em adequada quantidade, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro” (Martins *et al.*, 2009; Vyas e Ranganathan, 2012).

Os lactobacilos e as bifidobactérias, atualmente, são os microrganismos mais utilizados como probióticos, com objetivo de prevenção de doenças ou mesmo como tratamento de distúrbios relacionados ao TGI. Mas outros microrganismos entre eles,

Escherichia coli não patogênica e levedura *Saccharomyces boulardii*, também têm apresentado efeitos benéficos (Shanahan, 2004; Martins *et al.*, 2009). Algumas cepas de bifidobactéria (*Bifidobacterium longum*) têm efeito probiótico em diversos tratamentos, entre eles contra infecção por patógenos e acredita-se que o efeito protetor dessas cepas seja por meio de maior produção de acetato (Fukuda *et al.*, 2011).

O campo de estudo dos probióticos é complexo e ainda necessita de pesquisas rigorosas. Devido à variabilidade cepa-específica e a heterogeneidade clínica e terapêutica das IBDs, não se pode ainda assumir que o fornecimento de determinado probiótico é igualmente adequado para todos os indivíduos (Shanahan, 2004). Apesar dessas limitações, resultados encorajadores da terapia por probiótico têm sido obtidos na colite experimental, na qual a administração de algumas cepas de bactérias reduziu a resposta inflamatória nos animais com a doença (Shibolet *et al.*, 2002; Peran *et al.*, 2005; Gionchetti *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2013).

Além do uso de probióticos, a modulação da microbiota poderia ser realizada pelos hábitos dietéticos. Esses são considerados um dos principais fatores contribuintes para a diversidade da microbiota humana (De Filippo *et al.*, 2010) e a exposição de ampla variedade de microrganismos, associada à dieta rica em fibra, poderia potencialmente enriquecer o microbioma intestinal (Maslowski e Mackay, 2011). Alterações na alimentação atual, com aumento na ingestão de carboidratos simples e gordura (conhecida como dieta Ocidental) e redução no consumo de alimentos ricos em fibra têm sido associadas a modificações na microbiota intestinal e estariam correlacionadas ao aumento da incidência de doenças inflamatórias, entre elas as intestinais, em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Turnbaugh *et al.*, 2009; De Filippo *et al.*, 2010).

1.5 Prebióticos

A influência de componentes relacionados à alimentação na proliferação de microrganismos nas fezes foi observada por volta de 1980. Os pesquisadores demonstraram que oligossacarídeos não digeridos eram seletivamente fermentados por bifidobactérias e, que, apresentavam capacidade de aumentar a sua proliferação em fezes humanas. Essas observações foram confirmadas e posteriormente expandidas por Gibson & Roberfroid, que introduziram o conceito de prebióticos a esses compostos

(Roberfroid *et al.*, 2010). Atualmente, definição mais ampla para essa terminologia seria: “ingrediente, que ao ser fermentado no cólon, promove específica alteração na composição e/ou atividade gastrointestinal da microbiota, conferindo saúde ao hospedeiro” (Roberfroid *et al.*, 2010; Vyas e Ranganathan, 2012).

As fibras dietéticas ou alimentares são polissacarídeos pertencentes à família dos carboidratos que escapam da digestão, uma vez que são resistentes à hidrólise pelas enzimas humanas alimentares e são posteriormente fermentadas pela microbiota. O principal efeito fisiológico da fibra dietética, inicialmente descrita, foi a sua influência em relação ao esvaziamento gástrico e o tempo do trânsito intestinal, resultando em melhora da tolerância à glicose, além de participar da formação das fezes e melhora do funcionamento intestinal (Roberfroid, 1993).

As fibras são classificadas em dois tipos, dependendo de sua solubilidade à água, em fibras solúveis e insolúveis. As primeiras são fermentadas em maior quantidade por ampla variedade de bactérias anaeróbicas, o que resulta em aumento na biomassa bacteriana (fator bifidogênico) (Meyer e Stasse-Wolthuis, 2009), aumento na massa fecal, alteração no pH intra-colônico, produção de SCFA (em maior quantidade acetato, propionato, butirato) e vários gases (dióxido de carbono - CO₂, hidrogênio - H₂), como produto metabólico final. As fibras insolúveis também podem ser fermentadas, mas, em taxa bastante reduzida, elas servem quase que exclusivamente como contribuintes para a formação da massa fecal e aumento do trânsito intestinal (Roberfroid, 1993).

Entre os carboidratos utilizados como fonte de fermentação, são citados os amidos, que escapam da digestão e absorção no intestino delgado e polissacarídeos da parede celular (celulose e polissacarídeos não celulósicos como pectina, xilana, arabinogalactana, gomas e mucilagens). Outras substâncias podem também ser precursoras dos SCFA, como proteína, peptídeos e glicoproteínas. Enzimas hidrolíticas bacterianas permitem a despolimerização dessas macromoléculas, possibilitando aos microrganismos a fermentação dos componentes de açúcares (Macfarlane e Macfarlane, 2003) (Figura 4).

Embora diferentes fontes de carbono sejam utilizadas como substratos de fermentação por bactérias residentes no intestino grosso, essas substâncias são catabolizadas por poucas vias bioquímicas. A maioria das bactérias intestinais utiliza a via glicolítica para produzir energia proveniente dos carboidratos, que inicialmente são convertidas em piruvato e acetil-CoA, que posteriormente são convertidas em ampla

variedade de produtos. A metabolização por meio da via das pentoses-fosfato também ocorre, em muitas bactérias residentes no intestino e produzem NADPH e pentoses com finalidade de biossíntese, mas, também podem gerar vários intermediários para a via glicolítica e gerar piruvato. Durante a metabolização de hexoses, a glicose-6-fosfato é descarboxilada à ribulose-5-fosfato, que é submetido a uma série de interconversões não-oxidativas catalisada por transcetolase e transaldolase, em que triose e hexose fosfato são formadas. Esses intermediários podem entrar em vários níveis da via glicolítica participando da síntese de piruvato. A síntese de produtos reduzidos, que incluem hidrogênio, lactato, succinato, butirato e etanol participam do equilíbrio redox, enquanto a formação de produtos mais oxidados, como acetato, está associada à produção de ATP (Figura 4) (Macfarlane e Macfarlane, 2003).

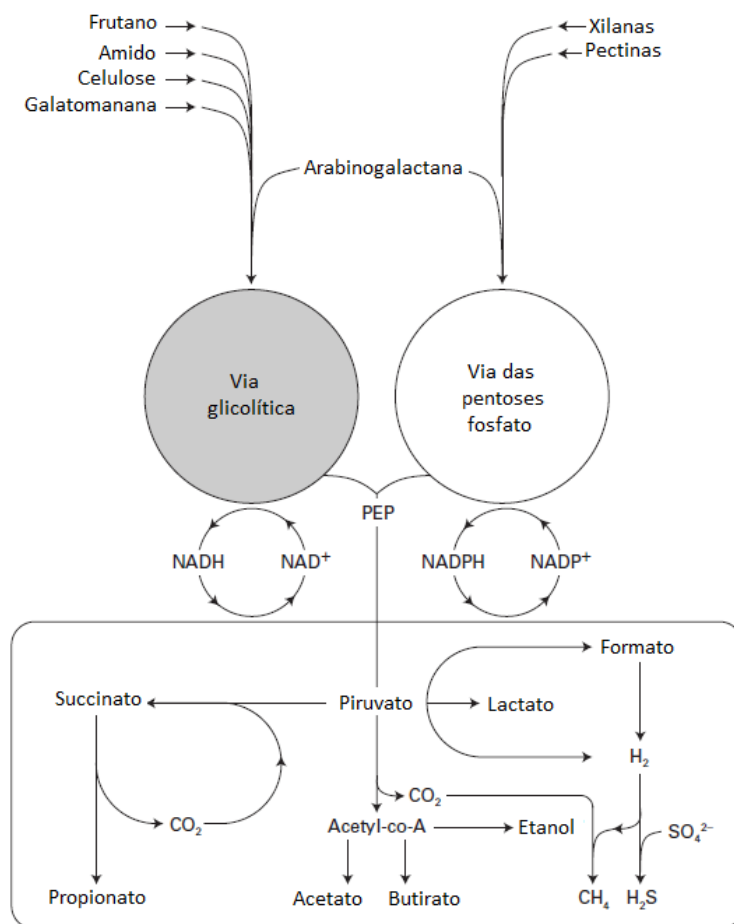


Figura 4. Diagrama simplificado da metabolização de polissacarídeos e principais rotas de fermentação de carboidratos no intestino grosso. Embora diferentes fontes de carbono sejam utilizadas como substratos de fermentação por bactérias residentes no intestino grosso, essas substâncias são catabolizadas por poucas vias bioquímicas. A maioria das bactérias intestinais utiliza a via glicolítica para produzir energia proveniente dos carboidratos, que inicialmente são convertidas em piruvato e acetyl-

CoA. A metabolização por meio da via das pentoses-fosfato também ocorre, em muitas bactérias residentes no intestino e produzem NADPH e pentoses com finalidade de biossíntese, mas, também podem gerar vários intermediários para a via glicolítica e gerar piruvato. PEP, fosfoenolpiruvato Adaptado de Macfarlane e Macfarlane (2003).

As quantidades de SCFA produzidas variam dependendo da região observada e são encontradas em maior quantidade na região proximal do intestino grosso, devido, principalmente, à maior disponibilidade de carboidratos. Alterações em sua produção são dependentes de diversos fatores, entre eles: idade, dieta, atividade do sistema neuroendócrino, estresse, pancreatite e outras secreções no trato digestivo, produção de muco, doenças, uso de medicamentos, renovação celular do epitélio, composição química, e quantidade do substrato disponível, bem como interações competitivas e cooperativas entre as diferentes espécies da microbiota (Macfarlane e Macfarlane, 2003).

No Brasil, atualmente, as fibras alimentares são consideradas como nutrientes com alegação de funcionalidade pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2008) com indicação de consumo associado à alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. Múltiplas funções podem ser atribuídas à fibra alimentar e ao uso dos prebióticos, como podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo do efeito da ingestão de prebióticos na alimentação*.

-
- Melhora e/ou estabilização da composição da microbiota;
 - Melhora das funções intestinais (regularidade intestinal, consistência e volume das fezes);
 - Aumento na absorção de minerais e melhora da saúde dos ossos (influenciando o conteúdo de cálcio nos ossos, densidade mineral óssea);
 - Modulação da produção de peptídeos gastrointestinais, metabolismo energético e saciedade;
 - Iniciação (após o nascimento) e regulação/modulação de funções imunes;
 - Melhora nas funções da barreira intestinal;
 - Redução do risco de infecções intestinais;
 - Redução do risco de obesidade, diabetes tipo 2, síndrome metabólica;
 - Redução de riscos e/ou melhora no tratamento de inflamação intestinal;
 - Redução do risco de câncer de cólon.
-

* Adaptado Roberfroid *et al.*, (2010).

Devido à capacidade dos carboidratos não digeridos em fermentar e produzir substâncias imunomodulatórias (como os SCFA) o uso desses componentes alimentares

nas IBDs apresenta grande potencial de estratégia terapêutica. Estudos demonstram que o uso de fontes de fibra alimentar tem exercido efeito benéfico em humanos com UC e foi capaz de melhorar sinais clínicos, sem efeito colateral e com modulação da microbiota intestinal (Kanauchi *et al.*, 2002); além de prolongar a remissão em pacientes com essa doença (Fernandez-Banares *et al.*, 1999; Hanai *et al.*, 2004). Além disso, em diversos estudos, em modelo de colite experimental em animais, o uso da fibra alimentar parece reduzir a inflamação, diminuir a lesão colônica (Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002; Galvez *et al.*, 2005; Fava e Danese, 2011) e influenciar na cicatrização do tecido colônico lesionado, durante o processo inflamatório (Moreau *et al.*, 2003). A fibra também parece reduzir o desenvolvimento de tumor na colite crônica induzida por DSS (Komiyama *et al.*, 2011).

Como prebiótico, as fibras alimentares podem ser fornecidas em associação a probióticos, os denominados simbióticos (Shanahan, 2004; Vyas e Ranganathan, 2012). E, provavelmente, o uso separado ou em conjunto dessas estratégias modulatórias da microbiota poderão ser alternativa ou mesmo complemento aos tratamentos das IBDs e de outras doenças inflamatórias crônicas, que têm apresentado crescente aumento em sua incidência e prevalência.

2. JUSTIFICATIVA

O aumento do consumo de alimentos industrializados ricos em carboidratos simples e em gordura, e a redução de alimentos *in natura*, ricos em fibras, vitaminas e minerais são fatores que têm sido correlacionados a elevação na incidência de doenças inflamatórias crônicas, dentre elas, as intestinais, em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Algumas hipóteses sugerem que o aumento na incidência dessas doenças seria devido às alterações no perfil da microbiota, que é altamente influenciada pela alimentação.

Apesar dos avanços na área médica, com o desenvolvimento de tratamentos e medicamentos mais eficazes, os tratamentos para as IBDs, entre eles, o uso de corticosteroides e drogas imunossupressoras, apresentam importante efeito colateral. Por esse motivo, o uso por períodos prolongados pelos indivíduos, desses tratamentos, torna-se uma limitação. Dessa forma, a identificação de estratégias que previnam e que sejam terapêuticas para as IBDs é de suma importância.

O uso de prebiótico nas IBDs parece exercer efeito benéfico devido à modificação na resposta inflamatória, e a fibra alimentar, como prebiótico, atuaria provavelmente por meio da modulação da microbiota intestinal. Apesar desses conhecimentos, muitos estudos ainda são necessários para a compreensão dos mecanismos pelos quais a fibra alimentar exerce seu efeito nas IBDs, o tipo de fibra a ser utilizado e, principalmente, o melhor momento para o início da terapia com o prebiótico.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Verificar os efeitos de dieta rica em pectina (fibra solúvel), em modelo experimental agudo e crônico de colite induzida por DSS, bem como descrever as características da resposta inflamatória observada nesses modelos.

3.2 *Objetivos Específicos*

3.2.1 Verificar o tempo necessário de pré-tratamento com dieta rica em fibra que exerça efeito benéfico na colite experimental aguda. *Estratégia experimental:* os animais foram divididos em grupos e receberam dieta rica em fibra por 10, 20 ou 40 dias anteriores à indução de colite por DSS, em modelo agudo, para a identificação do melhor período de pré-tratamento. Os animais foram avaliados quanto a parâmetros clínicos, como perda de peso e escore clínico; parâmetros inflamatórios no cólon, por meio de quantificação de enzimas relacionadas à presença de neutrófilo e eosinófilo, mieloperoxidase e peroxidase eosinofílica, respectivamente, além da avaliação do escore histopatológico. Nos animais que foram submetidos ao período de pré-tratamento, que obtiveram melhores resultados, foram verificadas as concentrações de quimiocinas CXCL1, CCL11 e citocinas TNF α , IL-10, TGF β .

3.2.2 Verificar o efeito do pré-tratamento com a dieta rica em fibra em relação ao pré-tratamento com acetato, por esse apresentar conhecido efeito anti-inflamatório e ser o ácido graxo de cadeia curta produzido em maior quantidade durante a fermentação de fibra solúvel. Além da verificação da associação dos dois pré-tratamentos. *Estratégia experimental:* os animais foram submetidos à colite aguda e pré-tratamento com acetato e/ou com a dieta rica em fibra. Os animais foram avaliados quanto a parâmetros clínicos, perda de peso e escore clínico; e avaliação do escore histopatológico.

3.2.3 Avaliar o efeito da dieta rica em fibra na colite crônica como tratamento iniciado em momentos diferentes no curso da doença estabelecida e comparar o seu efeito ao pré-tratamento com a dieta rica em fibra. *Estratégia experimental:* padronização de modelo de colite crônica induzida por ciclos de administração de DSS, bem como avaliação da sua resposta inflamatória, por meio do acompanhamento dos sinais clínicos e inflamatórios característicos da doença. Avaliação o efeito da dieta rica em fibra como tratamento na colite experimental em comparação ao pré-tratamento. Os animais foram divididos de acordo com a estratégia terapêutica de tratamento e pré-tratamento e avaliados quanto a parâmetros clínicos, perda de peso e escore clínico e parâmetros inflamatórios no cólon, por meio de análises de enzimas relacionadas à presença de neutrófilo e eosinófilo, mieloperoxidase e peroxidase eosinofílica, respectivamente, além da análise das concentrações de citocinas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas, entre 6-8 semanas de idade (peso entre 18- 22g), foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos, no laboratório de Imunofarmacologia/ICB, sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à ração e água.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): n° do protocolo 57/2011.

4.2 Colite ulcerativa experimental

4.2.1 Modelo experimental agudo

De acordo com o modelo sugerido por Okayasu *et al.* (1990), para a indução da colite ulcerativa experimental, o DSS foi dissolvido (peso molecular 36,000-50,000, MP Biomedicals, LLC, Aurora, OH) em água, na concentração de 4% (peso/volume) e a solução colocada no bebedouro dos animais para ingestão "*ad libitum*". Essa solução foi preparada e trocada dos bebedouros a cada dois dias, com duração de tratamento por seis dias. Os animais do grupo controle foram colocados em gaiolas separadas das gaiolas dos animais que seriam submetidos à indução colite e estes receberam apenas água durante todo o experimento. No sexto dia de indução de colite, foi realizada eutanásia dos animais por sobredose de anestésico (cetamina/xilazina), para a retirada de amostras (intestino grosso), para posteriores análises do processo inflamatório através de parâmetros bioquímicos e histopatológicos.

Os influxos de eosinófilos e neutrófilos foram avaliados indiretamente através da quantificação da atividade das enzimas peroxidase eosinofílica (EPO) e mieloperoxidase (MPO), respectivamente. Os animais foram monitorados de 48 em 48 horas para avaliação do peso e sinais clínicos (metodologia descrita abaixo). Para os dados de letalidade, após a indução da colite por seis dias, a solução com DSS foi

substituída por água e os animais continuaram a serem monitorados, até completarem 21 dias após o início do tratamento com DSS.

4.2.2 Modelo experimental crônico

- Modelo crônico

O DSS foi administrado na concentração de 3% (peso/volume) e colocado ao bebedouro dos animais para ingestão "*ad libitum*". Essa solução era preparada e trocada dos bebedouros a cada dois dias e administrada aos animais, durante seis dias, seguidos por fornecimento de água pura durante 14 dias, o que equivalia um ciclo de tratamento. Todos os animais com colite foram submetidos a cinco ciclos de DSS e foi realizada a eutanásia nos animais no último dia desse ciclo juntamente com os controles que receberam apenas água, durante todo o período experimental. Os animais com colite foram divididos em grupos que receberam dieta rica em fibra como pré-tratamento (Pré-DF), dieta rica em fibra (DF) como tratamento iniciado no terceiro ciclo (3DF), no quarto (4DF) ou no quinto ciclo (5DF) de administração do DSS.

4.3 Dietas fornecidas aos animais

Anteriormente à indução de colite, os animais foram divididos em grupos, de acordo com a dieta que iriam receber (dieta padrão AIN93M x DF). Os ingredientes da dieta padrão podem ser visualizados na Tabela 2 e, a DF, se difere na quantidade de amido dextrinizado, que teve parte (100g) substituída por pectina (fibra solúvel). Optou-se por essa substituição, uma vez que ambos os ingredientes são carboidratos, o que resultou a DF com 10% de fibra em sua composição final. A dieta AIN93M foi padronizada por REEVES, *et al.* (1993), essa dieta é utilizada devido a sua facilidade de manipulação e de modificação da composição.

Tabela 2. Ingredientes da dieta AIN93M* – uso em animais com idade superior a seis semanas e da dieta rica em fibra solúvel.

Ingredientes - AIN93M*- Dieta padrão	Quantidade (g)	Ingredientes – Dieta rica em fibra	Quantidade (g)
BHT	0,008	BHT	0,008
Bitartarato de colina	2,500	Bitartarato de colina	2,500
Cistina (metionina)	1,800	Cistina (metionina)	1,800
Mix de vitaminas	10,000	Mix de vitaminas	10,000
Mix de minerais	35,000	Mix de minerais	35,000
Celulose	50,000	Celulose	50,000
Óleo de soja	40,000	Óleo de soja	40,000
Sacarose	100,000	Sacarose	100,000
Amido dextrinizado	155,000	Amido dextrinizado	55,000
Pectina	-	Pectina	100,000
Caseína	140,000	Caseína	140,000
Amido de milho	465,692	Amido de milho	465,692
Água destilada	300,000	Água destilada	300,000

* Reeves *et al.*, (1993).

4.4 Delineamento experimental I

A determinação do período de pré-tratamento com a dieta rica em fibra, capaz de exercer efeito benéfico na colite experimental induzida por DSS, foi realizada por início do fornecimento da dieta em tempos diferentes. Os animais foram acompanhados por 40 dias anteriores à indução de colite e foram divididos em grupos que receberam a dieta rica em fibra: iniciada no dia 0 de acompanhamento (40 dias com a dieta rica em fibra-40DF), iniciada no dia 20 de acompanhamento (20 dias com a dieta rica em fibra-20DF) ou iniciada no dia 30 de acompanhamento (10 dias com a dieta rica em fibra-10DF) anterior ao início do tratamento com DSS. Após esse período, deu-se início à indução de colite por meio da administração de DSS 4%. Em dias alternados, os animais foram avaliados para a determinação dos sinais clínicos característicos da doença e também para a aferição do peso (Figura 5).

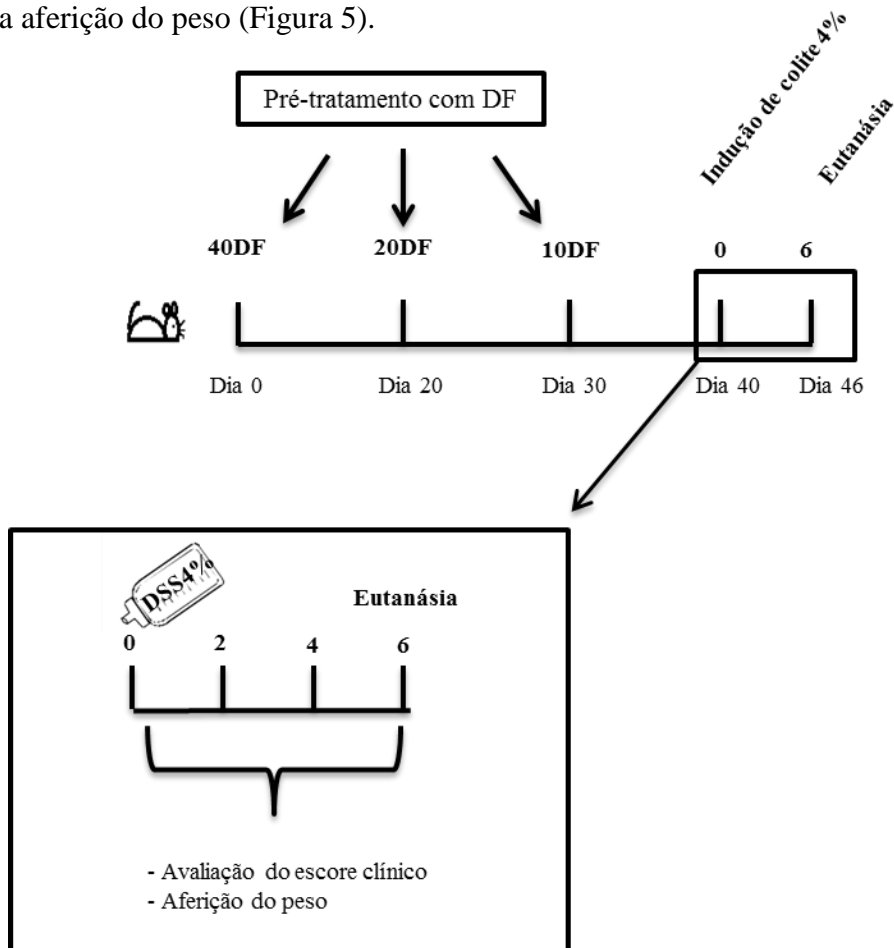


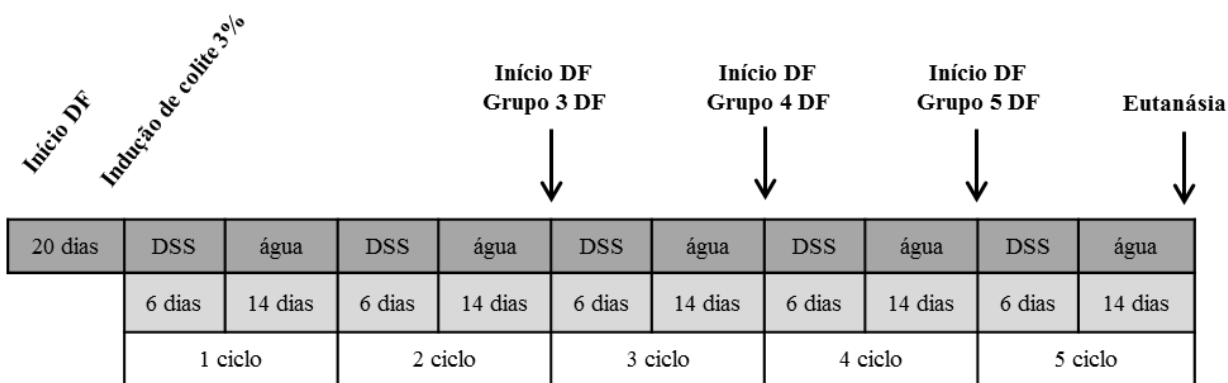
Figura 5. Delineamento experimental I. Avaliação do tempo de pré-tratamento de dieta rica em fibra eficaz na redução dos parâmetros inflamatórios na colite induzida por DSS.

No experimento de letalidade, os animais foram alimentados com a dieta AIN93M ou pré-tratados com dieta rica em fibra por 40 dias. Após, essa etapa, os animais foram submetidos à indução de colite por seis dias, a solução com DSS foi substituída por água e os animais continuaram a serem monitorados, até completarem 21 dias após o início do tratamento com DSS.

4.5 Delineamento experimental II

Para avaliar o efeito da dieta rica em fibra na colite em modelo crônico, os animais foram submetidos a cinco ciclos de DSS (3%) e foram divididos em grupos com objetivos terapêuticos diferenciados, como é possível visualizar na Figura 6. No pré-tratamento com a dieta rica em fibra os animais receberam a dieta por 20 dias anteriores à indução de colite. Já para avaliar o efeito da dieta rica em fibra como tratamento, essa foi fornecida em momentos diferenciados ao longo da evolução da doença, como pode ser observado na Figura 6A, em que a dieta rica em fibra foi iniciada em alguns animais no começo do terceiro, quarto ou quinto ciclo de administração do DSS. Todos os animais foram submetidos à eutanásia ao final do quinto ciclo, juntamente com o controle, que ingeriu apenas água durante todo o experimento. Na Figura 6B, é possível visualizar todos os grupos ao final do experimento e como os animais foram divididos.

A – Protocolo de indução de colite crônica



B – Divisão dos grupos

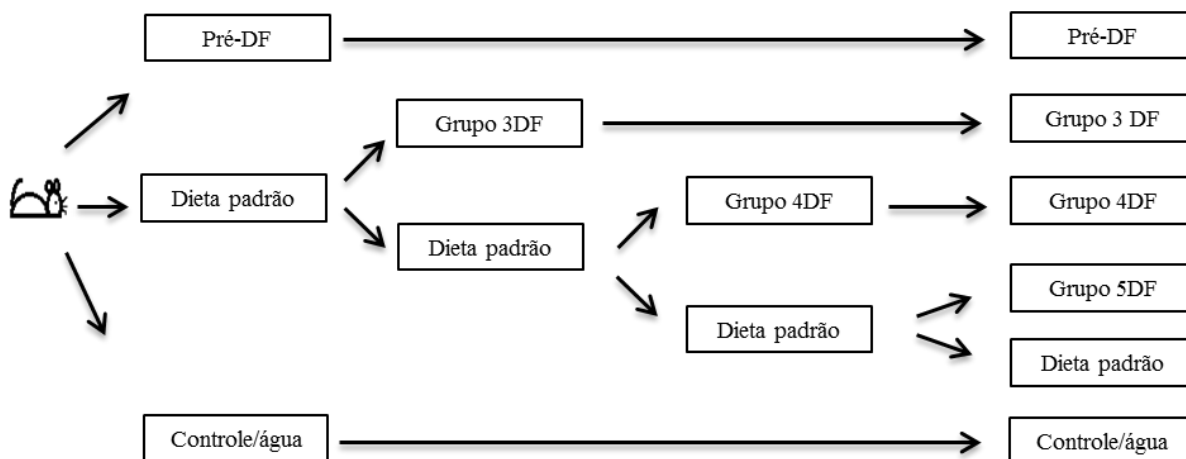


Figura 6. Delineamento experimental II. Avaliação do tratamento e pré-tratamento de dieta rica em fibra na colite experimental crônica induzida por cinco ciclos de DSS.

4.6 Pré-tratamento com acetato

O acetato de sódio (Sigma) foi utilizado como estratégia experimental (150mMol), dissolvido na água dos animais e iniciada a administração cinco dias anteriores à indução de colite. O fornecimento do acetato permanecia durante a indução da doença dissolvido na água dos animais, juntamente com o DSS, nos grupos em que foi avaliado o efeito desse SCFA na colite experimental.

4.7 Determinação dos sinais clínicos

Os camundongos foram monitorados clinicamente a cada dois dias durante o período de administração do DSS e, no modelo de colite crônica, além desses monitoramentos, os animais foram avaliados duas vezes durante o período de interrupção do DSS e fornecimento de água. Para a avaliação dos sinais clínicos, os animais foram colocados individualmente em gaiolas, por cerca de 10 minutos para a coleta das fezes e análise da consistência e presença de sangue e/ou muco.

Para a análise da presença de sangue oculto, as fezes foram coletadas e maceradas em cartelas (INLAB - Diagnóstica São Paulo, BR). A quantificação numérica dos sinais clínicos foi feita de forma individual (cada animal tinha sua identificação) seguindo as seguintes características (Vieira *et al.*, 2009):

- Fezes normais e ausência de sangue - sem pontuação;
- Fezes normais e teste de sangue oculto positivo - 1 ponto;
- Fezes de consistência cremosa e traços de sangue - 2 pontos;
- Fezes de consistência pastosa e teste de sangue oculto positivo com intensa coloração - 3 pontos;
- Fezes sólidas com muco e teste de sangue oculto positivo - 4 pontos;
- Diarreia e traços de sangue anal - 5 pontos;
- Diarreia e presença de gotas de sangue na caixa - 6 pontos;
- Diarreia e hemorragia - 7 pontos;
- Diarreia, hemorragia e sinais de morbidade, incluindo postura encurvada e piloereção - 8 pontos.

4.8 Avaliação da perda de peso

A aferição do peso corporal dos animais foi realizada a cada dois dias, durante a administração de DSS, e no modelo de colite crônica, além desses monitoramentos, os animais tiveram seus pesos aferidos duas vezes durante o período de interrupção do DSS e fornecimento de água. Os camundongos foram pesados e identificados individualmente. Para o cálculo da porcentagem da perda de peso foi utilizada a

seguinte fórmula: peso observado/peso inicial (dia 0) X 100. Os resultados foram expressos em porcentagem da perda de peso durante o período de indução da colite.

4.9 Quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da mieloperoxidase - MPO

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no cólon foi mensurada pelos ensaios de atividade da MPO (Souza *et al.*, 2002). Os fragmentos do cólon dos animais submetidos à colite experimental e dos seus controles foram removidos e congelados a -20°C, até o dia da homogeneização do tecido. Após o descongelamento do tecido, este foi homogeneizado em tampão (0,1 M NaCl; 0,02 M Na₃PO₄; 0,015 M NaEDTA - pH 4,7) na proporção de 1,9mL de tampão para cada 100 mg de tecido, utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125[®] - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Após esse procedimento, o homogenato foi centrifugado a 10000 rpm/15 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e o precipitado foi submetido à lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% - 30s após). Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão 2 (Na₃PO₄ 0,05 M; *Hexadecyl trimethyl ammonium bromide* – HTAB - Sigma 0,5% p/v - pH 5,4) na proporção de 1,9mL para cada 100mg de tecido. Após essa etapa, o homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm/15 minutos e foi recolhido o sobrenadante para a realização do ensaio. As amostras foram diluídas no tampão 2 na razão 1:10.

A atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450nm utilizando a reação entre *tetramethylbenzidine* diluído em dimetilsufóxido (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A reação foi interrompida com H₂SO₄ 1M, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Os resultados obtidos foram expressos como unidade relativa, de acordo com curva padrão do número de neutrófilos versus OD que foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados (> 95% pureza) e utilizado para a medida de atividade da mieloperoxidase, padronização que havia sido realizada anteriormente no laboratório (Souza *et al.*, 2002).

4.10 Quantificação da infiltração de eosinófilos no tecido por meio da avaliação da atividade da peroxidase eosinofílica - EPO

A quantificação da atividade EPO no cólon foi utilizada como maneira indireta de estimar a presença de eosinófilos no intestino grosso. Uma porção do cólon dos animais submetido à eutanásia foi homogeneizado utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125[®] - Fisher Scientific Pennsylvania, USA) com PBS 5X (*phosphate-buffered saline* pH=7,2) na proporção 1,9mL em 100mg de tecido, em seguida o tecido foi centrifugado a 10000 rpm/10 minutos (12.000 g) e o sobrenadante foi posteriormente desprezado. O sedimento foi sujeito à lise hipotônica por adição de 1,5mL (em 100mg de tecido) de salina (NaCl) 0,2%, seguido pela adição de 1,5mL da preparação com salina 1,6% e glicose 5,0%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10000 rpm/10 minutos, e o sobrenadante foi novamente desprezado e o sedimento ressuspensão em 1,9mL de PBS (pH 7,4), contendo HTAB 0,5%. Essa solução foi novamente homogeneizada, e o homogenato foi submetido ao processo de congelamento e descongelamento, por três vezes, em nitrogênio líquido e centrifugado a 10000 rpm/15 minutos. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da enzima.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, 75µL de amostra (sem diluição) ou branco (PBS) foi incubada com 75µl de substrato (1,5 mM de o-fenilenodiamina, OPD em tampão Tris-HCl - 0,075mM – pH=8 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM) por poço. A placa foi incubada no escuro por aproximadamente 30 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 50µl de H₂SO₄ 1M, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 492nm. Este ensaio foi conduzido como descrito anteriormente por Strath *et al.*, (1985).

4.11 Determinação das concentrações de citocinas/quimiocinas - ensaio imunoenzimático - ELISA

Concentrações das quimiocinas: CXCL1 (KC), CCL11 (eotaxina) e citocinas: TNF α , IL-6, IL-10, TGF β foram mensuradas no cólon utilizando-se anticorpos R&D Systems (Minneapolis, USA) de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante.

Para dosagem de citocinas, amostras do cólon foram homogeneizadas em solução tampão de fosfato (PBS) (0,4 M NaCl e 10 mM de Na₂HPO₄) contendo inibidor de proteases (0,1 mM *phenylmethilsulfonyl fluoride*, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% *Tween* 20, na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - *Fischer Scientific Pennsylvania*, USA). As amostras foram mantidas a -20° C para posterior realização do ensaio enzimático.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As placas foram sensibilizadas com 100µL/poço de solução dos respectivos anticorpos monoclonal anti-camundongo para quimiocinas/citocinas a serem analisadas e incubadas a 4°C *overnight*. Após quatro lavagens (400µL/poço - Bio-Tek Instruments, INC) com PBS-Tween 20 (0,05% - pH=7,4); adicionou-se às placas 200µL por poço de tampão bloqueio (1% albumina bovina-BSA em PBS pH=7,4) e estas foram, então, incubadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Após nova etapa de lavagem, adicionou-se 100µL/poço dos padrões (500-1000 pg/mL) e das amostras diluídas (1:2) em BSA-PBS (0,1% - pH=7,4) e prosseguiu-se nova incubação a 4°C *overnight*. Após lavagem das placas, adicionou-se 100µL/poço de solução de anticorpo de detecção anti-camundongo para as citocinas/quimiocinas em questão e incubaram-se as placas por duas horas. Após nova lavagem, adicionou-se 100µL/poço de solução de estreptavidina (50µL de estreptavidina em 10mL de solução BSA 0,1%) e incubou-se por 30 minutos após esse intervalo de tempo foi adicionado 100µL/poço o substrato OPD (o-fenilenodiamina, Sigma) diluído em tampão citrato (pH=5,0) acrescido de H₂O₂ (30v/v). As placas foram incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos ou até que a reação ocorresse. A reação foi interrompida com a adição de 50µL/poço de H₂SO₄ 1M e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 490nm (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil). Todos os passos de incubação (exceto *overnight*) foram feitos à temperatura ambiente.

4.12 Análises histopatológicas

Porção proximal do cólon dos animais foi removido logo após a eutanásia e fixados em Bouin (solução saturada de ácido pícrico 750mL+formol 37% 250mL+2%

de ácido acético) e enrolados em formato de rocambole. Após tempo mínimo de fixação (48 horas), os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização em xilol, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes foram examinados ao microscópio óptico (x100) por uma patologista (análise cega) e pontuados de acordo a presença de inflamação (nenhuma: 0, sutil: 1, moderada: 2, grave: 3); presença de lesão (nenhuma: 0; mucosa: 1; mucosa e submucosa: 2 transmural: 3); danos nas criptas (nenhum: 0; basal 1/3: 1; basal 2/3: 2; apenas superfície: 3; perda de cripta e epitelial: 4); percentual de acometimento tecidual (1-25%: 0; 26-50%: 1; 51-75%: 2; 76-100%: 4). Após as análises, os escores foram somados e, dessa forma, valores elevados indicam que o órgão está mais inflamado e lesionado. Os cortes histológicos foram fotografados como parâmetro de comparação entre os grupos avaliados.

4.13 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (*One-way ANOVA*), seguida de pós-teste *Newman-Keuls*, e nas avaliações entre dois grupos o teste *t de student* foi utilizado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$ e os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software GraphPad Prism 4.0* (GraphPad software Inc -San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS PARTE I – COLITE AGUDA

5.1.1 Avaliação do pré-tratamento com dieta rica em fibra, em diferentes períodos, na indução de colite

Como pode ser visualizado na Figura 7A, os animais com colite e alimentados com dieta padrão (linha cheia) apresentaram maior escore clínico, desde o início da indução de colite (dia 2) até o dia da eutanásia (dia 6), em relação aos animais controles. O pré-tratamento com dieta rica em fibra (DF) por 10, 20 ou 40 dias resultou em menor escore clínico, em comparação aos animais colite alimentados com dieta padrão, em todos os dias de tratamento. Tal dado pode ser também visualizado na avaliação da área sobre a curva (AUC – *area under curve*) do escore clínico (topo da Figura 7A). A perda de peso avaliada nos animais com colite alimentados com dieta padrão foi de aproximadamente 12%, enquanto que nos animais com colite e alimentados com dieta rica em fibra essa perda foi de 7% (Figura 7B).

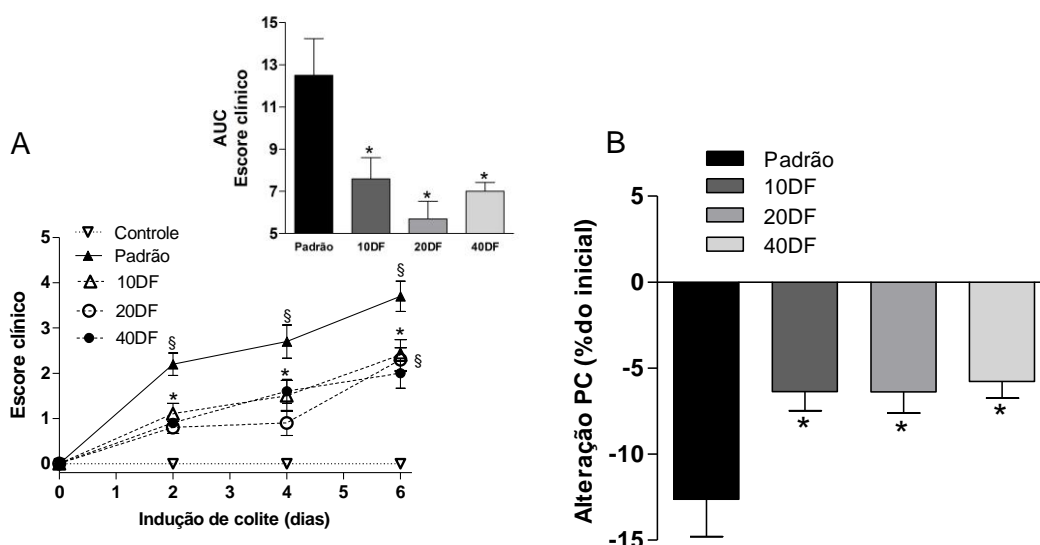


Figura 7. Avaliação dos sinais clínicos em animais submetidos a diferentes períodos de pré-tratamento com DF na colite aguda. (A) Avaliação do escore clínico durante a indução de colite por DSS. (B) Determinação da variação do peso corporal (PC) em percentual entre os dias de indução de colite e eutanásia. Os resultados representam a média \pm EPM de cada grupo (n=10). § versus Controle; *versus Padrão. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; 10DF: pré-tratamento com DF 10 dias anteriores à indução de colite; 20DF: pré-tratamento com

DF 20 dias anteriores à indução de colite; 40DF: pré-tratamento com DF 40 dias anteriores à indução de colite ($p < 0,05$).

Os animais que receberam DSS alimentados com dieta padrão apresentaram encurtamento do cólon em comparação aos animais controle, como pode ser visualizado na Figura 8A. Animais pré-tratados com dieta rica em fibra por 10, 20 ou 40 dias apresentaram comprimento do cólon similar ao dos animais controles. A MPO apresentou-se elevada nos animais com colite alimentados com dieta padrão, em relação aos animais controles (Figura 8B). O pré-tratamento com dieta rica em fibra por 10, 20 e 40 dias reduziu concentração da enzima MPO, no cólon, em relação aos animais com colite alimentados com dieta padrão. Observa-se que o pré-tratamento por 20 e 40 dias resultou em menor atividade da enzima MPO em relação aos animais pré-tratados com fibra por 10 dias (Figura 8B). Em relação à atividade da enzima EPO, nos animais com colite alimentados com dieta padrão, observa-se um aumento em relação aos animais controles, sem doença. Já os animais com colite e pré-tratados com dieta rica em fibra não foi observado aumento do EPO em relação ao grupo controle (Figura 8C).

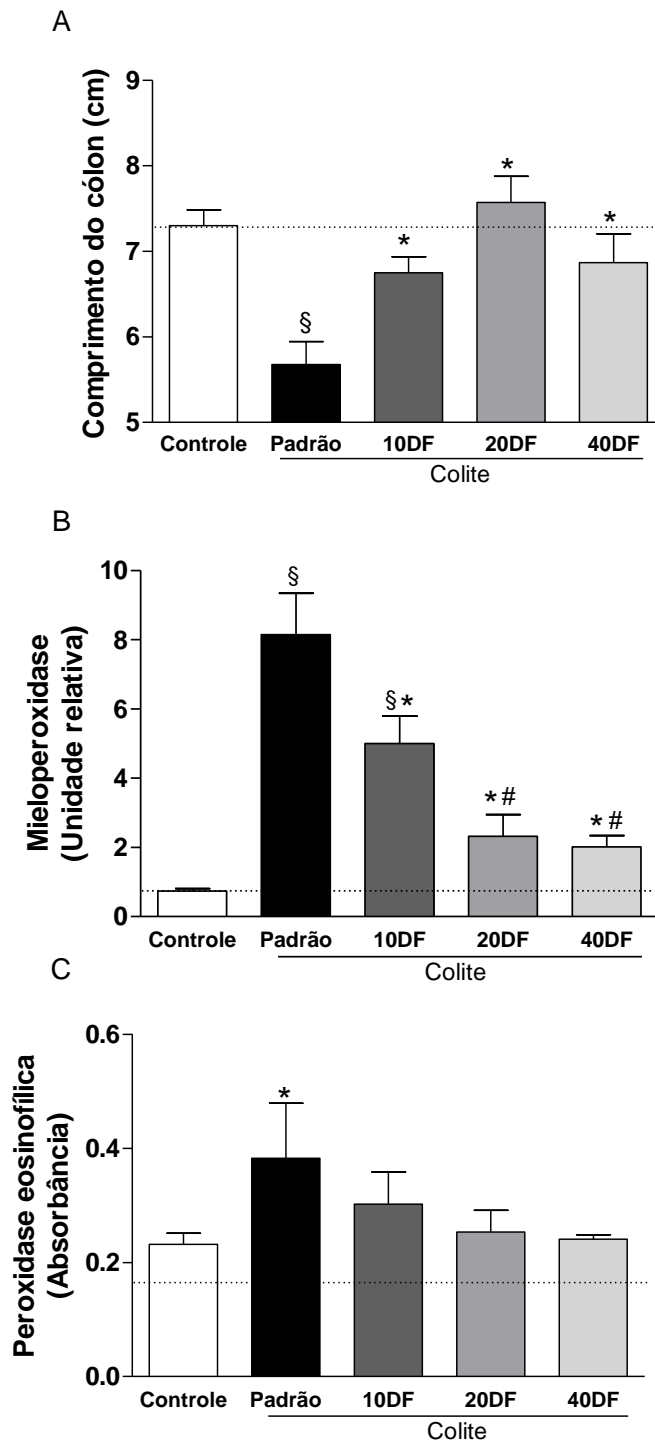


Figura 8. Comprimento do cólon e atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) em amostras colônicas. (A) Comprimento do cólon dos animais (cm) (B) Quantificação da atividade da MPO em amostras do cólon. (C) Quantificação da atividade da EPO em amostras de cólon. Os resultados representam a média \pm EPM de cada grupo (n=8-10). \S versus Controle; * versus Padrão; # versus 10DF. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite com alimentados com dieta padrão; 10DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra 10 dias anteriores à indução de colite; 20DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra 20 dias anteriores à indução de colite; 40DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra 40 dias anteriores à indução de colite (p<0,05).

Ao avaliar os cortes histológicos do cólon, pode-se observar que os animais com colite alimentados com dieta padrão apresentaram extensa destruição da mucosa, perda de criptas e intenso infiltrado de células inflamatórias (asterisco), quando comparado ao grupo controle (Figuras 9A e B). Os pré-tratamentos com dieta rica em fibra por 20 e, de forma mais significativa, 40 dias foram capazes de minimizar a lesão colônica causada pela administração de DSS. Como pode ser visualizado nos cortes histológicos, no pré-tratamento com dieta rica com fibra por 10 dias (Figura 9C), o cólon dos animais exibiram destruição da mucosa e infiltrado de leucócitos (asterisco); com 20 dias de pré-tratamento (Figura 9D) o cólon dos animais exibiram erosão parcial da mucosa intestinal e moderada inflamação e edema (asteriscos); já os animais que receberam 40 dias de pré-tratamento com dieta rica em fibra (Figura 9E) o cólon apresentou menos inflamação e menor erosão epitelial (asteriscos), dentre os grupos com colite.

Animais com colite alimentados com dieta padrão apresentaram elevado escore histopatológico quando comparado aos camundongos controles. O pré-tratamento com fibra por 10 dias não alterou o escore histopatológico em relação aos animais com colite. Entretanto, camundongos pré-tratados por 20 e 40 dias apresentaram escore histopatológico menor em relação aos camundongos submetidos à colite e alimentados com dieta padrão (Figura 9F).

O pré-tratamento com fibra apresentou efeito benéfico na atenuação da resposta inflamatória na colite. Dentre os períodos de pré-tratamento avaliados, 40 dias apresentou resultados mais consistentes, principalmente no que se refere ao escore histopatológico. Desta forma, tal período foi determinado para as avaliações subsequentes.

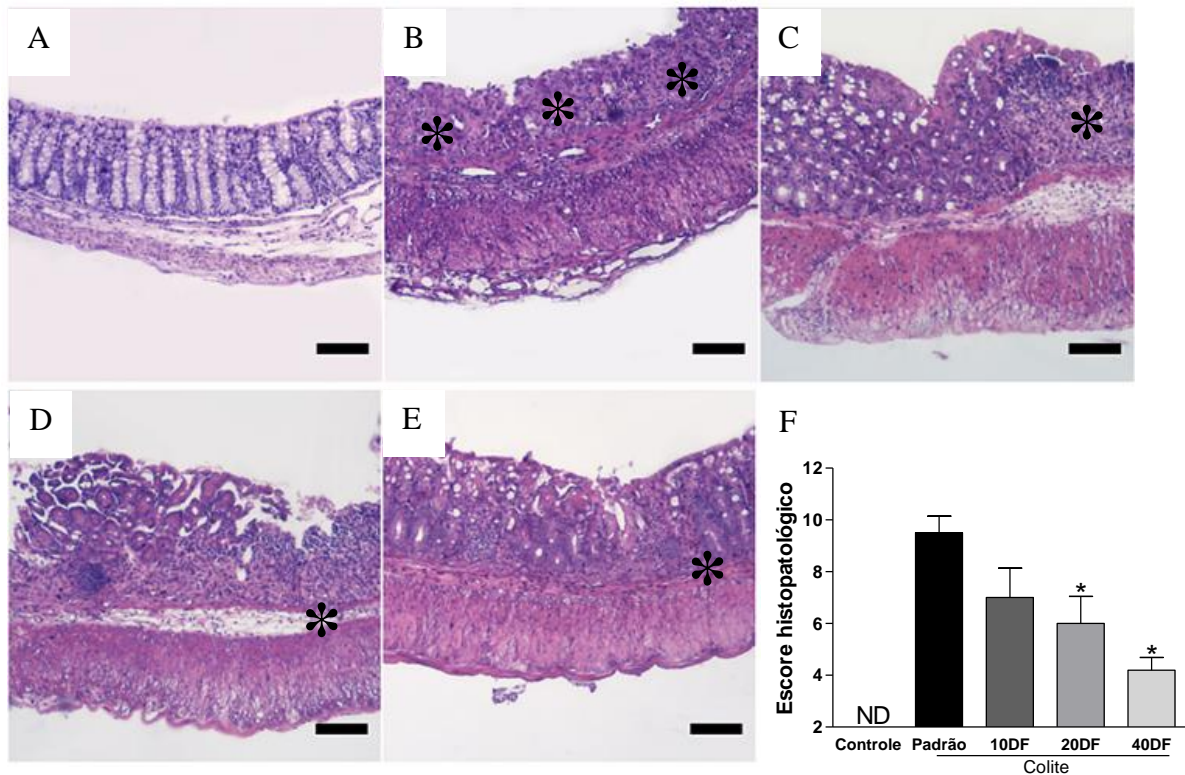


Figura 9. Avaliação de cortes histológicos de cólon na colite aguda induzida por DSS. Seções de parafina de tecido colônico corados com H&E e pontuado como determinado em Métodos. (A) Mucosa normal de camundongo da linhagem Balb/c. (B) Animais tratado com DSS. (C) Animais com DSS e 10 dias de pré-tratamento com dieta rica em fibra, anteriores à indução de colite. (D) Animais com DSS e pré-tratamento com 20 dias de dieta rica em fibra, anteriores à indução de colite. (E) Animais com DSS e pré-tratamento por 40 dias de dieta rica em fibra, anteriores à indução de colite. A-E, aumento original: X100; Barra=50 μ m. (F) Escore histopatológico total. Os resultados representam a média \pm EPM de cada grupo (n=5). *versus Padrão. Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; 10DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra 10 dias anteriores à indução de colite; 20DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra 20 dias anteriores à indução de colite; 40DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra 40 dias anteriores à indução de colite (p<0,05).

5.1.2 Avaliação do efeito da dieta rica em fibra na taxa de sobrevivência de animais com colite aguda induzida por DSS

A resposta inflamatória no modelo de colite aguda com DSS é bastante intensa e animais com colite e alimentados com dieta padrão apresentaram taxa de letalidade em torno de 60%, durante acompanhamento de 21 dias, quando comparado aos animais controles, sem doença. Enquanto, o pré-tratamento com 40 dias de dieta rica em fibra exerceu efeito protetor e reverteu essa letalidade (Figura 10).

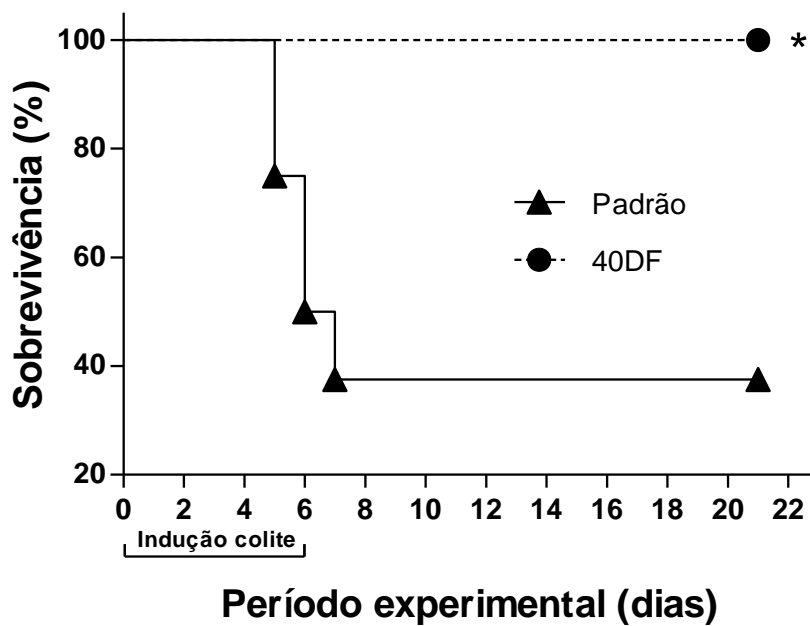


Figura 10. Curva de sobrevivência de animais com colite aguda. Acompanhamento de animais com colite aguda induzida por DSS para avaliação da taxa da mortalidade durante 21 dias (n=8). *versus Padrão. Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; 40DF: animais com colite e submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra por 40 dias (p<0,05).

5.1.3 Efeito da dieta rica em fibra na produção de citocinas e quimiocinas em animais com colite aguda

A quimiocina CXCL1 (KC), responsável pelo recrutamento de neutrófilos, apresentou concentração elevada no cólon nos animais com colite alimentados com dieta padrão e com pré-tratamento com dieta rica em fibra em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com dieta rica em fibra reduziu a concentração de CXCL1 quando comparado aos animais com colite alimentados com dieta padrão (Figura 11A).

A concentração colônica de CCL11 (eotaxina), quimiocina para eosinófilo, encontra-se elevada nos animais com colite alimentados com dieta padrão, em relação ao controle. O pré-tratamento com dieta rica em fibra não aumentou a concentração, dessa quimiocina, em relação ao grupo controle e encontra-se reduzida ao se comparar aos animais com colite alimentados com dieta padrão (Figura 11B).

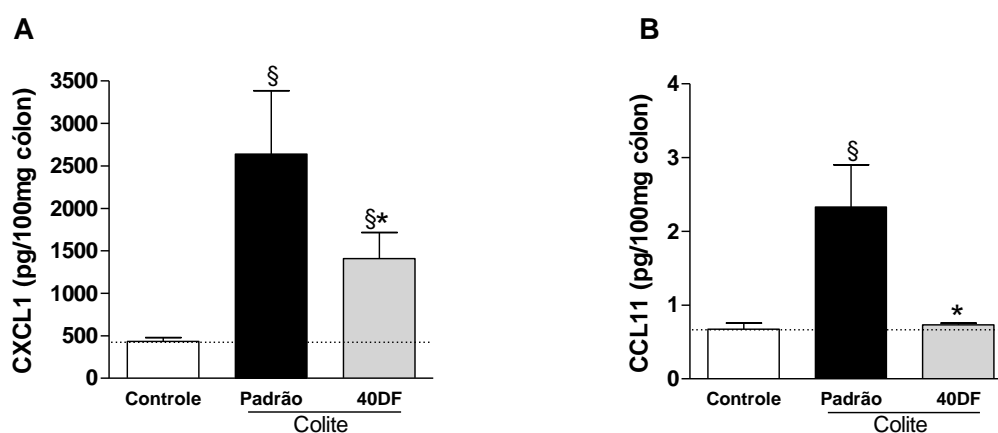


Figura 11. Avaliação de quimiocinas presente em amostras de cólon de animais com colite aguda induzida por DSS. (A) CXCL1 (KC), (B) CCL11 (eotaxina). Os resultados representam a média \pm EPM de cada grupo (n=3-6). § versus Controle; *versus Padrão; Controle: sem colite; Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; 40DF: pré-tratamento com dieta rica em fibra por 40 dias anteriores à indução de colite ($p < 0,05$).

Como pode ser observada, na Figura 12, as concentrações de TNF (A) e IL-10 (B) encontram-se elevadas no cólon dos animais submetidos à indução de colite. O pré-tratamento com fibra não alterou a concentração de ambas as citocinas em relação ao grupo colite alimentado com dieta padrão. A concentração de TGF β ativado apresentou-se similar em todos os grupos avaliados (Figura 12C).

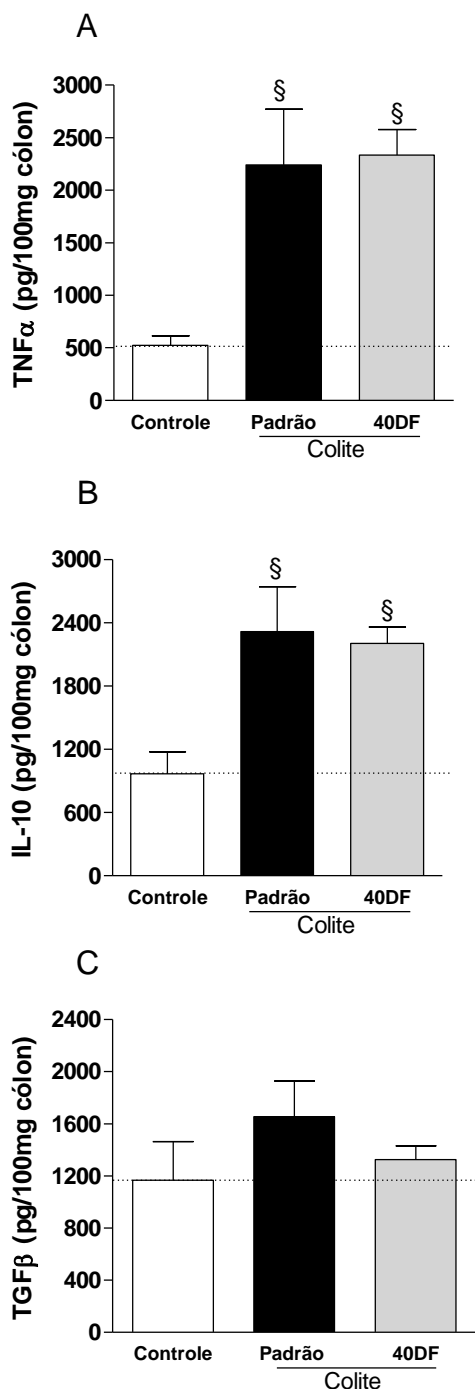


Figura 12. Avaliação de citocinas pró e anti-inflamatórias presentes na colite aguda induzida por DSS. Os resultados representam a média \pm EPM de cada grupo (n=3-5). § versus Controle. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; 40DF: animais com colite e submetidos a 40 dias de pré-tratamento com dieta rica em fibra ($p < 0,05$).

5.1.4 Efeito da dieta rica em fibra em comparação ao pré-tratamento com acetato

O acetato é o SCFA produzido em maior quantidade durante a fermentação da pectina. Objetivou-se avaliar o efeito da administração do acetato em comparação com o efeito da dieta rica em fibra e, também, verificar se haveria vantagem em fornecê-los em associação.

Animais com colite e alimentados com dieta padrão apresentaram escore clínico elevado, durante o período de indução de colite, em comparação aos animais controles. Nos grupos submetidos ao pré-tratamento com acetato ou com dieta rica em fibra, os animais apresentaram aumento significativo do escore clínico a partir do dia 4, enquanto no grupo com os dois pré-tratamentos apenas no dia 6, em relação ao controle (Figura 13A). As três intervenções realizadas como pré-tratamento reduziram o escore clínico em relação aos animais com colite alimentados com dieta padrão, com redução mais expressiva no grupo submetido aos dois pré-tratamentos, em associação, como pode ser observada pela AUC (topo da Figura 13A).

Os animais com colite alimentados com dieta padrão apresentaram perda de peso significativa em relação aos animais controles, apenas no último dia de indução de colite. O grupo pré-tratado com acetato apresentou peso semelhante ao controle durante toda a indução de colite e os animais com pré-tratamento com dieta rica em fibra ou em associação ao acetato apresentaram ganho de peso no sexto dia em relação aos controles (Figura 13B). Os animais submetidos ao pré-tratamento com fibra ou em associação ao pré-tratamento com acetato apresentaram peso superior aos animais colite alimentados com dieta padrão, todos os dias avaliados. Os animais submetidos a algum pré-tratamento (dieta ou acetato) apresentaram valores semelhantes aos animais controle em relação à AUC (Topo figura 13B).

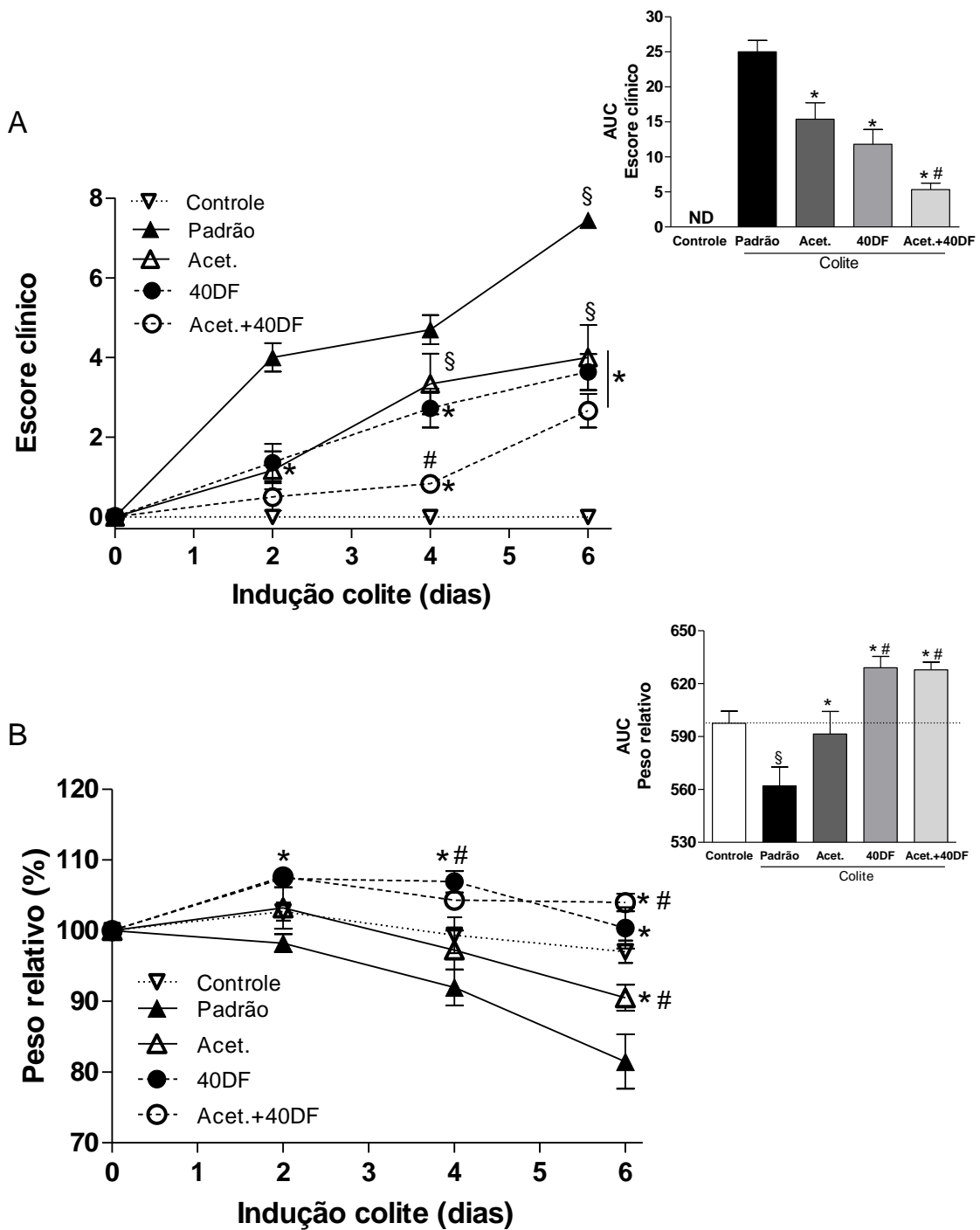


Figura 13. Acompanhamento dos sinais clínicos em animais, com colite aguda, submetidos a diferentes pré-tratamentos. (A) Acompanhamento da evolução dos sinais clínicos. (B) Acompanhamento da variação do peso dos animais. Análise estatística por AUC acima dos respectivos gráficos (n=6-9). §versus Controle; *versus Padrão; #versus Acetato. Padrão: animais com colite e alimentados com dieta padrão; Acet.: animais submetidos ao pré-tratamento com acetato anterior à indução de colite; 40DF: animais submetidos ao pré-tratamento por 40 dias com dieta rica em fibra, anteriores à indução de colite; Acet.+40DF: animais com colite submetidos ao pré-tratamento com acetato e dieta rica em fibra por 40 dias anteriores à indução de colite (p<0,05).

Nos cortes histopatológicos, pode-se observar que os animais com colite e alimentados com dieta padrão (Figura 14B) apresentaram destruição da mucosa com perda de criptas e intenso infiltrado de células inflamatórias (asteriscos) em relação aos animais do grupo controle (Figura 14A). Os animais com pré-tratamento com dieta rica em fibra e/ou acetato (Figura 14C-E) também apresentaram destruição da mucosa e infiltrado de leucócitos (asteriscos), mas, inferior aos animais com colite e alimentados com dieta padrão. As três intervenções utilizadas durante o experimento reduziram de forma significativa os valores dos escores histopatológicos em relação aos animais com colite e alimentados com dieta padrão (Figura 14F).

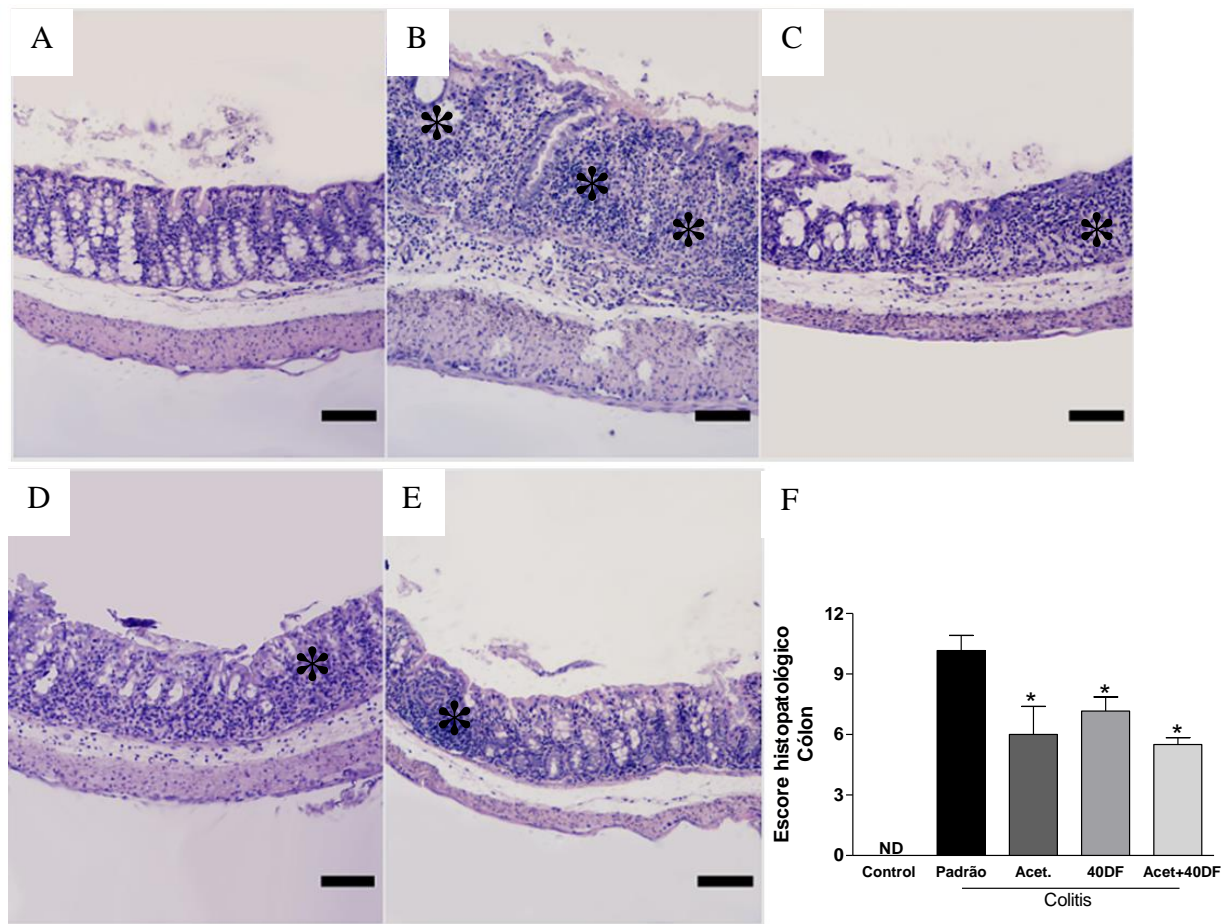


Figura 14. Corte histológico do cólon de animais com colite aguda induzida por DSS e comparação a animais submetidos a diferentes intervenções terapêuticas. (A) Mucosa normal de camundongo Balb/c controle. (B) Animal tratado com DSS com presença de importante infiltrado de células inflamatórias (asteriscos). (D) DSS + pré-tratamento com dieta rica em fibra por 40 dias anteriores à indução de colite. Asterisco: infiltrado inflamatório. (E) DSS + pré-tratamento com acetato anterior à indução de colite. Asterisco: infiltrado de células inflamatórias. (F) DSS + associação dos pré-tratamentos com dieta rica em fibra por 40 dias anteriores à indução de colite e acetato, menor inflamação e erosão epitelial (asterisco). A-E: $\times 100$; Barra=50 μm . (G) Escore histológico total (n=5). Padrão: animal com colite alimentado com dieta padrão; Acet.: animais com colite submetido ao pré-tratamento com acetato; 40DF: animais com colite submetidos a pré-tratamento com dieta rica em fibra por 40 dias anteriores à colite; Acet.+ 40DF: animais com colite submetidos ao pré-tratamento com acetato e dieta rica em fibra por 40 dias anteriores à indução de colite (p<0,05).

5.2 RESULTADOS PARTE II – COLITE CRÔNICA

5.2.1 Efeito da dieta rica em fibra em modelo experimental de colite crônica

Os resultados nesta seção se baseiam na avaliação do efeito da dieta rica em fibra como tratamento na colite crônica iniciado em diferentes períodos durante a colite experimental crônica, induzida por ciclos de DSS, em comparação ao pré-tratamento com a dieta.

Nos animais com colite e alimentados com dieta padrão ou com pré-tratamento com dieta rica em fibra a variação do peso corpóreo foi semelhante ao animal sem colite (Figura 15A). O início do tratamento com a dieta rica em fibra, no terceiro ciclo, não alterou o peso dos animais em relação ao controle (Figura 15B). Na AUC, apenas do quinto ciclo, observa-se que a variação do peso corporal nos grupos com tratamento com dieta rica em fibra iniciado no terceiro e quarto ciclo foram semelhantes aos valores dos grupos controle e colite, alimentados com dieta padrão, mas, diferente do grupo com pré-tratamento com a dieta rica em fibra. Já o tratamento iniciado no quinto ciclo, apresenta AUC inferior ao grupo controle e aos animais com colite e submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra.

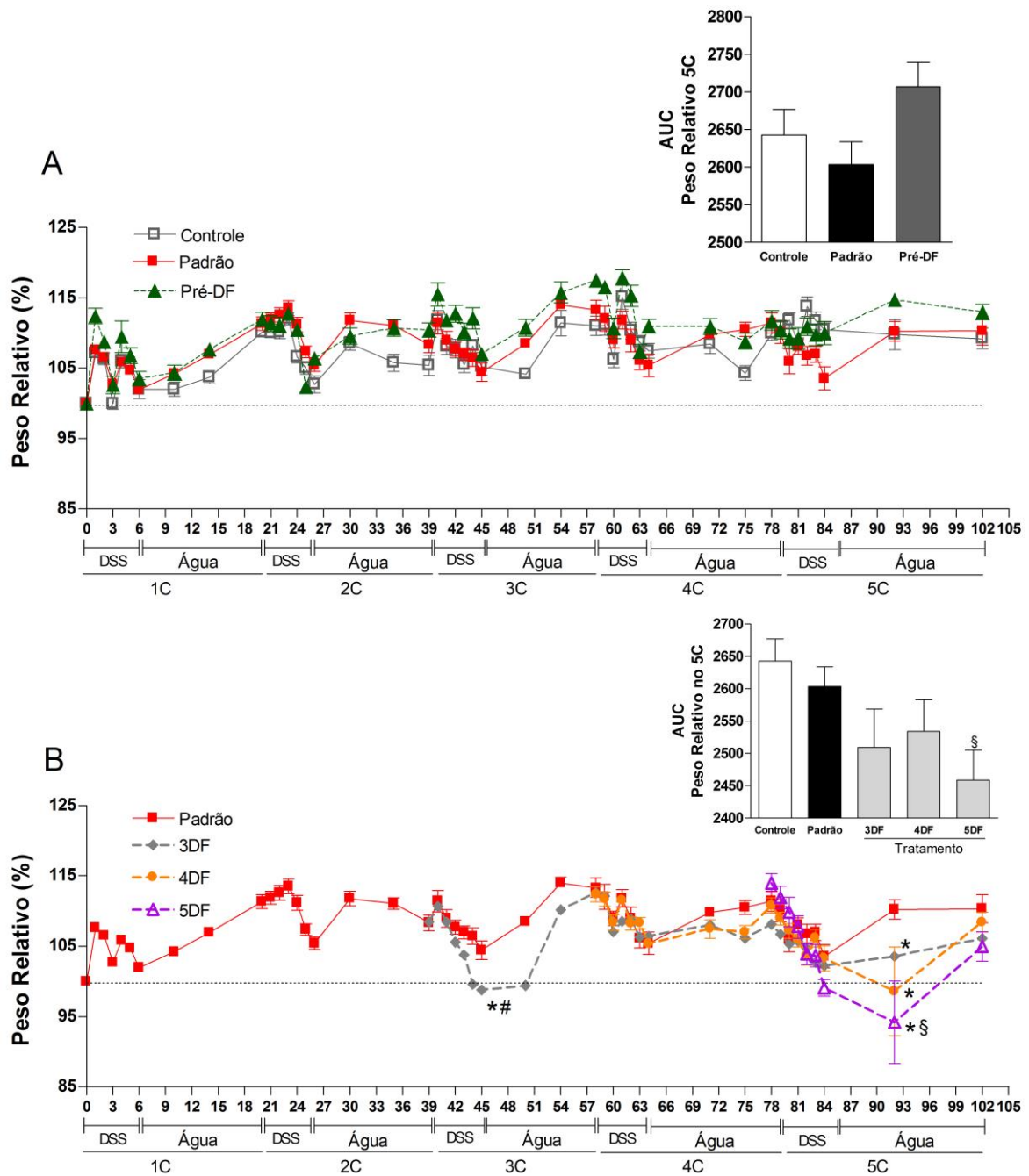


Figura 15. Acompanhamento do peso relativo de animais com colite crônica, induzida por DSS, e submetidos a diferentes intervenções terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra. (A) Peso relativo de animais controle (sem doença), animais com colite alimentados com dieta padrão e animais com colite submetidos ao pré-tratamento com DF. **(B)** Comparação do peso relativo dos grupos com colite alimentados com dieta padrão e tratados com DF com início no terceiro, quarto ou quinto ciclo (n=5-9). §versus Controle; *versus Pré-DF. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite e alimentados com dieta padrão; 3DF: colite início do tratamento com dieta rica em fibra no terceiro ciclo de DSS; 4DF: colite com início do tratamento com dieta rica em fibra no quarto ciclo de DSS; 5DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quinto ciclo de DSS (p<0,05).

Animais com colite alimentados com dieta padrão apresentaram aumento do escore clínico de forma progressiva durante a administração do DSS, sendo este minimizado, ao ser interrompido o fornecimento do agente lesivo (Figura 16). O pré-tratamento com dieta rica em fibra (em verde no gráfico) reduziu, de forma significativa, o escore clínico em todos os ciclos de administração de DSS (Figura 16A). Ao avaliar a AUC, apenas do quinto ciclo, o tratamento com a dieta rica em fibra não apresentou efeito positivo nesse parâmetro, sendo semelhante aos animais com colite alimentados com dieta padrão (Figura 16B) e, conseqüentemente, com valores superiores aos animais submetidos ao pré-tratamento com a dieta rica em fibra.

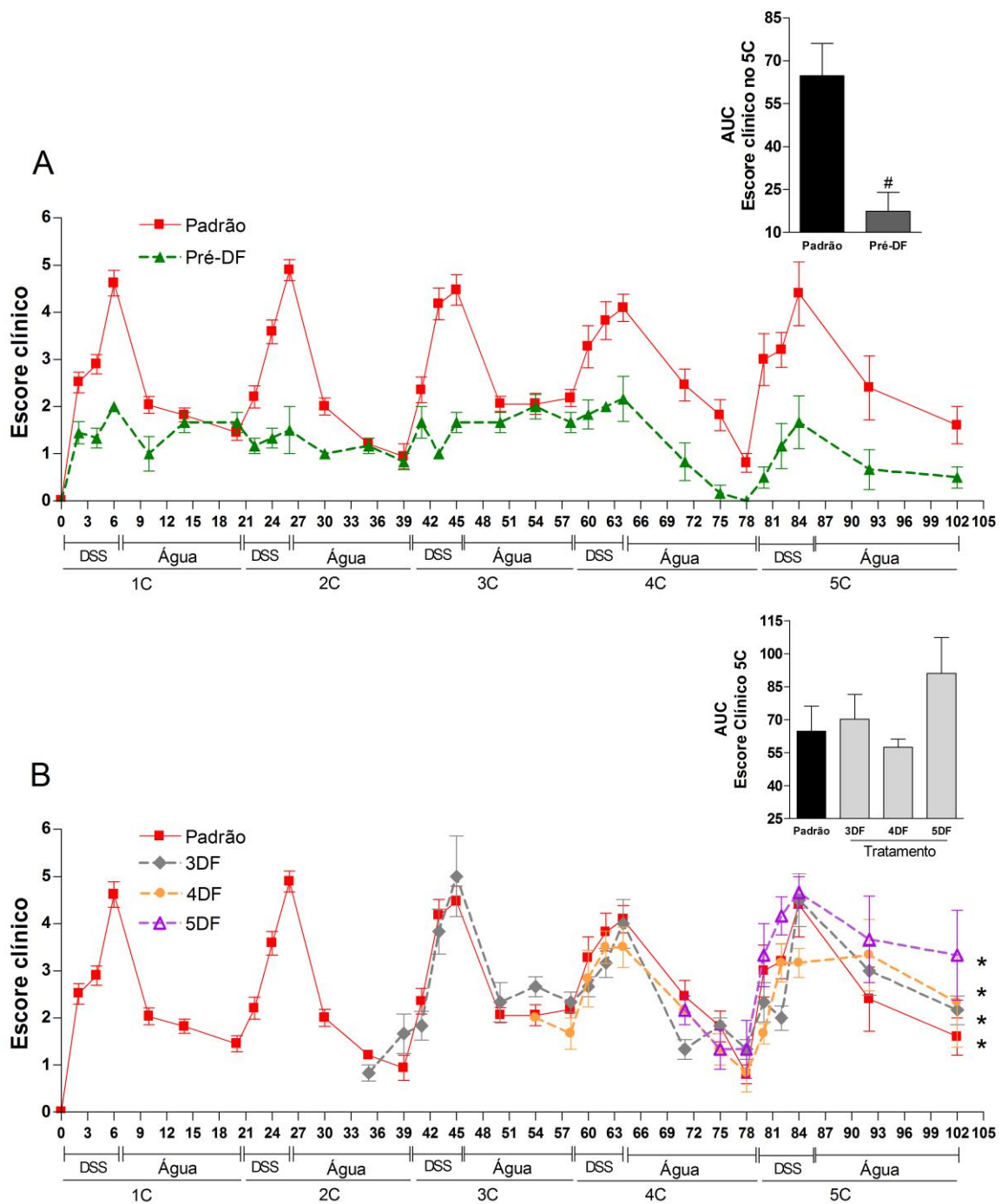


Figura 16. Acompanhamento da avaliação do escore clínico na colite crônica em animais submetidos a cinco ciclos de DSS e diferentes intervenções terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra. (A) Perfil do escore clínico na colite crônica ao se comparar animais com colite alimentados com dieta padrão ou colite e submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra. (B) Comparação do escore clínico entre animais que receberam tratamento com dieta rica em fibra e animais alimentados com dieta padrão (n=5-9) # versus Padrão; * versus Pré-DF. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite alimentados com dieta Padrão; Pré-DF: animais com colite e submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra; 3DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no terceiro ciclo de DSS; 4DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quarto ciclo de DSS; 5DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quinto ciclo de DSS (p<0,05).

Os animais com colite alimentados com dieta padrão, assim como os animais submetidos ao tratamento com dieta rica em fibra, apresentaram encurtamento do cólon em comparação aos animais controle. Animais com pré-tratamento com dieta rica em fibra apresentam comprimento do cólon semelhante aos animais controle (Figura 17A).

Os animais com colite alimentados com dieta padrão apresentaram importante elevação do peso do cólon em relação aos animais controle. Animais submetidos ao pré-tratamento ou tratamento com dieta rica em fibra apresentaram aumento do peso do cólon em relação ao grupo controle. Dentre os animais com colite, os animais submetidos ao pré-tratamento ou tratamento com dieta rica em fibra o peso do cólon foi inferior ao dos animais alimentados com dieta padrão (Figura 17B).

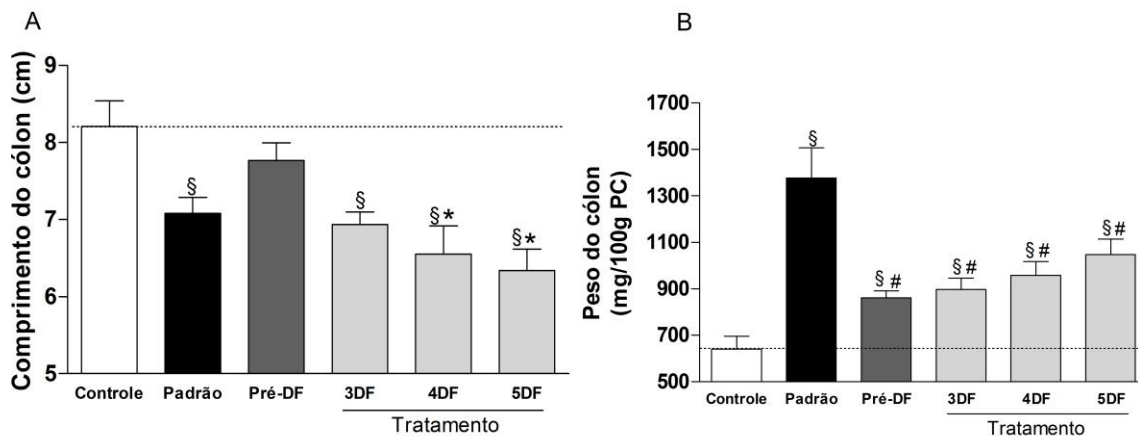


Figura 17. Avaliação do comprimento e peso do cólon, em animais com colite crônica, submetidos a cinco ciclos de DSS e diferentes intervenções terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra. (A) Comprimento do cólon (cm); (B) Peso do cólon ajustado pelo peso corporal (n=5-8). § versus Controle; * versus Pré-DF; # versus Padrão. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; Pré-DF: animais com colite e submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra; 3DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no terceiro ciclo de DSS; 4DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quarto ciclo de DSS; 5DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quinto ciclo de DSS (p<0,05).

Observa-se aumento na atividade da MPO em todos os grupos ao se comparar com o grupo controle, sem doença. (Figura 18A). Apesar de elevado os valores os resultados não foram estatísticos ao serem analisados por meio da One-way ANOVA com pós-teste *Newman-Keuls*.

A atividade da enzima EPO encontra-se elevada nos animais com colite alimentados com dieta padrão. Nos grupos que receberam pré-tratamento ou tratamento com dieta rica em fibra, os valores da EPO não alteraram em relação ao grupo controle. Dentre os grupos de animais com colite, a dieta rica em fibra utilizada como pré-tratamento ou tratamento reduziu a atividade da enzima relacionada à atividade dos eosinófilos ao se comparar com os animais com colite alimentados com dieta padrão (Figura 18B).

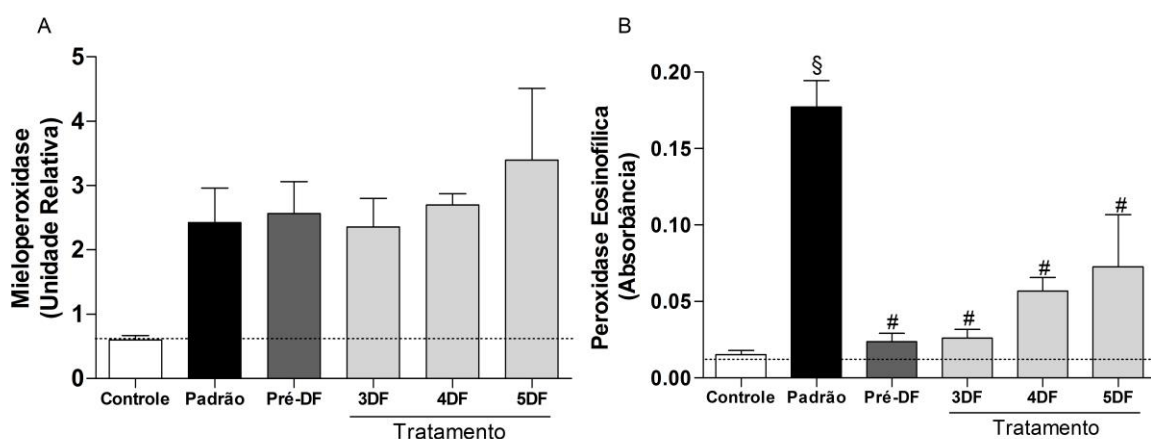


Figura 18. Avaliação das atividades das enzimas MPO e EPO no cólon de animais submetidos à colite crônica induzida por DSS e diferentes estratégias terapêuticas por meio do uso de dieta rica em fibra. (A) Quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO). (B) Quantificação da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) em animais com colite crônica, submetidos a cinco ciclos de DSS e diferentes intervenções terapêuticas (n=5-8). § versus Controle; # versus Padrão. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; Pré-DF: animais com colite e submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra; 3DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no terceiro ciclo de DSS; 4DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quarto ciclo de DSS; 5DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quinto ciclo de DSS ($p < 0,05$).

Conforme pode ser observado na Figura 19A, não é detectado aumento das concentrações de IL-6 no cólon dos animais com colite alimentados com dieta padrão ou tratados com dieta rica em fibra em comparação ao grupo controle. Nos animais pré-tratados com dieta rica em fibra, as concentrações de IL-6 encontram-se elevadas em relação ao controle e aos demais grupos com colite.

Na Figura 19B, não é observada diferença das concentrações de IL-10 entre os animais com colite alimentados com dieta padrão e os tratados com dieta rica em fibra em relação ao controle. Nos animais pré-tratados com dieta rica em fibra, as concentrações de IL-10 no tecido colônico encontram-se elevadas em relação ao controle e aos demais grupos de animais com colite.

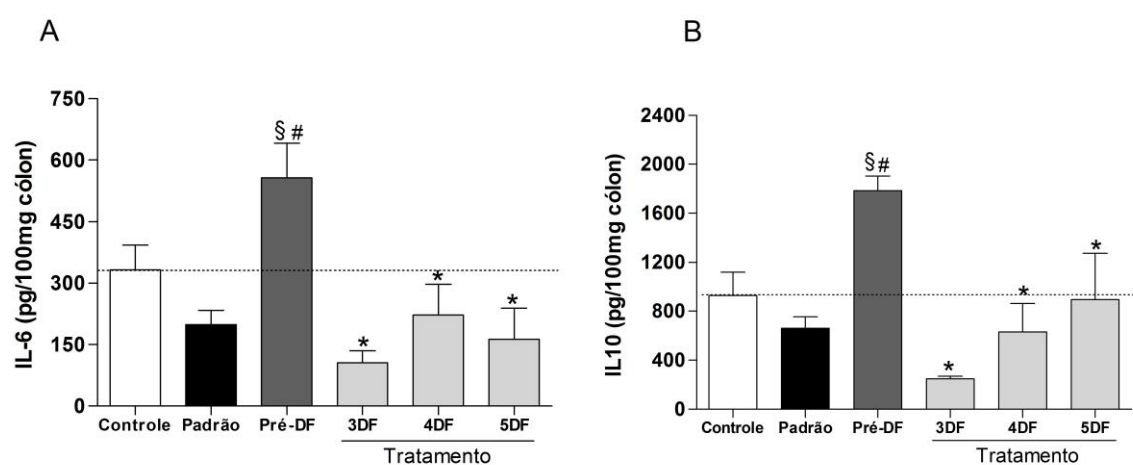


Figura 19. Efeito do pré-tratamento e tratamento com dieta rica em fibra nas concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 em amostras de cólon de animais com colite crônica. (A) Quantificação de IL-6 no tecido colônico. (B) Quantificação de IL-10 no tecido colônico (n=4-5). § versus Controle; # versus Padrão; * versus Pré-DF. Controle: sem colite; Padrão: animais com colite alimentados com dieta padrão; Pré-DF: animais com colite e submetidos ao pré-tratamento com dieta rica em fibra; 3DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no terceiro ciclo de DSS; 4DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quarto ciclo de DSS; 5DF: colite com início de tratamento com dieta rica em fibra no quinto ciclo de DSS ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

As IBDs são doenças crônicas com aumento na incidência mundial e importante impacto negativo na qualidade de vida das pessoas que as possuem. Os tratamentos estão em avanço, no entanto, apenas controlam a resposta inflamatória, com amenização dos sinais e dos sintomas associados às IBDs. Além disso, os tratamentos atuais apresentam importantes efeitos colaterais e, por esse motivo, possuem limitação de uso em longo prazo. O uso de prebiótico poderia ser uma alternativa ou, pelo menos, complemento aos tratamentos utilizados atualmente nas IBDs e o seu efeito benéfico, provavelmente atribuído à modulação da resposta inflamatória (Fernandez-Banares *et al.*, 1999; Kanauchi *et al.*, 2002; Hanai *et al.*, 2004). No presente estudo, o pré-tratamento com dieta rica em fibra atenuou a resposta inflamatória induzida por DSS, com melhora em sinais clínicos e redução de parâmetros inflamatórios, além de proteção aos animais da letalidade na colite aguda. Na colite crônica, o pré-tratamento com dieta rica em fibra manteve o efeito benéfico, no entanto, o uso da dieta como tratamento, com a doença já instalada, parece não exercer o mesmo efeito protetor nesse modelo de colite experimental.

Por meio das análises histológicas, pode-se verificar que a resposta inflamatória exacerbada, característica do modelo de colite induzida por DSS (Maslowski *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2009; Ayres *et al.*, 2012), destruiu a mucosa intestinal, com importante perda da estrutura colônica. Enquanto, nos animais que receberam pré-tratamento por 10, 20 ou 40 dias com dieta rica em pectina, a resposta inflamatória desencadeada pelo DSS apresentou-se atenuada, com melhora em parâmetros clínicos, inflamatórios e, conseqüentemente, histopatológicos existentes na colite. Esse último, parâmetro de forma significativa apenas nos tempos de pré-tratamento de 20 e 40 dias. Em conjunto, os efeitos atribuídos ao pré-tratamento com a fibra contribuíram para reverter à letalidade observada em animais com colite aguda alimentados com dieta padrão.

O período de pré-tratamento com dieta rica em fibra no modelo de colite aguda induzida por DSS, utilizado nesse trabalho, parece ser importante para exercer o efeito benéfico. O pré-tratamento por 10 dias demonstra efeitos positivos em relação à redução dos parâmetros clínicos (escore clínico, perda de peso), manutenção do comprimento colônico e redução da MPO. Tais efeitos são potencializados quando o pré-tratamento

ocorre por 20 e 40 dias, com redução também dos escores histopatológicos nesses dois últimos grupos. Provavelmente, esse período de fornecimento da dieta, anterior à indução da doença, seja necessário para maior ação na modulação do sistema imune. Estudos que demonstram o efeito benéfico da fibra exibem modelos experimentais com fornecimento desse componente alimentar por períodos variáveis, com até quatro semanas de fornecimento (Andoh *et al.*, 1999; Kanauchi *et al.*, 2002; Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002; Kirat *et al.*, 2009). Essa variação dos períodos de fornecimento da fibra se deve, provavelmente, pela variabilidade do tipo de fibra alimentar, ou mesmo o modelo experimental utilizado para o desenvolvimento da IBD.

A fibra alimentar tem sido associada como componente da alimentação capaz de exercer efeitos anti-inflamatórios, com resultados promissores na redução da inflamação e da lesão colônica, em modelos experimentais de colite (Videla *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2002; Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002; Galvez *et al.*, 2005; Popov *et al.*, 2006), e com provável efeito na colite ulcerativa em humanos, em estudos clínicos (Fernandez-Banares *et al.*, 1999; Kanauchi *et al.*, 2002; Hanai *et al.*, 2004). No entanto, não são todos os tipos de fibra alimentar que são capazes de exercerem efeito protetor na colite experimental. O uso de fruto-oligossarídeos, um tipo de fibra alimentar, não melhorou a inflamação induzida pela administração de DSS (Moreau *et al.*, 2003; Geier *et al.*, 2007) e, inclusive, demonstrou piora em alguns parâmetros inflamatórios, como aumento no escore clínico e na atividade da MPO no cólon dos animais (Geier *et al.*, 2007). Esses resultados, em conjunto, indicam que o tipo da fibra alimentar é relevante para as análises dos seus potenciais efeitos como uso terapêutico nas IBD (Moreau *et al.*, 2003; Galvez *et al.*, 2005).

Os efeitos fisiológicos da fibra alimentar vêm principalmente por meio de moléculas produzidas durante a sua fermentação, pela microbiota intestinal, e que exercem efeitos benéficos aos indivíduos que a ingere. Entre as fibras alimentares solúveis, a pectina apresenta a taxa de fermentação mais rápida (Kirat *et al.*, 2009) e parece ser completamente fermentada no intestino (Cummings *et al.*, 1979). A fermentação anaeróbica dessa fibra resulta na produção de SCFA, que regulam o pH intestinal, são substratos energéticos para as células epiteliais intestinais, estimulam a produção de muco e o sistema imune (Dongowski *et al.*, 2000; Kirat *et al.*, 2009). Pectina ou dietas contendo pectina apresentam diversos efeitos fisiológicos, entre eles redução de colesterol sérico, aumento da excreção fecal de esteroides, interação com

metais e ácidos biliares, e excreção desses (Dongowski *et al.*, 2000), além de redução de tumor colônico (Ohkami *et al.*, 1995). Em condições fisiológicas, exerce efeito trófico em células epiteliais intestinais e estimula a secreção de hormônio intestinal (Andoh *et al.*, 1999). O uso dessa fibra na IBD é pouco estudada e Popov *et al.*, (2006) e Chandrakesan *et al.*, (2012) demonstraram que o fornecimento da pectina foi capaz de atenuar a resposta inflamatória na colite. Segundo Popov *et al.*, (2006) a pectina reduziu o recrutamento de células inflamatórias, aumentou a produção de muco e reduziu o estresse oxidativo no cólon dos animais com colite induzida por ácido acético. Já Chandrakesan *et al.*, (2012), além de identificarem redução no recrutamento de células inflamatórias, observaram redução na concentração de citocinas/quimiocinas como IL-1 β , MCP-1, G-CSF em modelo experimental de colite induzida por infecção de *Citrobacter rodentium*.

Diversos fatores podem estar envolvidos na proteção à colite aguda exercida pelo pré-tratamento com dieta rica em fibra no presente trabalho e a redução de neutrófilos, indicada pela redução na atividade da MPO, no sítio inflamatório poderia ser um desses fatores contribuintes, visto que a atividade dessa enzima é parâmetro utilizado para a avaliação da presença de neutrófilos no sítio inflamado (Han *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2009). Durante a fase ativa da colite intenso infiltrado de linfócitos, macrófagos e polimorfonuclear (PMN) é observado no cólon. Após a ativação, essas células liberam mediadores nocivos incluindo proteases, citocinas e radicais livres, resultando em edema e, inclusive, ulceração extensa da mucosa (Vong *et al.*, 2012). Por esse motivo, a redução de neutrófilos no sítio inflamatório é estratégia interessante, visto que têm sido associados como as principais células efetoras que promovem lesão e perda da função do cólon nas IBDs (Williams e Parkos, 2007). Outros trabalhos que utilizaram diferentes tipos de fibra alimentar (Rodriguez-Cabezas *et al.*, 2002; Geier *et al.*, 2007) ou pectina (Popov *et al.*, 2006; Chandrakesan *et al.*, 2012), com atenuação da lesão colônica, também demonstraram redução da atividade da MPO. Além disso, no atual trabalho, foi observada redução da concentração de quimiocina CXCL1, responsável pelo recrutamento de neutrófilos no cólon de animais alimentados com pectina, assim como Chandrakesan *et al.*,(2012) detectaram em seu trabalho. A dieta rica em fibra, como pré-tratamento na colite aguda, também reduziu as concentrações de CCL11, quimiocina relacionada ao recrutamento de eosinófilos, que é observada elevada na colite induzida por DSS (Vieira *et al.*, 2009). Como resultado, menor

concentração de EPO foi detectada no cólon dos animais pré-tratados com a dieta rica em fibra quando comparado ao grupo colite dieta padrão.

Conforme abordado anteriormente, o efeito positivo da fibra alimentar poderia ser devido a sua capacidade de ser fermentada pela microbiota intestinal e produção de SCFA com propriedades anti-inflamatórias e/ou imunomodulatórias. O acetato é o SCFA produzido em maior quantidade durante a fermentação da fibra dietética no cólon (Macfarlane e Macfarlane, 2003) e, conforme descrito na literatura, possui atividade anti-inflamatória, além de melhorar parâmetros clínicos e inflamatórios na colite induzida por DSS, por meio da ligação ao receptor GPR43 (Maslowski *et al.*, 2009). Tal fato corrobora com os resultados também demonstrados no presente trabalho, em que animais com colite aguda e pré-tratados com acetato apresentaram redução no escore clínico, na perda de peso e no escore histopatológico, em comparação aos animais com colite, sem nenhuma intervenção terapêutica. Ao comparar os efeitos da dieta rica em fibra com os do acetato, pode-se verificar que a fibra fornecida sem a administração do ácido graxo foi capaz de apresentar efeito semelhante nos parâmetros clínicos e histopatológicos e a associação dos dois apresentou efeito potencializado apenas em relação ao escore clínico avaliado. Esse melhor efeito, ocasionado pela associação dos dois pré-tratamentos, pode ser porque a ação da dieta rica em fibra estaria em parte, desencadeada pela produção de acetato, uma vez que durante a fermentação da pectina acredita-se ser esse o SCFA produzido prioritariamente. No entanto, outros SCFA também podem ser produzidos, como o propionato e o butirato, em menor quantidade (Dongowski *et al.*, 2000; Macfarlane e Macfarlane, 2003) e atuarem beneficemente no cólon com efeitos também anti-inflamatórios e vias diferentes de atuação (Venkatraman *et al.*, 2000; Moreau *et al.*, 2003; Uchida e Mogami, 2005; Fava e Danese, 2011; Hering *et al.*, 2012).

Poucos estudos foram realizados utilizando o propionato, *in vitro*, parece que apresenta efeito anti-inflamatório, por meio da redução da produção de substâncias inflamatórias (Tedelind *et al.*, 2007). E *in vivo*, o propionato apresentou efeito trófico e favoreceu a cicatrização em modelo de colite induzida por TNBS (Uchida e Mogami, 2005).

Já o butirato, além de ser fonte energética dos colonócitos, apresenta claramente efeito citoprotetor em células epiteliais colônicas na colite induzida por DSS, detectado por aumento na viabilidade celular e redução na permeabilidade da mucosa, o que

contribui para a redução da inflamação intestinal (Venkatraman *et al.*, 2000). Essa proteção da integridade da mucosa é devido ao aumento na produção de muco, inibição de citocinas pró-inflamatórias e influencia na produção das proteínas *tight junction* (Moreau *et al.*, 2003; Fava e Danese, 2011; Hering *et al.*, 2012), além de seu papel na regulação e diferenciação celular das células epiteliais colônicas (Wong *et al.*, 2006).

Com o objetivo de avaliar o efeito da dieta rica em fibra como tratamento na IBD, foi utilizado modelo de colite crônica induzida por DSS (Okayasu *et al.*, 1990). E, para isso, a dieta rica em fibra foi introduzida em diferentes momentos durante a evolução da doença nos animais. Além disso, a avaliação do efeito da dieta rica em fibra em outra situação de resposta inflamatória seria interessante, visto que na colite aguda a imunidade adaptativa parece não exercer papel relevante, mas acredita-se que os linfócitos participam da inflamação crônica induzida por DSS (Dieleman *et al.*, 1998; Melgar *et al.*, 2005), também detectado na padronização do modelo experimental crônico, quanto à resposta inflamatória, utilizado no presente trabalho (Apêndice A).

O uso da dieta rica em fibra, no modelo experimental crônico, apresentou resultados satisfatórios como pré-tratamento: reduziu o escore clínico, observado na colite, protegeu contra o encurtamento colônico, mas não foi evitou o aumento do peso do cólon, assim como o tratamento com a fibra. Provavelmente, por ainda existir inflamação no tecido colônico. Além disso, uma das características da colite induzida por DSS, em BALB/c, é que com a suspensão do agente químico, os animais tendem a melhorar o estado clínico, inicialmente, mas a inflamação perdura no intestino por mais tempo. Segundo Melgar *et al.*, (2005), a recuperação total da resposta inflamatória seria em torno de 4 semanas após a remoção do DSS.

A utilização da dieta rica em fibra como tratamento, com a doença já estabelecida, não apresentou os efeitos benéficos semelhantes aos encontrados pelo pré-tratamento. Provavelmente porque a fibra ao atingir o intestino dos animais não consiga exercer sua ação de modulação no sistema imune, visto que o órgão encontra-se alterado tanto pela inflamação, quanto em relação à microbiota intestinal. Na colite induzida por DSS é observada redução na variedade microrganismos em relação aos animais controle (Nagalingam *et al.*, 2011) e esse fator poderia contribuir para a redução da fermentação da pectina e atenuar a sua ação benéfica na colite. Dessa forma, provavelmente o fornecimento da dieta rica em fibra em associação a um probiótico, denominado simbiótico, poderia melhorar o efeito da dieta rica em fibra como tratamento, visto que

estudos com simbiótico tem demonstrado efeito positivo em diversas situações de doença (Vyas e Ranganathan, 2012). No tratamento com a fibra, os animais apresentaram escore clínico e encurtamento colônico semelhantes aos animais com colite alimentados com dieta padrão. O peso nesse modelo experimental, diferente do modelo agudo, não apresentou grande importância e correlação com a resposta inflamatória. E a perda de peso significativa no grupo de animais, com tratamento iniciado no terceiro e no quinto ciclo de DSS, em relação aos animais controle, pode ter sido influenciada em grande parte pelo início de nova dieta, visto que os animais com colite, sem nenhuma intervenção terapêutica, não apresentaram perda de peso relevante nesse modelo.

Em relação à atividade da EPO, o uso da dieta rica em pectina, como tratamento ou pré-tratamento, foi capaz de reduzir a atividade dessa enzima, em relação aos animais com colite alimentados com dieta padrão. Durante a padronização do modelo crônico (Apêndice A), elevação dos níveis de EPO é observada apenas no grupo de animais submetidos a cinco ciclos de DSS. Apesar de os eosinófilos serem encontrados fisiologicamente no intestino, residentes na lâmina própria, durante o processo inflamatório (inclusive nas IBDs) essas células aumentam de maneira acentuada e contribuem para a resposta inflamatória (Lampinen *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2009; Jacobsen *et al.*, 2012), mas, representam apenas pequeno percentual dos leucócitos totais infiltrados (Hogan *et al.*, 2013). Na asma, os níveis de eosinófilo atuam como biomarcador associado à gravidade da doença e, no TGI, está correlacionado a alterações morfológicas e disfunções gastrointestinais importantes (Hogan *et al.*, 2013). Além disso, tem sido observado que na colite a atividade dos eosinófilos é ainda maior durante a fase inativa da doença (Lampinen *et al.*, 2005), o que poderia indicar papel na resolução da inflamação e do reparo do dano tecidual intestinal (Lampinen *et al.*, 2005; Jacobsen *et al.*, 2012).

A exposição do DSS está associada à redução de microrganismos benéficos à mucosa intestinal (Nagalingam *et al.*, 2011) e algumas evidências sugerem que os eosinófilos poderiam ter papel em combater microrganismos da microbiota e infecção em doenças como IBD (Hogan *et al.*, 2013), dessa forma, o aumento no número dessas células poderia ser benéfico no quinto ciclo de exposição ao DSS. Isso porque os eosinófilos são células que apresentam expressão de vários receptores de reconhecimento padrão, que permitem o reconhecimento de antígenos bacterianos, além

de produzirem potentes substâncias antibactericidas e poderem atuar como APC aumentando a resposta imune específica. Algumas evidências sugerem que nas IBDs os eosinófilos possuem dupla função (Hogan *et al.*, 2013) de contribuir para a resposta inflamatória inicial (Vieira *et al.*, 2009), mas também de homeostase por combater patógenos (Hogan *et al.*, 2013). Dessa forma, a elevação da EPO no grupo colite alimentado com dieta padrão, no presente estudo, poderia indicar presença de intensa resposta inflamatória no momento avaliado. Enquanto a redução da EPO, nos animais alimentados com a dieta rica em fibra, poderia indicar antecipação do restabelecimento da homeostase tecidual, que poderia ser benéfico, visto que o excesso de eosinófilos durante o reparo tecidual também gera danos que levam a perda da função tecidual, uma vez que essas células têm sido relacionadas à ativação de fibroblastos (Hogan *et al.*, 2013).

A dieta rica em fibra como pré-tratamento elevou as concentrações da citocina IL-6 no cólon dos animais. Essa é citocina multifuncional importante na resposta imune, sobrevivência celular, apoptose e proliferação, e o seu aumento estaria relacionado à regeneração tissular em células epiteliais intestinais (Kishimoto, 2006; Grivennikov *et al.*, 2009). Apesar de todas essas funções importantes para a homeostase intestinal, a IL-6 quando elevada por longos períodos pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes (Kishimoto, 2006; Neurath e Finotto, 2011) e exerce papel na proteção contra apoptose das células pré-neoplásicas (Grivennikov, 2012). Em modelo de colite por transferência de células T a IL-6 é a citocina que contribui para a indução da colite (Feng *et al.*, 2010), além de aumentar a permeabilidade intestinal (Suzuki *et al.*, 2011). Dessa forma, mais avaliações a respeito de sua ação no modelo de colite, no presente trabalho, deverá ser realizada visto que a verificação de sua concentração ocorre em apenas um momento, duas semanas após a administração de DSS do último ciclo e parece que o seu aumento foi benéfico, visto que animais que apresentaram elevação em sua concentração apresentavam os melhores sinais clínicos.

Além da IL-6, outra citocina que se encontrou elevada na colite crônica, nos animais com pré-tratamento com dieta rica em fibra, foi a IL-10, essa citocina apresenta atividade anti-inflamatória e, provavelmente, possui papel importante no processo resolutivo. A IL-10 é citocina bastante importante para a homeostase intestinal e animais que são *knockout*, para IL-10, desenvolvem colite espontaneamente (Davidson

et al., 1998; Lindsay *et al.*, 2002; Gomes-Santos *et al.*, 2012). É uma citocina que influencia a resposta imune inata e adaptativa e limita a produção de citocinas pró-inflamatórias com o objetivo de prevenir dano tissular. A desregulação na produção de IL-10 resulta em inflamação e doença autoimune (Hofmann *et al.*, 2012). É produzida por ampla variedade de células entre elas as Treg, células epiteliais da mucosa, macrófagos ativados, células dendríticas e células B1 (Gomes-Santos *et al.*, 2012). E o aumento na produção dessa citocina pode ser influenciada por proteína com potente atividade anti-inflamatória a anexina A1 (AnxA1) (Babbin *et al.*, 2008; Vong *et al.*, 2012). Dados indicam forte evidência de que AnxA1 seja mediador da resolução da inflamação, também, por promover a apoptose de neutrófilos (Vago *et al.*, 2012). Babbin *et al.*, (2008) demonstraram importante papel da AnxA1, na cicatrização de lesão colônica aguda por DSS e animais *knockout* para essa proteína demonstraram aumento na susceptibilidade da colite, nesse modelo.

Outros mediadores, de origem lipídica, influenciam a resolução da inflamação, por exemplo, a lipoxina A4 (LXA4) que se liga ao mesmo receptor da AnxA1. Uma das ações desse mediador lipídico é por meio da inibição da adesão e da transmigração de eosinófilo e neutrófilo, e como a dieta rica em fibra reduziu esses dois parâmetros, neutrófilo na colite aguda e eosinófilo na colite crônica o aumento na expressão desse mediador poderia contribuir para o melhor estado clínico nesses animais. Além disso, tem sido observado aumento na biossíntese de LX4A em pacientes com UC e sua produção foi capaz de acelerar a resolução em modelo de colite em camundongos (Vong *et al.*, 2012).

A resposta imunológica exacerbada durante a colite pode, em parte, ser influenciada por desequilíbrio da microbiota intestinal. Segundo Nagalingam *et al.*,(2011) a administração de DSS está associado com alterações na diversidade microbiana intestinal e, essas alterações, aparecem anteriormente ao desenvolvimento de inflamação grave no cólon. A microbiota em homeostase é fundamental para a resposta imune adequada, por estar em contato com as células epiteliais, auxilia na síntese de peptídeos antimicrobianos bem como produz substâncias com efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo (Turnbaugh *et al.*, 2007; Mazmanian *et al.*, 2008; Maslowski *et al.*, 2009).

Como a dieta apresenta papel fundamental na modulação da microbiota intestinal (Ley *et al.*, 2006; De Filippo *et al.*, 2010; Maslowski e Mackay, 2011) e como

esta se encontra alterada nas IBDs (Sartor, 2006; Feng *et al.*, 2010), dieta rica em polissacarídeos proveniente dos vegetais, poderia selecionar as bactérias produtoras de SCFA (principal produto final do metabolismo anaeróbico bacteriano no intestino grosso) e essa seleção poderia prevenir o estabelecimento de microrganismos patogênicos (Maslowski *et al.*, 2009). Em pacientes com IBD, observa-se redução na proporção dos *Bacteroidetes* e estas bactérias são as maiores produtoras de SCFA (Maslowski e Mackay, 2011). A ação direta desses ácidos graxos é por meio da redução do pH o que poderia inibir a ação de bactérias redutoras de sulfato, que apresentam melhor atividade em pH mais elevados e que geram substâncias potencialmente tóxicas ao hospedeiro (Moreau *et al.*, 2003). Além desse efeito, os SCFA apresentam efeito anti-inflamatório e a modulação da microbiota poderia favorecer a maior produção desses compostos, o que poderia contribuir para a minimização da resposta inflamatória observada nos resultados encontrados.

Devido à possibilidade de diversos fatores contribuírem para a ação benéfica da dieta rica em fibra no atual trabalho, mais experimentos são necessários para a verificação da real contribuição do acetato ou outro SCFA, ou mesmo outra via, na atenuação da resposta inflamatória nos animais submetidos ao pré-tratamento com a pectina na colite experimental induzida por DSS.

7. CONCLUSÃO

A dieta rica em fibra, pectina, mostrou ser protetora como pré-tratamento, na colite induzida por DSS, por melhorar parâmetros clínicos, inflamatórios e histopatológicos na colite, além de proteger os animais da letalidade observada nesse modelo experimental. O seu efeito, na colite aguda, foi similar ao efeito do acetato que já apresenta conhecida atividade anti-inflamatória e efeito protetor na colite induzida por DSS. Já o uso da dieta rica em fibra como tratamento, na inflamação intestinal crônica, induzida por ciclos de administração de DSS, foi menos eficaz. A ineficácia do tratamento poderia indicar que o uso da fibra alimentar atuaria melhor como forma de prevenção das IBDs, visto que essas doenças apresentam importantes influencia de fatores ambientais, entre eles a alimentação, para o seu desencadeamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOH, A.; BAMBA, T.; SASAKI, M. Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 23, n. 5 Suppl, p. S70-3, Sep-Oct 1999.

ASSEMAN, C. et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J Exp Med**, v. 190, n. 7, p. 995-1004, Oct 4 1999.

AYRES, J. S.; TRINIDAD, N. J.; VANCE, R. E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 799-806, May 2012.

BABBIN, B. A. et al. Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 5035-44, Oct 1 2008.

BAUER, H. et al. The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. **Am J Pathol**, v. 42, p. 471-83, Apr 1963.

BENSON, A. et al. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, n. 1, p. 7-12, Jan 2008.

BISCHOFF, S. C. et al. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. **Histopathology**, v. 28, n. 1, p. 1-13, Jan 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 861, de 04 de novembro de 2002. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Retocolite Ulcerativa., 2002.

_____. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 858, de 04 de novembro de 2002. Institui o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas na Doença de Crohn. . 2010. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_doenca_de_crohn.pdf>. Acesso em: nov 11.

BRASIL, A. N. D. V. S. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. . 2008. Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 07/15.

BROWN, A. J. et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. **J Biol Chem**, v. 278, n. 13, p. 11312-9, Mar 28 2003.

CHANDRAKESAN, P. et al. Distinct compartmentalization of NF-kappaB activity in crypt and crypt-denuded lamina propria precedes and accompanies hyperplasia and/or colitis following bacterial infection. **Infect Immun**, v. 80, n. 2, p. 753-67, Feb 2012.

CHAPMAN, M. A. et al. Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. **Gut**, v. 35, n. 1, p. 73-6, Jan 1994.

CUMMINGS, J. H. et al. The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. **Br J Nutr**, v. 41, n. 3, p. 477-85, May 1979.

DAVIDSON, N. J. et al. IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 3143-9, Sep 15 1998.

DE CASSAN, C.; FIORINO, G.; DANESE, S. Second-generation corticosteroids for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis: more effective and less side effects? **Dig Dis**, v. 30, n. 4, p. 368-75, 2012.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 33, p. 14691-6, Aug 17 2010.

DIELEMAN, L. A. et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. **Clin Exp Immunol**, v. 114, n. 3, p. 385-91, Dec 1998.

DONGOWSKI, G.; LORENZ, A.; ANGER, H. Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 4, p. 1321-7, Apr 2000.

DUCHMANN, R. et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). **Clin Exp Immunol**, v. 102, n. 3, p. 448-55, Dec 1995.

ELSON, C. O. et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 1344-67, Oct 1995.

FAVA, F.; DANESE, S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 5, p. 557-66, Feb 7 2011.

FENG, T.; ELSON, C. O.; CONG, Y. Microbiota: dual-faceted player in experimental colitis. **Gut Microbes**, v. 1, n. 6, p. 388-91, Nov-Dec 2010.

FERNANDEZ-BANARES, F. et al. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 2, p. 427-33, Feb 1999.

FIELDS, S. et al. Rectal strictures in Crohn's disease and coexisting perirectal complications. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, n. 1, p. 29-31, Jan 2008.

FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 10, p. 577-89, Oct 2012.

FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 34, p. 13780-5, Aug 21 2007.

FUKUDA, M. et al. Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. **Int J Mol Med**, v. 9, n. 1, p. 65-70, Jan 2002.

FUKUDA, S. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 543-7, Jan 27 2011.

FUSS, I. J. et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. **J Immunol**, v. 157, n. 3, p. 1261-70, Aug 1 1996.

GALVEZ, J.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; ZARZUELO, A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. **Mol Nutr Food Res**, v. 49, n. 6, p. 601-8, Jun 2005.

GEIER, M. S. et al. Prebiotic and synbiotic fructooligosaccharide administration fails to reduce the severity of experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum**, v. 50, n. 7, p. 1061-9, Jul 2007.

GIONCHETTI, P. et al. Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 21, p. 3306-13, Jun 7 2006.

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. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 560817, 2012.

GRIVENNIKOV, S. et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, p. 103-13, Feb 3 2009.

GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. **Semin Immunopathol**, Nov 16 2012.

HALFVARSON, J. et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1767-73, Jun 2003.

HAN, S. et al. Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. **Regul Pept**, v. 142, n. 3, p. 131-7, Aug 16 2007.

HANAI, H. et al. Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. **Int J Mol Med**, v. 13, n. 5, p. 643-7, May 2004.

HART, A. L. et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 129, n. 1, p. 50-65, Jul 2005.

HERING, N. A.; FROMM, M.; SCHULZKE, J. D. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. **J Physiol**, v. 590, n. Pt 5, p. 1035-44, Mar 1 2012.

HOFMANN, S. R. et al. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. **Clin Immunol**, v. 143, n. 2, p. 116-27, May 2012.

HOGAN, S. P.; WADDELL, A.; FULKERSON, P. C. Eosinophils in infection and intestinal immunity. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 29, n. 1, p. 7-14, Jan 2013.

JACOBSEN, E. A. et al. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. **Blood**, v. 120, n. 19, p. 3882-90, Nov 8 2012.

KANAUCHI, O. et al. Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. **J Gastroenterol**, v. 37 Suppl 14, p. 67-72, Nov 2002.

KIRAT, D. et al. Dietary pectin up-regulates monocarboxylate transporter 1 in the rat gastrointestinal tract. **Exp Physiol**, v. 94, n. 4, p. 422-33, Apr 2009.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis Res Ther**, v. 8 Suppl 2, p. S2, 2006.

KOMIYAMA, Y. et al. Prebiotic treatment in experimental colitis reduces the risk of colitic cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 8, p. 1298-308, Aug 2011.

LAMPINEN, M. et al. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. **Gut**, v. 54, n. 12, p. 1714-20, Dec 2005.

LAMPINEN, M. et al. Accumulation, activation, and survival of neutrophils in ulcerative colitis: regulation by locally produced factors in the colon and impact of steroid treatment. **Int J Colorectal Dis**, v. 23, n. 10, p. 939-46, Oct 2008.

LE POUL, E. et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. **J Biol Chem**, v. 278, n. 28, p. 25481-9, Jul 11 2003.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022-3, Dec 21 2006.

LINDSAY, J. et al. IL-10 gene therapy prevents TNBS-induced colitis. **Gene Ther**, v. 9, n. 24, p. 1715-21, Dec 2002.

LOUIS, E. Epidemiology of the transition from early to late Crohn's disease. **Dig Dis**, v. 30, n. 4, p. 376-9, 2012.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc Nutr Soc**, v. 62, n. 1, p. 67-72, Feb 2003.

MAHLER, M. et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. **Am J Physiol**, v. 274, n. 3 Pt 1, p. G544-51, Mar 1998.

MANNON, P. J. et al. Excess IL-12 but not IL-23 accompanies the inflammatory bowel disease associated with common variable immunodeficiency. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 748-56, Sep 2006.

MARTINS, F. S. et al. Comparative study of Bifidobacterium animalis, Escherichia coli, Lactobacillus casei and Saccharomyces boulardii probiotic properties. **Arch Microbiol**, v. 191, n. 8, p. 623-30, Aug 2009.

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

MASLOWSKI, K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282-6, Oct 29 2009.

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 107-18, Jul 15 2005.

MAZMANIAN, S. K.; ROUND, J. L.; KASPER, D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 620-5, May 29 2008.

MELGAR, S.; KARLSSON, A.; MICHAELSSON, E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, n. 6, p. G1328-38, Jun 2005.

MEYER, D.; STASSE-WOLTHUIS, M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. **Eur J Clin Nutr**, v. 63, n. 11, p. 1277-89, Nov 2009.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 46-54 e42; quiz e30, Jan 2012.

MOREAU, N. M. et al. Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Br J Nutr**, v. 90, n. 1, p. 75-85, Jul 2003.

MOTTET, C.; UHLIG, H. H.; POWRIE, F. Cutting edge: cure of colitis by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **J Immunol**, v. 170, n. 8, p. 3939-43, Apr 15 2003.

MUZES, G. et al. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 41, p. 5848-61, Nov 7 2012.

NAGALINGAM, N. A.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of dextran sodium sulfate-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 17, n. 4, p. 917-26, Apr 2011.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 2, p. 83-9, Apr 2011.

NG, S. C. et al. Immunosuppressive effects via human intestinal dendritic cells of probiotic bacteria and steroids in the treatment of acute ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, n. 8, p. 1286-98, Aug 2010.

OHKAMI, H. et al. Effects of apple pectin on fecal bacterial enzymes in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. **Jpn J Cancer Res**, v. 86, n. 6, p. 523-9, Jun 1995.

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, Mar 1990.

PERAN, L. et al. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 33, p. 5185-92, Sep 7 2005.

PERSE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 718617, 2012.

PETERSON, D. A. et al. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. **Cell Host Microbe**, v. 2, n. 5, p. 328-39, Nov 15 2007.

POPOV, S. V. et al. Preventive effect of a pectic polysaccharide of the common cranberry *Vaccinium oxycoccos* L. on acetic acid-induced colitis in mice. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 41, p. 6646-51, Nov 7 2006.

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

RESCIGNO, M. et al. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. **Immunobiology**, v. 204, n. 5, p. 572-81, Dec 2001.

ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 33, n. 2, p. 103-48, 1993.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br J Nutr**, v. 104 Suppl 2, p. S1-63, Aug 2010.

ROBINSON, C. E. et al. Regulation of neutrophils in ulcerative colitis by colonic factors: a possible mechanism of neutrophil activation and tissue damage. **J Lab Clin Med**, v. 130, n. 6, p. 590-602, Dec 1997.

RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E. et al. Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. **J Nutr**, v. 132, n. 11, p. 3263-71, Nov 2002.

ROEDIGER, W. E. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. **Gut**, v. 21, n. 9, p. 793-8, Sep 1980.

SARTOR, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, v. 3, n. 7, p. 390-407, Jul 2006.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-94, Feb 2008.

SASAKI, S. et al. Thymic involution correlates with severe ulcerative colitis induced by oral administration of dextran sulphate sodium in C57BL/6 mice but not in BALB/c mice. **Inflammation**, v. 31, n. 5, p. 319-28, Oct 2008.

SEGAIN, J. P. et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 397-403, Sep 2000.

SHANAHAN, F. Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 6, p. 809-18, Apr 19 2004.

SHIBOLET, O. et al. Variable response to probiotics in two models of experimental colitis in rats. **Inflamm Bowel Dis**, v. 8, n. 6, p. 399-406, Nov 2002.

SOUZA, D. G. et al. Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury. **Am J Pathol**, v. 160, n. 5, p. 1755-65, May 2002.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods**, v. 83, n. 2, p. 209-15, Nov 7 1985.

STROBER, W.; FUSS, I. J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 140, n. 6, p. 1756-67, May 2011.

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

SUZUKI, T.; YOSHINAGA, N.; TANABE, S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. **J Biol Chem**, v. 286, n. 36, p. 31263-71, Sep 9 2011.

TEDELIND, S. et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 20, p. 2826-32, May 28 2007.

TURNBAUGH, P. J. et al. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804-10, Oct 18 2007.

TURNBAUGH, P. J. et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Sci Transl Med**, v. 1, n. 6, p. 6ra14, Nov 11 2009.

UCHIDA, M.; MOGAMI, O. Milk whey culture with *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 is effective on the colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid in rats. **J Pharmacol Sci**, v. 99, n. 4, p. 329-34, Dec 2005.

VAGO, J. P. et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 2, p. 249-58, Aug 2012.

VAN DER MAREL, S. et al. Gene and cell therapy based treatment strategies for inflammatory bowel diseases. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 2, n. 6, p. 114-22, Dec 15 2011.

VENKATRAMAN, A. et al. Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, n. 10, p. 1053-9, Oct 2000.

VENKATRAMAN, A. et al. Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat shock protein 70 and NF-kappaB. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 285, n. 1, p. G177-84, Jul 2003.

VIDELA, S. et al. Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 5, p. 1486-93, May 2001.

VIEIRA, A. T. et al. Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. **Am J Pathol**, v. 175, n. 6, p. 2382-91, Dec 2009.

VONG, L. et al. Up-regulation of Annexin-A1 and lipoxin A(4) in individuals with ulcerative colitis may promote mucosal homeostasis. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39244, 2012.

VYAS, U.; RANGANATHAN, N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. **Gastroenterol Res Pract**, v. 2012, p. 872716, 2012.

WILLIAMS, I. R.; PARKOS, C. A. Colonic neutrophils in inflammatory bowel disease: double-edged swords of the innate immune system with protective and destructive capacity. **Gastroenterology**, v. 133, n. 6, p. 2049-52, Dec 2007.

WONG, J. M. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, n. 3, p. 235-43, Mar 2006.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427-34, Jul 26 2007.

ZHAO, H. M. et al. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 5, p. 742-9, Feb 7 2013.

APÊNDICE A – Padronização de modelo experimental de colite crônica quanto à resposta inflamatória intestinal

MATERIAIS E MÉTODOS EXTRAS

- Padronização modelo crônico

A colite crônica por meio do uso de DSS pode ser realizada administrando-se baixa concentração desse reagente em período prolongo ou concentrações intermediárias na forma de ciclos. Como existe essa variação de modelos, bem como influências quanto ao lote, marca do DSS e também com a linhagem de camundongos, fez-se necessário à padronização do modelo, nas condições existentes no laboratório.

O DSS foi dissolvido (peso molecular 36,000-50,000, MP Biomedicals, LLC, Aurora, OH) em água na concentração de 3% (peso/volume) e a solução colocada no bebedouro dos animais para ingestão "*ad libitum*". Essa solução foi preparada e trocada dos bebedouros a cada dois dias e administrada aos animais durante sete dias, seguidos por fornecimento de água pura durante 15 dias, o que equivalia um ciclo de tratamento. Os animais foram divididos em grupos que receberam três (3C), quatro (4C) ou cinco ciclos de DSS (5C), enquanto os animais do grupo controle receberam apenas água, durante todo o acompanhamento. Ao final da administração dos ciclos, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose de anestésico (cetamina/xilazina), para a retirada do cólon e posteriores análises do processo inflamatório nesse órgão, através de parâmetros bioquímicos.

A padronização do modelo crônico objetivou descrever e avaliar a resposta inflamatória dos três ciclos e os influxos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos foram avaliados indiretamente através da quantificação da atividade das enzimas EPO, MPO e NAG, respectivamente.

- Delineamento experimental

Durante o período de fornecimento do DSS, os animais foram avaliados quanto ao escore clínico e tiveram os seus pesos aferidos nos dias 0, 3 e 6 (de cada ciclo), e, durante o período de fornecimento de água, o acompanhamento foi realizado uma vez

por semana, contabilizando no total de cada ciclo, pelo menos cinco avaliações do estado clínico dos animais (Figura 1).

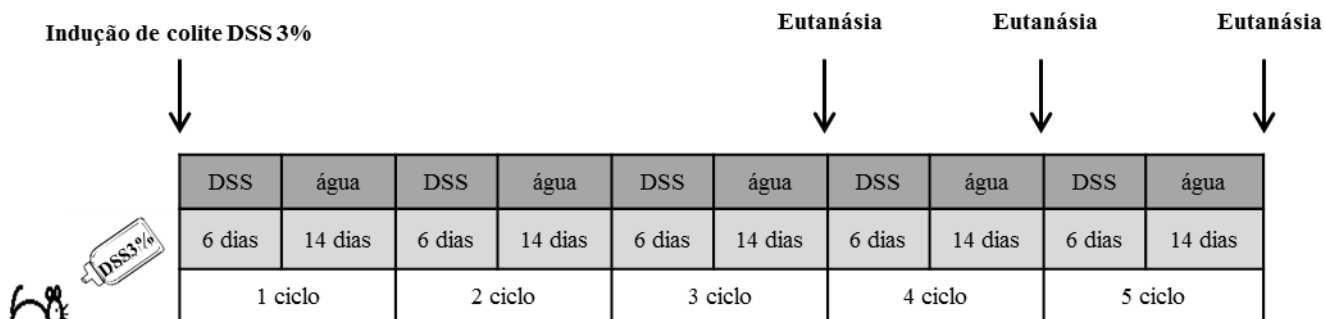


Figura 1. Delineamento experimental colite crônica. Padronização de modelo de colite crônica induzida por ciclos de DSS.

- Quantificação da infiltração de macrófagos no tecido por meio da avaliação da atividade da n-acetilglicosaminidase – NAG

Fragmentos do cólon foram homogeneizados utilizando-se o homogeneizador de tecidos (PowerGen 125[®] - Fisher Scientific Pennsylvania, USA) com solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck) na proporção de 1,9 mL de solução para cada 100mg de tecido. Logo em seguida, a amostra foi centrifugada a 4°C 3000 rpm/10min (1.500 g). Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio da NAG.

A reação foi iniciada após a adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidase (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH=4,5), concentração final de 2,24 mM, a 100 µL da amostra (sobrenadante recolhido após centrifugação do tecido) diluída em tampão citrato/fosfato (1:10). A reação se processou a 37°C/10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100µL de tampão glicina 0,2 M (pH=10,6) e quantificada em espectrofotômetro a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado a partir de curva padrão da atividade de NAG, expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, mediante injeção de solução de tioglicolato de sódio a 3%.

O lavado peritoneal foi realizado após tempo máximo de quatro dias pós-injeção. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama de tecido.

- Citometria de fluxo

Preparação de suspensões de células de linfonodo

Após a eutanásia dos animais os linfonodos cecal foram retirados e colocados em tubos de plástico de 15mL com 2mL de meio RPMI 1640 completo até o momento de maceração. Os linfonodos foram colocados sobre a parte fosca de lâmina de vidro e pressionados, por outra lâmina de vidro, para serem macerados, sobre uma placa de Petri com meio de cultura RPMI. O macerado foi colocado novamente no tubo de plástico e mais meio de cultura foi adicionado de forma que todos possuíssem a mesma quantidade de líquido. Em seguida os tubos foram centrifugados a 1.200rpm/10 min a 4°C. Após a essa etapa, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi acrescentado 300µL de meio para a contagem das células.

Contagem de células

Para a contagem das células viáveis foi utilizado o corante eritrocina, que cora as células mortas. As suspensões celulares sempre foram mantidas no gelo, para evitar a morte das células, e, foram agitadas para que todas as células estivessem em suspensão para a contagem que foi realizada da seguinte maneira:

- 1) Em um tubo de plástico foi colocado: 245µL de meio e acrescentado 5µL da suspensão celular (diluição - 1:50)
- 2) Em outro tubo foi colocado 50µL da nova suspensão celular em volume igual de eritrocina
- 3) Foi colocada uma quantidade suficiente para preencher a câmara de Neubauer para contagem em microscópio óptico
- 4) Foi realizada a contagem das células viáveis.

Após a contagem das células não-coradas (que seriam as viáveis), o número de células foi expresso de acordo com a seguinte fórmula: n° de células/mL = [(células viáveis x diluição x 10^4)/ n° campos contados na Câmara de Neubauer] x volume inicial da suspensão celular. A partir do número de células obtidas, as concentrações das suspensões foram padronizadas pela adição do volume necessário de RPMI completo para a obtenção 10^6 células/mL.

Preparação das células para aquisição no citômetro de fluxo

Para leitura no citômetro de fluxo, foram utilizadas placa de 96 poços de fundo em U. Foi pipetado 10 μ L da diluição de anticorpos (conforme orientação do fabricante) e 25 μ L da solução de células. Os anticorpos utilizados foram: CD4-FITC; CD8-PERCP; CD44-PECy7; CD69-APC; CD19-Pacific Blue. Após essa etapa, as placas foram incubadas por 30min na geladeira (4°C). Em seguida foi acrescentado a cada poço da placa 200 μ L de PBS azida e foi submetido à centrifugação a 1500rpm/10 min a 4°C. Esse procedimento foi realizado mais uma vez e o sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de fixador, paraformaldeído-4%. A solução foi armazenada protegida da luz a 4°C até o momento da aquisição em citômetro de fluxo.

As análises dos dados obtidos foram realizadas através do Software Flow Jo.

RESULTADOS PADRONIZAÇÃO DA COLITE CRÔNICA

O escore clínico apresentou elevação durante o fornecimento de DSS, com consequente redução após a retirada desse agente lesivo da mucosa (Figura 2A). Nesse modelo experimental, diferente do observado na colite aguda, a perda de peso é menos importante, apresentou oscilações, mas, foi superior ao peso inicial observado em praticamente todos os dias avaliados (Figura 2B).

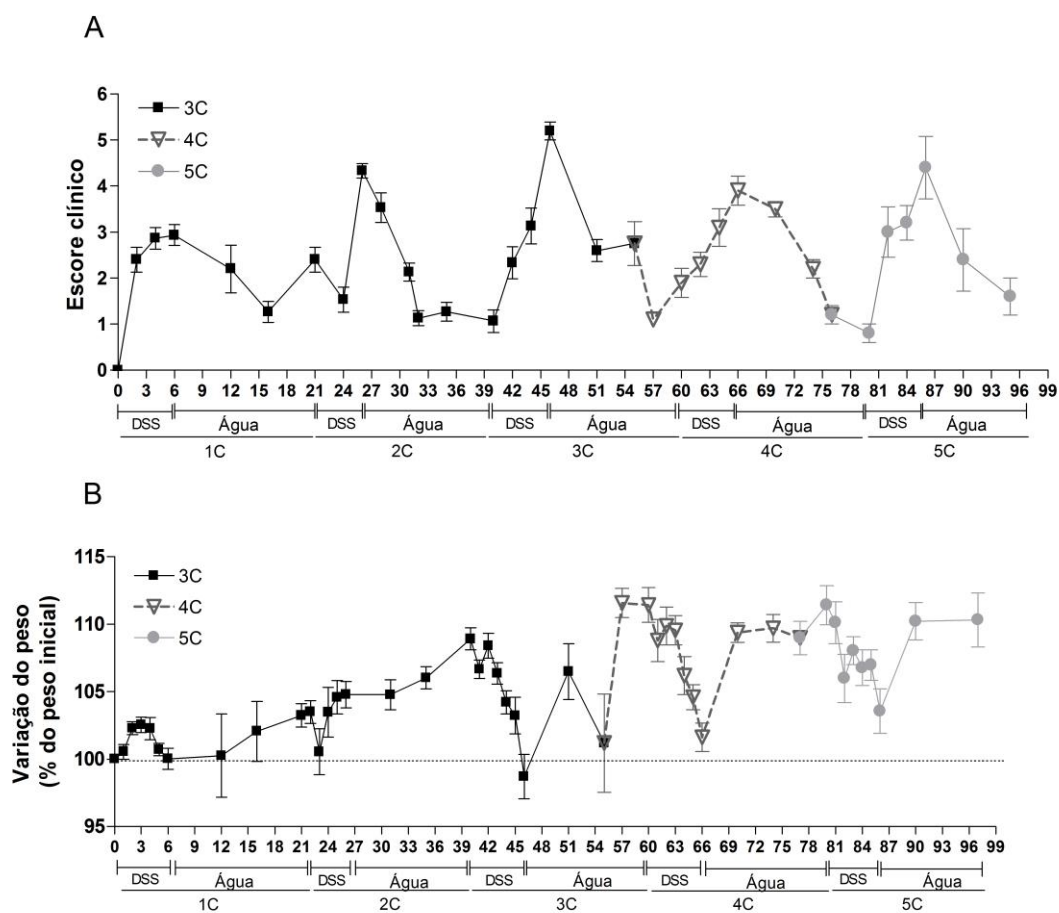


Figura 2. Avaliação do escore clínico e variação do peso em modelo de padronização de colite crônica com diferentes ciclos de DSS. (n=5) 3C: animais submetidos a três ciclos de DSS; 4C: animais submetidos a quatro ciclos de DSS; 5C: animais submetidos a cinco ciclos de DSS.

Em todos os grupos de animais submetidos à administração de DSS foi observado encurtamento do cólon em relação aos animais controle (Figura 3A). Nos animais que foram submetidos a três ou quatro ciclos de DSS, observa-se aumento do peso colônico, indicativo de edema devido ao processo inflamatório existente. No quinto ciclo de administração de DSS o aumento do peso do cólon não foi significativo em relação ao grupo controle (Figura 3B).

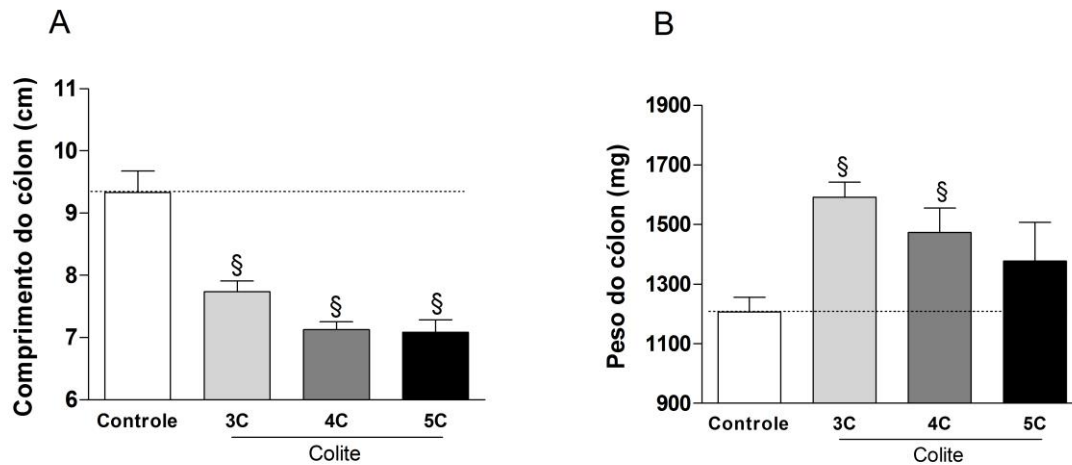


Figura 3. Avaliação do comprimento e peso do cólon em animais com colite crônica e diferentes ciclos de DSS. (A) Comprimento do cólon após a eutanásia (cm). (B) Peso do cólon excisado sem fezes e corrigido pelo peso corporal. Os resultados representam a média \pm EPM de cada grupo (n=5-7). § versus Controle. Controle: sem colite; 3C: animais submetidos a três ciclos de DSS; 4C: animais submetidos a quatro ciclos de DSS; 5C: animais submetidos a cinco ciclos de DSS ($p < 0,05$).

A atividade da MPO encontra-se elevada no cólon dos animais que foram submetidos a três, quatro ou cinco ciclos (Figura 4A) em relação aos animais sem colite. O aumento da atividade da EPO no cólon foi identificado apenas nos animais submetidos a cinco ciclos de DSS (Figura 4B), em relação ao controle. Não foi observada alteração significativa em relação à NAG (Figura 4C), assim como no modelo agudo (dados não mostrados).

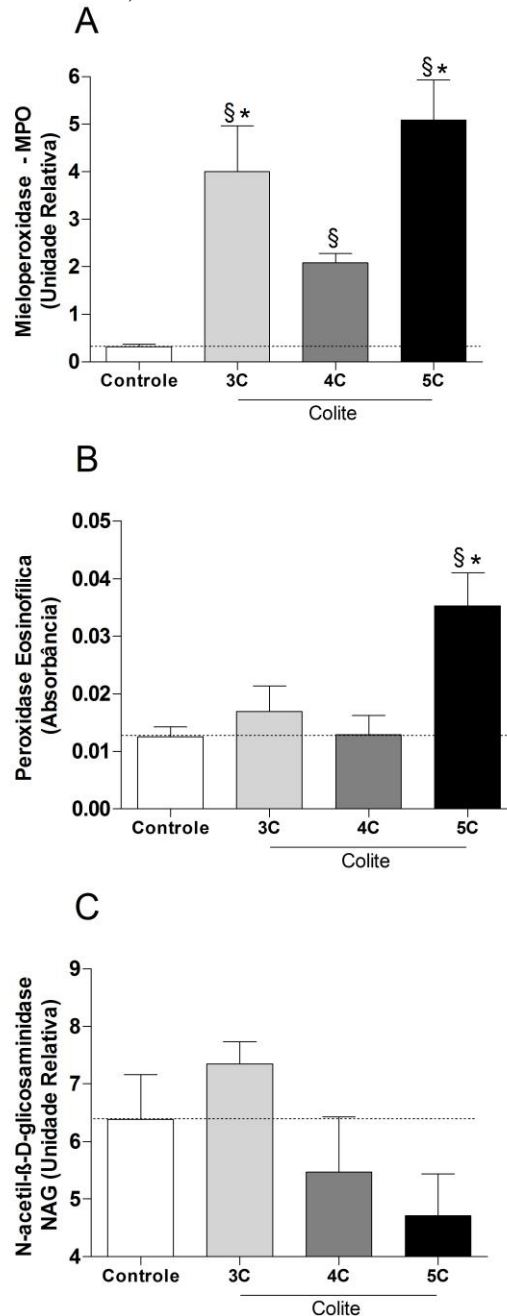


Figura 4. Atividades de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos em amostras de cólon de animais com colite crônica em diferentes ciclos de DSS. Os resultados representam a média ± EPM de cada grupo de (n=4-6). § versus Controle. Controle: sem colite; 3C: animais submetidos a três ciclos de DSS; 4C: animais submetidos a quatro ciclos de DSS; 5C: animais submetidos a cinco ciclos de DSS (p<0,05).

No linfonodo cecal dos animais com colite, submetidos a três ou cinco ciclos de DSS, não ocorreu aumento no número de linfócitos T CD4⁺ em relação aos animais controle (Figura 5A). Aumentou o número de linfócitos T CD8⁺ e de linfócitos B CD19⁺ nos animais submetidos a três ciclos com DSS em relação aos animais controle, mas esse aumento não é observado nos animais submetidos a cinco ciclos de DSS (Figura 5B e 5C). Em relação às células ativadas aumentou o número de linfócitos T CD4⁺CD^{44hi} no linfonodo cecal dos animais com colite submetidos a três ciclos de DSS em relação ao grupo controle. Não é observado aumento no número dessas células nos animais submetidos a cinco ciclos de DSS em relação aos animais controle (Figura 5D). Observa-se aumento no número de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ no linfonodo dos animais com colite submetidos a três ciclos de DSS em relação ao controle; já nos animais submetidos a cinco ciclos de DSS não houve aumento no número dessas células em relação ao controle. E dentre os grupos de animais com colite, nos animais com colite submetidos a três ciclos de DSS o número de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ no linfonodo cecal é superior ao número de linfócitos detectados nos animais com colite submetidos a cinco ciclos (Figura 5E). É identificado aumento no número de T CD8⁺CD69⁺ nos animais com colite submetidos a três ciclos de DSS em relação aos controles. Nos animais submetidos a cinco ciclos o número dessas células é similar ao detectado nos animais controle. Dentre os animais com colite, observa-se redução do número dessas células ao se comparar os animais submetidos a três ciclos e animais submetidos a cinco ciclos de DSS.

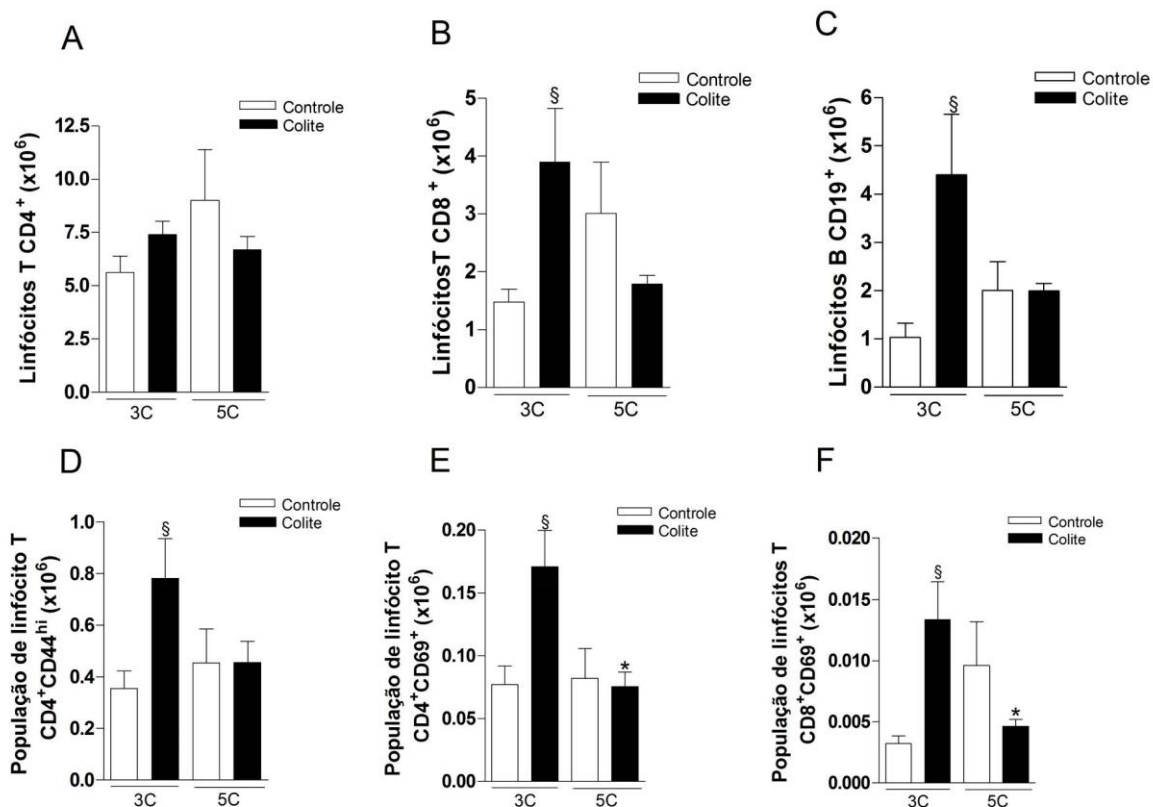


Figura 5. Avaliação da presença de linfócitos T e B totais e de populações de linfócitos T ativadas em linfonodos cecal de animais submetidos a três ou cinco ciclos de administração de DSS. (A) Linfócitos T CD4⁺; (B) linfócitos T CD8⁺; (C) linfócitos B CD19⁺; (D) populações de células T CD4⁺CD44^{hi}; (E) populações de células T CD4⁺CD69⁺; (F) populações de células T CD8⁺CD69⁺. Resultados representam a média \pm EPM de cada grupo de (n=4-5). § versus Controle; * versus Colite 3C. Controle: animais sem colite; 3C: animais submetidos a três ciclos de DSS; 5C: animais submetidos a 5 ciclos de DSS (p<0,05).